

94



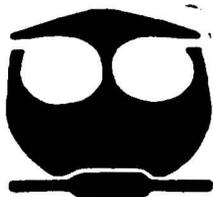
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACION DE CAMBIOS FENOTIPICOS Y
FUNCIONALES EN CELULAS DEL LINAJE
MIELOMONOCITICO EN DIFERENTES ESTADIOS DE
DIFERENCIACION.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
BELEN MARTINEZ LOPEZ**



ASESOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

MEXICO, D.F.



2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



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: Prof. Saturnino de León Chapa

Vocal: Prof. Fernando Gacía Tamayo

Secretario: Prof. Enrique Ortega Soto

1er Suplente: Prof. Patricia Elvira Berrón Ruiz

2do Suplente: Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís

El tema se desarrolló en el
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Inmunología
Ciudad Universitaria


Ph.D. Enrique Ortega Soto
Asesor


Belén Martínez López
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT y la DGAPA-UNAM, por los apoyos financieros para los Proyectos 31783-N e IN208399 respectivamente.

Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL) de la UNAM, por la Beca de tesis que recibí para el soporte de este trabajo a lo largo de un año.

A la Facultad de Química, por haberme dado la oportunidad de ser un miembro más de su comunidad Universitaria.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y al Dr. Enrique Ortega, por abrirme un espacio y apoyarme en la realización de este trabajo.

Si bien no existe una palabra para describir la inmensa alegría que siento al ver realizado uno más de mis sueños; quisiera al menos expresar el agradecimiento que siento hacia todas las personas que estuvieron involucrados conmigo para la culminación de este proyecto.

A mis padres

Que con su paciencia, inmenso amor , cariño y apoyo; me han hecho feliz y enseñado a luchar por lo que quiero, porque gracias a sus enseñanzas me han permitido ser quien soy y porque este trabajo es el resultado de su esfuerzo y el mío, lo dedico especialmente a ustedes .

A ti Isa

Por enseñarme tanto, por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia, por darme tu apoyo incondicional; por regalarme tu alegría y hacerme reír a carcajadas, porque eres única; pero sobretodo por tu cariño.

A ti Juan Carlos

Por todo el amor que me das , por apoyarme incondicionalmente a lograr tantos sueños como este y locuras miles; por el hombro y la mano del gran compañero y amigo que siempre has sido, por divertirme tanto y hacerme tan feliz, por compartir tu vida conmigo; por que te amo.

A todos mis familiares por su apoyo y seguir siendo una gran familia.

A ti Oscar por tu cariño y apoyo incondicional, por ser como un hermano.

A mis amigos de la Facultad, por hacerme muy divertida mi estancia y haber aprendido juntos.

A ti Arturo

Por ser un ejemplo para mí y compartir conmigo momentos tan felices, por tu paciencia y enseñanzas; por que te quiero.

A Enrique por ser más que un mentor para mí, un gran amigo.

A mis amigas del alma, Laura, Fabiola y Marcy; por que son parte de mi vida y me han hecho ser una mejor persona, haberme hecho mas divertida la vida y por permitirme seguir siendo parte de ustedes.

A compañeritos de Biomédicas por acogerme como un miembro más de su equipo y haber compartido los logros de este proyecto juntos.

A todos mis compañeros y amigos, que han compartido conmigo su vida para conocernos y crecer, como de momentos tan divertidos que nunca olvidaré.

Y finalmente, a la vida , por lo feliz que me siento de seguir compartiendo con todos y cada uno de ustedes simplemente lo que soy.

INDICE

	Pag.
Capítulo 1	
1.1 Justificación del proyecto	5
1.2 Objetivos	6
1.3 Hipótesis	7
Capítulo 2	
Antecedentes	8
2.1 Respuesta inmunológica	8
2.2 Inflamación	10
2.3 Sistema fagocítico mononuclear: origen, morfología, contenido celular, heterogeneidad, actividad y activación	12
2.4 Activación de fagocitos mononucleares	19
2.5 Diferenciación: relación con el estado de activación, modelos celulares, inductores y efectos	21
Capítulo 3	
Materiales y Métodos	30
3.1 Diagrama de flujo	30
3.2 Glosario	32
3.3 Diferenciación in vitro de células mielomonocíticas U-937 y THP-1	33
3.4 Recolección de células U-937 y THP-1 después de tratamiento	36
3.5 Determinación de fosfatasa ácida en extractos celulares	38
3.6 Determinación de β -glucuronidasa en extractos celulares	39
3.7 Hemaglutinación	40
3.8 Determinación de fagocitosis de eritrocitos de carnero	44
3.9 Inmunofluorescencia indirecta para la determinación de la expresión de receptores de membrana	47

Capítulo 4	Resultados	49
	4.1. Determinación de la concentración de los inductores de diferenciación necesaria para provocar cambios morfológicos y en la proliferación	49
	4.2. Efecto de los inductores de diferenciación sobre la proliferación celular	57
	4.3. Efecto de los inductores de diferenciación sobre el contenido de Enzimas Hidrolíticas	62
	4.4. Efecto de los inductores de diferenciación sobre La capacidad fagocítica	67
	4.5. Cuantificación de receptores FcγRI, FcγRII y CR3 después del tratamiento con inductores de diferenciación	70
Capítulo 5	Discusión	80
	5.1 Efecto de la diferenciación sobre proliferación celular.	80
	5.2 Efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre la morfología celular.	81
	5.3 Efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre la fagocitosis de eritrocitos de carnero	82
	5.4 Efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre la expresión de receptores.	82
	5.5 Efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre el contenido de enzimas hidrolíticas	83
	5.6 Otros efectos	83
Capítulo 6	Conclusiones	85
Referencias		86
Apendices	I	Análisis estadístico
	II	Preparación de soluciones

CAPITULO 1

1.1 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Las células del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), juegan un papel muy importante tanto en la regulación de la respuesta inmunológica como desempeñando una gran variedad de funciones efectoras que forman parte de los mecanismos de defensa del organismo.

La capacidad de estas células para llevar a cabo la gran diversidad de funciones depende de los atributos de las mismas, que se encuentran íntimamente relacionados con el estado de diferenciación-activación que posea la célula al momento de del estímulo. Dicho estado, esta gobernado por la influencia o acción de diversos factores inductores de diferenciación que se localizan en el microambiente celular.

Para estudiar los efectos de un agente determinado, debemos contar con poblaciones celulares homogéneas. Esto solo es posible usando modelos celulares de diferenciación *in vitro* que partan de una sola línea celular. Como un paso inicial para el estudio de la cascada de eventos moleculares responsables de los cambios producidos por agentes inductores de diferenciación en las células del sistema fagocítico mononuclear, es necesario caracterizar *in Vitro*, bajo las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio, los efectos de éstos sobre algunas propiedades de las líneas celulares promonocíticas U-937 y THP-1, que son inducibles de diferenciarse. Esto por tanto, nos permitirá correlacionar, las modificaciones en la expresión de ciertos genes, a través de la cuantificación de proteínas de membrana y de secreción con los posibles cambios morfológicos y funcionales que se observan.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar los cambios fenotípicos producidos *in vitro* en células del linaje mielomonocítico, inducidos por diversos agentes inductores de diferenciación.

Objetivos Particulares

- Obtener poblaciones celulares *in vitro* en diferentes estadios de diferenciación a partir de tratamientos con distintos inductores .
- Caracterizar fenotípica y funcionalmente estas poblaciones con respecto a:
 - a) Morfología
 - b) Proliferación.
 - c) Expresión de receptores para IgG (Fc γ R) y del receptor tipo 3 para complemento (CR3).
 - d) Expresión de enzimas hidrolíticas intracelulares: fosfatasa ácida y β -glucuronidasa.
 - e) Capacidad fagocítica como función efectora

1.3 HIPÓTESIS

La exposición de las células del sistema fagocítico mononuclear U-937 y THP-1 al tratamiento con los inductores de diferenciación, producirán poblaciones celulares homogéneas in vitro con características fenotípicas y funcionales distintas entre sí por encontrarse en diferentes estadios de diferenciación/ maduración.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 RESPUESTA INMUNOLÓGICA

El organismo humano está conformado por diversos sistemas esenciales para desempeñar todas aquellas funciones que le son necesarias para poder sobrevivir. Dichas funciones le serían inútiles si no contara con un sistema que le permitiera contrarrestar la acción de agresores externos e internos a los que se ve sometido diariamente. Es por ello que dentro de las actividades que lleva a cabo el organismo, la protección es una de las principales.

El sistema inmunológico, que protege al organismo contra diversas enfermedades provocadas por infecciones bacterianas, fúngicas, virales o agentes externos nocivos; utiliza diversas estrategias para desempeñar su función. La respuesta tan diversa que permite al sistema inmunológico ser lo suficientemente versátil para responder a tan variados estímulos, depende del nivel en el que se haya presentado el daño; ya que ello marcará el tipo o tipos celulares involucrados y el tipo de respuesta inflamatoria que resultará ante dicho estímulo.

Las células que componen el sistema inmunológico se originan en la médula ósea a partir de una célula germinal. En la médula ósea ocurren los primeros eventos de maduración para después migrar y monitorear los tejidos por circulación periférica o en el sistema linfático. Existen dos tipos celulares que se derivan de la célula germinal: a) Células linfoides; que originan a los linfocitos T y B, b) Células mieloides; que dan lugar a leucocitos polimorfonucleares, megacariocitos, eritroblastos, células cebadas y monocitos. Cada una de estos tipos celulares lleva a cabo funciones específicas y complejas, que de forma concentrada actúan sobre el agente reconocido como extraño (1)

Los mecanismos de defensa del organismo son variados y se les puede clasificar en dos grandes grupos según la línea celular que actúe y la complejidad de la respuesta: *Respuesta Innata* y *Respuesta Adaptativa*. La primera, es consecuencia de la actividad de los fagocitos y células NK que se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, constituyendo la primera línea de defensa contra diversos microorganismos además de ser esenciales para el control de infecciones bacterianas comunes (7). Sin embargo, al no ser siempre eficaces para eliminar los agentes infecciosos o de reconocer muchos otros patógenos, a menudo se requiere de la acción de otras células, como los linfocitos, que permitan obtener una respuesta adaptativa más evolucionada que provea de medios de

defensa más versátiles; que además otorguen protección al organismo ante una subsecuente reinfección con el mismo patógeno. (2,3)

Toda respuesta inmunológica comienza con un proceso de *Inflamación* la cual es una respuesta localizada inducida por daño o destrucción de tejido, que sirve para destruir, diluir o eliminar tanto al agente agresor como al tejido dañado. Durante la inflamación se llevan a cabo un sin número de eventos que permiten el flujo de leucocitos hacia el lugar de acción. Las respuestas originadas por el proceso de inflamación, no distinguen un proceso benéfico de uno dañino (8). La acumulación y subsecuente activación leucocitaria son los eventos centrales en la patogénesis de diversos tipos de inflamación; ya que la ausencia de la respuesta inflamatoria da lugar a un organismo comprometido inmunológicamente y; por otro lado el exceso de respuesta, ya sea por reconocimiento de moléculas propias del organismo o falla en el proceso de regulación negativa, provoca enfermedades inflamatorias.

Durante el proceso inflamatorio se observan dos tipos de respuesta que median la eliminación del agente agresor: *Humoral* y *Celular*. La respuesta humoral se orienta a la destrucción de microorganismos extracelulares y previene la dispersión de infecciones intracelulares, por medio de anticuerpos secretados por los linfocitos B. Los anticuerpos actúan en tres formas diferentes según el agente causal; por *neutralización*, donde inhiben el efecto tóxico o la capacidad de infectar de los patógenos al unirse los anticuerpos a éstos; por *opsonización*, cubriendo al patógeno con los anticuerpos dirigidos en contra de éste, permitiendo a las células accesorias reconocer la fracción constante o cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas para ingerir y destruir al patógeno; y por último, por *activación de la cascada de proteínas del complemento* (9), que aumenta considerablemente la opsonización permitiendo con ello la destrucción directamente de ciertas células bacterianas. (4)

La respuesta celular, por su parte, es mediada principalmente por los linfocitos T, quienes para participar en la respuesta inmunológica deben proliferar y diferenciarse en células capaces de contribuir a la destrucción de patógenos. Dichas células se dividen en tres clases funcionales diferentes que tienen la capacidad de detectar antígenos derivados de diferentes tipos de patógenos, presentados por las dos clases de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Aquellos antígenos que se multiplican dentro de la célula son llevados a la superficie por moléculas del MHC clase I y presentados a las células *T citotóxicas* CD8⁺, cuya acción es la de matar a la célula infectada; los antígenos que se multiplican en vesículas celulares y los que se derivan de bacterias y toxinas ingeridas son llevados a la superficie por moléculas del MHC clase II y presentadas a las células T CD4⁺ que a su vez se diferencian en dos tipos de células efectoras: células *T inflamatorias* (T_H1) que activan a los macrófagos infectados

para destruir los patógenos que se encuentren en sus vesículas; y las células *T ayudantes* (T_H2) que activan a los linfocitos B para la producción de anticuerpos. (11)

La activación de las células T se inicia mediante el reconocimiento del antígeno específico contra el cual van dirigidas, en la superficie de una células presentadoras de antígeno (APC). Dichas células se encuentran en los órganos linfoides periféricos en donde atrapan al antígeno y presentan los fragmentos peptídicos de éste a las células T circulantes. Las células presentadoras de antígeno más importantes son las células *dendríticas*, cuya única función es la presentación de antígeno; y los *macrófagos*, que también son importantes como células fagocíticas, al ser la primera línea de defensa en contra de infecciones y como células blanco para las células T activadas. Por su parte, los linfocitos B pueden funcionar como células presentadoras de antígeno en ciertas circunstancias. Uno de los efectos más importantes que resultan de la respuesta celular es la memoria inmunológica que se obtiene después de la respuesta primaria, la cual provee de protección ante subsecuentes retos con el mismo antígeno (8,10)

2.2 INFLAMACION

El proceso inflamatorio es muy complejo e involucra la participación de varios componentes celulares y factores solubles. Para simplificar el estudio se ha clasificado en cuatro diferentes tipos de respuesta inflamatoria inmunológicamente inducida, dependiendo del agente humoral y celular que predomine en dicha respuesta.

La *Inflamación Alérgica o Reagínica* se produce en respuesta a ciertos antígenos que tienen la propensión de estimular la producción de anticuerpos de la clase IgE en individuos genéticamente susceptibles. La unión de los complejos antígeno-anticuerpo a los receptores para IgE (FcεRI) expresados en la superficie de células cebadas y basófilos, provoca su degranulación y la liberación súbita de diferentes mediadores que desencadenan manifestaciones patológicas diferentes por la exacerbación de una respuesta incontrolada hacia el estímulo. (5)

La *Inflamación Mediada por Anticuerpos Citotóxicos* puede ser provocada de varias maneras: a) por la lisis celular provocada por el depósito de proteínas del complemento sobre la superficie celular que expresa determinados antígenos que han sido reconocidos por anticuerpos específicos de la clase IgG o IgM; b) por la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG y C3b a través de los receptores expresados en la superficie celular de los macrófagos (FcγR y CR3 respectivamente); o c) al activar la vía del complemento por unión extravascular de anticuerpos a células o estructuras celulares. La acumulación de

células inflamatorias y de eventos líticos mediados por las moléculas del complemento, causa la destrucción de tejidos cubiertos por anticuerpo. (5)

La *Inflamación Mediada por Complejos Inmunes* es muy similar a la antes mencionada; sin embargo, cuando la cantidad de complejos inmunes (antígeno-anticuerpo) depositados localmente es muy grande o éstos se localizan en los vasos sanguíneos, los leucocitos (Fagocitos mononucleares y polimorfonucleares) son incapaces de ingerir y digerir por completo al estímulo inflamatorio, sino que se adhieren al complejo inmune y degranulan, liberando los contenidos lisosomales; así mismo, la unión de los complejos inmunes a los fagocitos activa el estallido respiratorio provocando que las células liberen metabolitos tóxicos de oxígeno. Estos eventos frecuentemente causan daño en la integridad de los vasos sanguíneos y por lo general resultan en necrosis hemorrágica y destrucción tisular local. (5)

Por último, las *Reacciones de Hipersensibilidad Tardía (Inflamación Mediada por Leucocitos Mononucleares)* se presentan cuando el antígeno es procesado por los macrófagos y la forma procesada del antígeno es presentada a los linfocitos T que contengan receptores para el antígeno y para moléculas presentes en la superficie del macrófago. Dicha presentación provoca la liberación de citocinas por parte de los linfocitos que son capaces de atraer y activar macrófagos y otros linfocitos. Este tipo de respuesta se manifiesta aproximadamente 48 - 72 h después de la exposición al antígeno y es de suma importancia para la eliminación de parásitos intracelulares, células tumorales y virus. (5,6).

Como podemos apreciar, los procesos inflamatorios juegan un papel muy importante en la defensa inmunológica del organismo y en el proceso de curación; sin embargo, también participan en la patogénesis de muchas enfermedades.

Dentro de los diferentes tipos de procesos inflamatorios se encuentran como participantes importantes, las células del linaje *Monocito-Macrófago (Fagocitos mononucleares)*; que como vimos son los iniciadores de la respuesta inflamatoria, por ser la primera línea de defensa. Al mismo tiempo estas células son el último eslabón de la respuesta inflamatoria en quienes recae la acción de las demás líneas celulares activadas ya que las funciones efectoras de las inmunoglobulinas y de las células citotóxicas no destruyen directamente al antígeno, sino que capturan el antígeno que logró pasar la primer barrera de fagocitosis para dirigirlo de regreso al sistema fagocítico a lo largo del proceso. En la siguiente sección me enfocaré a describir con mayor detalle las características y procesos en los que se ven involucradas dichas células.

2.3 SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR

Origen

En la médula ósea podemos encontrar los componentes del linaje mielomonocítico; tanto los macrófagos residentes, que son células que no han sido expuestas a un estímulo inflamatorio, como sus precursores: monocitos, promonocitos y monoblastos. Los monocitos y los neutrófilos (fagocitos polimorfonucleares) se derivan de una célula progenitora común en la médula ósea, llamada frecuentemente *unidad formadora de colonia granulocito-macrófago* (CFU-GM). La diferenciación final de esta célula progenitora hacia cualquiera de las dos vías, dependerá de los factores que se encuentren en el microambiente. Dependiendo del estado de diferenciación en el que se encuentren cada uno de estos tipos celulares posee características fenotípicas y funcionales definidas; tales como contenido enzimático; presencia o ausencia de antígenos y receptores de membrana; morfología; funciones efectoras y localización en el organismo. Como las células mencionadas poseen un origen común, morfología similar y funciones; se ha considerado que forman *El Sistema Fagocítico Mononuclear* (14).

La formación de nuevas células monocíticas (monocitopoyesis) se encuentra constantemente influenciada por la actividad humoral tanto de los macrófagos, por la liberación de citocinas producidas por ellos, como de las diversas linfocinas secretadas por los linfocitos T durante la respuesta inflamatoria. Dicho proceso consta de diferentes pasos intermedios para dar origen a una célula fagocítica funcional y pueden resumirse de la siguiente manera: La célula germinal da lugar al monoblasto y éste por división celular da lugar a dos promonocitos; a su vez cada promonocito en división da origen a dos monocitos; por lo que podemos decir que la división de los precursores monocíticos permite una amplificación de una a cuatro células. (16,17)

Una vez formado el monocito, éste solo permanece alrededor de 24 h en la médula ósea para después migrar a sangre periférica, lo que implica que no pasan por una etapa de maduración dentro de ésta. Una vez que entran en circulación, los monocitos se distribuyen en un 25 % del total como monocitos circulantes y el resto como monocitos marginales; es posible que estos últimos, que se encuentran adheridos débilmente al endotelio, sean los monocitos capaces de migrar a los tejidos y cavidades del organismo y ahí diferenciarse hasta macrófagos. (15)

El proceso de migración de monocitos de sangre periférica hacia tejidos extravasculares para posteriormente diferenciarse en macrófagos, involucra diferentes eventos: 1.- adherencia de las células monocíticas al endotelio, 2.- migración entre las células endoteliales, 3.- migración subsecuente a través de las estructuras subendoteliales y finalmente el arribo de las células monocíticas al sitio

de acción en donde los monocitos se diferencian a macrófagos pudiendo permanecer en los tejidos por varios meses. Es importante considerar que los macrófagos en tejidos y cavidades, no son poblaciones celulares constantes, sino que son regularmente renovados por el influjo de monocitos. El destino final de los macrófagos es incierto; aunque se sabe que un gran número de macrófagos muere en los nódulos linfáticos, tejidos y cavidades corporales. (15)

Morfología

Las características morfológicas de los diferentes componentes dentro de la misma línea celular son sumamente importantes ya que de ello dependerá, conjuntamente con otras características fenotípicas, la caracterización del estado de maduración en el que se encuentra la célula y por tanto la clasificación de la misma. Comenzando por la estructura más diferenciada de los fagocitos mononucleares, los macrófagos poseen un núcleo arriñonado con uno o dos nucleolos y cromatina nuclear dispersa; el aparato de Golgi está bien definido y el citoplasma contiene dos tipos principales de gránulos, según el contenido enzimático que contengan: finos y azurofílicos (lisosomas primarios) que son distinguibles por medio de tinciones específicas. Las vacuolas citoplasmáticas frecuentemente se observan en la periferia de las células, lo que indica una pinocitosis activa. Una característica morfológica representativa de los macrófagos, es la propensión a adherirse y a extenderse en superficies diversas, dejando los organelos celulares concentrados en la zona central. (12)

Los monocitos son los precursores celulares directos de los macrófagos y son de un tamaño menor que estos últimos, con un núcleo que puede ser arriñonado, redondo o irregular y un patrón de cromatina fina. El citoplasma, al igual que el de los macrófagos, contiene tanto gránulos finos, como gránulos azurofílicos largos y vacuolas citoplasmáticas muy claras. (13)

Los promonocitos son las células intermedias entre el monoblasto y el monocito y se caracterizan por la presencia de varios gránulos azurofílicos maduros e inmaduros y un núcleo indentado de forma irregular. El monoblasto por su parte, es indistinguible del mieloblasto por microscopía de luz directa y se encuentra en números muy pequeños en la médula ósea de individuos normales. (13).

Contenido Celular

El contenido intracelular y las moléculas de superficie de los fagocitos mononucleares, así como la morfología de los mismos, son igual de importantes para caracterizar los componentes celulares del sistema. Los macrófagos y monocitos poseen dentro de las estructuras lisosomales diversas enzimas hidrolíticas tales como: fosfatasa ácida, β -glucuronidasa, N-acetil-glucosaminidasa,

lisozima, esterasa (localizada en la superficie externa de la membrana plasmática) y peroxidasa entre otras. Tintorialmente, los monocitos pueden teñirse débilmente en la reacción de PAS (Periodic acid-Schiff) para polisacáridos, mientras que los macrófagos son generalmente PAS negativo y, a menos que se presente un proceso de fagocitosis, pueden mostrar depósitos intracitoplásmicos PAS positivos. (18).

En cuanto a las moléculas que se expresan en la superficie celular de los macrófagos, se encuentra una gran variedad de receptores que determinan el control de diversas actividades como crecimiento, diferenciación, activación, reconocimiento, endocitosis, migración y secreción. Dentro de los más reconocidos se encuentran: receptores para Fc (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII, FcαRI, FcεRII); receptores de complemento, involucrados en la unión e ingestión de partículas opsonizadas con fragmentos de componentes del complemento; receptores para citocinas (IL-2R, IL-3R, IL-4R entre otros); receptores para péptidos; receptores hormonales esteroideos como 1,2,5-Dihidroxi vitamina D₃ (14); receptores para lipoproteínas; receptores para moléculas de adhesión y migración; receptores para coagulantes y anticoagulantes entre otros (18). Como un apartado de los receptores mencionados anteriormente, dedicaré un espacio para los receptores de la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas, ya que son las moléculas que más ocupan nuestra atención en el proyecto global del laboratorio, con el fin conocer como intervienen estas moléculas durante el proceso de transducción de señales que se lleva a cabo en estas células ante un estímulo determinado, dependiendo de su estado de diferenciación celular.

Receptores para IgG

Los receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulina G se expresan en todas las células hematopoyéticas nucleadas y están involucrados en la activación celular a partir del reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales al ser multivalentes provocan la agregación de los receptores, lo que a su vez induce como resultado diferentes respuestas efectoras por parte de las células.

Actualmente se conocen tres tipos de receptores para IgG: FcRγI, FcRγII, FcRγIII; y dentro de cada tipo existen varias isoformas. Los dominios extracelulares de estos receptores presentan una cierta homología, pero no parece haber una selectividad para la unión hacia los diferentes isotipos de IgG, ya que los tres receptores presentan el mismo patrón de unión: IgG3=IgG1>> IgG2, IgG4.

Los receptores FcγRI y FcγRIII, expresados en células del linaje monocito-macrófago, están asociados no covalentemente con dímeros de cadenas γ. Estas cadenas γ poseen motivos consenso intracitoplásmicos llamados ITAM (Immunoreceptor Tyrosine Activated Motifs) que son importantes en la

transducción de señales (19). A diferencia de los otros, la porción intracelular del receptor FcγRII contiene *persé* motivos ITAM en su estructura. (20)

La agregación de los receptores surge una vez que se ha reconocido al complejo antígeno-anticuerpo y es necesaria para que pueda existir la internalización de la señal que a su vez genera una cascada de activación intracelular muy diversa. El primer evento bioquímico que parece resultar es la fosforilación de residuos de tirosina de diversas proteínas, incluyendo cinasas de tirosina como Src y Syk/ZAP70 y algunas cadenas de receptores (21). Una vez desencadenada la cascada de señalización, se pueden seguir cualquiera de las siguientes vías: hidrólisis de fosfoinosítidos, activación de proteínas cinasas ulteriores, fosforilación de sustratos entre otros. Sabemos que la agregación del FcRγI, como de otros receptores para IgG, inducen eventos similares como la fosforilación de tirosina en la fosfolipasa C (PLC-γI), fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3-K), proteína activadora de GTPasa (GAP), activación de cinasas de la familia Src (Hck, Lyn), activación de la cinasa Syk. (22,23)

Sin embargo, el enfoque del estudio es el conocer los efectos que se producen cuando se fosforilan las secuencias consenso del ITAM : D/E-X(2)-Y-X-X-L/I-X(7)-Y-X-X-L/I que se encuentran en la región intracitoplásmica de los receptores para IgG; ya que se ha demostrado que la fosforilación de los mismos es crucial para la transducción de señales a través de estos receptores.(24,25)

El modelo que se acepta actualmente propone que la agregación de los receptores induce la fosforilación de los residuos de tirosina presentes en los ITAMs. Estos a su vez sirven de sitio de reconocimiento para las cinasas de tirosina que poseen dominios SH2 (familia Src u otras proteínas citosólicas que poseen dominios enzimáticos afines a residuos de tirosina fosforilada) formándose con ello complejos de transducción de señales. Esta unión favorece y aumenta la actividad catalítica de las cinasas para poder fosforilar otras proteínas citosólicas como la cinasa MAP, fosfolipasa C-γ, cinasa de fosfatidil inositol-3 entre otras, cuyas actividades determinan la respuesta celular.

Heterogeneidad de Macrófagos

Debido a que el organismo se encuentra continuamente expuesto a una gama de antígenos muy variada penetrando por diferentes vías, los macrófagos residentes muestran una amplia distribución en todo el organismo. Estas células muestran una importante heterogeneidad funcional, morfológica y fenotípica, dependiendo de la región en donde se encuentren, lo cual es reflejo del microambiente local en que se hallen con la finalidad de responder eficazmente contra el antígeno invasor.

Según la región donde se localizan, los macrófagos pueden clasificarse de la siguiente manera:

- 1- *Macrófagos Alveolares*.- Son el componente celular mayoritario en el pulmón (26). Están involucrados en la defensa local contra una variedad de patógenos y partículas que penetran por la vía aérea y desempeñan una respuesta temprana en el proceso de inflamación y control de la infección. Algunas patologías en las que juegan un papel muy importante son: sarcoidosis, silicosis y asbestosis; en infecciones producidas por *Legionella* o padecimientos crónicos como la tuberculosis .
- 2- *Células de Kupffer*.- Su función es la de eliminar partículas y sustancias solubles que se encuentren en el hígado y procesarlas para después presentarlas en la superficie membranal, contribuyendo con ello a la respuesta inmunológica en contra de los invasores (27). Las células de Kupffer resultan ser parcialmente responsables de regular la respuesta inmunológica en la fase aguda, después de algún daño o malignidad, por la producción de IL-6.
- 3- *Células de Bazo*.- El bazo contiene una población muy heterogénea de macrófagos y células relacionadas. Las diferencias fenotípicas reportadas (28) probablemente reflejan las diferentes funciones que llevan a cabo: el englobamiento y procesamiento de antígenos extraños en la zona marginal, interacciones especializadas con células T y B en las zonas linfáticas y fagocitosis/degradación de eritrocitos en la pulpa roja .
- 4- *Médula Osea*.- Como he mencionado con anterioridad, los macrófagos desempeñan un papel integral para la hematopoyesis. (29)
- 5- *Otros sitios*.- Las otras áreas que existen, en donde podemos encontrar macrófagos residentes con una actividad importante son: el intestino; subendotelio de las grandes arterias, donde se ha observado que son células metabólicamente en reposo; además, muchos macrófagos pueden penetrar la barrera hemato-encefálica en condiciones normales; primero entrando al sistema nervioso durante el desarrollo embrionario y después adoptando la forma de las células microgliales.

Para establecer con mayor detalle la importancia de la función que desempeñan las células fagocíticas mononucleares residentes en cada tejido u órgano, enunciaré algunas de las diversas actividades que pueden llevar a cabo una vez que han reconocido al agente extraño; en caso de existir la presencia de algún antígeno en sangre, las células fagocíticas localizadas en el hígado (células de Kupffer) y las del bazo, son capaces de unir el antígeno y en la mayoría de los casos fagocitarlo, provocando con ello la desaparición de dicho antígeno. En caso

de que permaneciera antígeno afuera de las células o éste migrara a cualquier otro punto, se desencadenaría una respuesta inmunológica. Los antígenos patogénicos de origen viral o bacteriano por lo general son capaces de burlar la primera barrera fagocítica y establecer un foco donde se favorezcan las condiciones para que el agente patógeno proliferare; provocando con ello el inicio de una competencia entre el patógeno y el sistema inmunológico. Sabemos que dependiendo la vía de entrada del antígeno al organismo, serán las células fagocíticas residentes que encuentre como primer barrera; tal es el caso de todo aquel antígeno que entre por vía aérea en forma de aerosol, será arrestado por los macrófagos que se localizan en la superficie alveolar; si entra por la piel se enfrentará a un grupo de fagocitos mononucleares denominado *Células de Langerhans*. En cerebro, que a pesar de considerarse un sitio inmunológicamente privilegiado porque; tanto las células como las inmunoglobulinas del sistema inmunológico periférico no pueden atravesar la barrera hemato-encefálica; el antígeno es atrapado por las células de la *Microglia* que son fagocitos mononucleares residentes. (30)

Es por lo anterior que se considera que el macrófago establece un punto en el que los componentes celulares del sistema inmunológico se organizan para dirigir una acción conjunta de ataque en contra del antígeno.

Actividad de los Fagocitos Mononucleares

Hemos observado que los fagocitos mononucleares se involucran en diversas actividades; de ahí la importancia de estas células en la participación en procesos tanto patológicos como homeostáticos. En la *Hemostasis*, tanto monocitos como macrófagos sintetizan y expresan el factor tisular y posiblemente otros factores de coagulación (31); de manera indirecta, por producción de IL-1 y TNF- α , inducen la síntesis del factor tisular por parte de las células endoteliales, participando por lo tanto en la trombogénesis.(32)

Como *Células de Escrutinio*, los macrófagos tienen la capacidad de destruir células senescentes o dañadas como los eritrocitos viejos que circulan a través del bazo, donde se da oportunidad a los macrófagos residentes para secuestrar dichas células y fagocitarlas, con el fin de retirarlas de la circulación (33). Se piensa que las irregularidades membranales de los eritrocitos, como también de las plaquetas y otros leucocitos, causadas por el tiempo en circulación o por daño celular, provocan una mayor unión de inmunoglobulinas circulantes (34); lo que provoca el reconocimiento de las fracciones Fc por parte de los receptores para Ig's que poseen los macrófagos en su superficie, favoreciendo con ello la fagocitosis de los mismos.

En procesos de *Curación, Reparación y Remodelación de Tejido* los macrófagos secretan dos proteínas, colagenasa y elastasa principalmente, que permiten la debridación del tejido dañado (35,36). Además producen sustancias que inducen la proliferación de fibroblastos y la neovascularización. (37)

Dentro de las actividades patológicas en que participan los macrófagos, se encuentran diversas *Enfermedades Autoinmunes* como consecuencia de la presentación de antígenos propios o bien de antígenos extraños en caso de que los epítomos que poseen presenten una reacción cruzada con antígenos propios. Esta presentación se lleva a cabo a través de las moléculas del MHC tipo II por parte de los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (APC) a células T CD4⁺ específicas; lo que desencadena una respuesta inmune en contra de moléculas propias del organismo en cuestión.

De las funciones más conocidas de los macrófagos se encuentra la *Destrucción de Microorganismos*, que ya se ha mencionado anteriormente, y que es una forma directa de la actividad protectora que cumplen estas células en la defensa del organismo en contra de agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y parásitos. La permanencia de los macrófagos que se observa en el foco infeccioso es debida al factor inhibitorio de migración liberado por las células T (38); lo que permite la fagocitosis del agente infeccioso para después destruirlo por mecanismos dependientes de oxígeno; permitiendo la producción y liberación de especies reactivas como iones superóxido entre otros (39), derivados del estallido respiratorio; e independientes de oxígeno, cuando existe acidificación del fagolisosoma que permite una actividad óptima de las enzimas hidrolíticas (40), provenientes de las vacuolas lisosomales, sobre el patógeno. Sin embargo, más adelante mencionaré el fenómeno inmunológico que se presenta durante el proceso inflamatorio crónico, donde ciertos patógenos logran escapar de la actividad microbicida de los macrófagos.

Inflamación Mediada Por Macrófagos

Bajo condiciones homeostáticas, la población de macrófagos en los tejidos es constante, lo que significa que el flujo de entrada de los monocitos desde la circulación periférica y la velocidad de producción local de macrófagos son iguales a la velocidad de desaparición de los mismos: se sabe que la población de macrófagos proviene mayoritariamente del influjo de monocitos en circulación, y que la producción local tiene una menor participación.(41)

Dichas cantidades basales de macrófagos se ven alteradas durante los procesos de inflamación aguda o crónica; ya que la cantidad de monocitos que migran desde la circulación aumenta a consecuencia del estímulo inflamatorio. En

la *inflamación aguda*, la mayor parte del incremento en el número de macrófagos en las primeras etapas es consecuencia del influjo de monocitos más que por la producción local (42). Durante la *inflamación crónica* se observan dos fenómenos inflamatorios dependiendo del agente causal de la inflamación; uno con formación de granulomas y el otro sin formación de estas estructuras. En el proceso de inflamación crónica simple, los macrófagos en el sitio de lesión son derivados de monocitos provenientes de la circulación por mecanismos de reclutamiento celular similares a la inflamación aguda. La formación de granulomas es provocada por aquellos agentes irritantes que no pueden ser eliminados por los macrófagos por contener material no digerible (43,44); dichas estructuras celulares están compuestas principalmente por células recién reclutadas de la circulación y por fagocitos mononucleares de división local. La característica más notoria es la presencia de células gigantes multinucleadas formadas por la fusión de monocitos jóvenes recién llegados de circulación con macrófagos viejos y no por división nuclear de estos últimos.(44)

2.4 ACTIVACIÓN DE LOS FAGOCITOS MONONUCLEARES

Los primeros hallazgos acerca de la activación de los macrófagos se obtuvieron al encontrar que dichas células adquirían resistencia en contra de ciertos parásitos intracelulares (45); y para que esto se llevara a cabo, eran necesarios ciertos eventos previos dependiendo de otras células como los linfocitos T. Posteriormente, se reconoció que existían diferentes habilidades celulares para responder a los estímulos derivados de las células T o del agresor, dependiendo de la célula a la cual se estaba estimulando. Esto se corroboró al observar que los macrófagos residentes en los tejidos eran relativamente resistentes para responder a la destrucción de células tumorales; sin embargo, fagocitos mononucleares inmaduros, extraídos de sitios de inflamación, eran capaces de responder a dichas señales; dando lugar a lo que se conoce como *Macrófagos de Respuesta*. Una vez que han sido capaces de responder, estas células pueden ser dirigidas hacia una función en particular por medio de otros inductores, estableciendo un estado celular de *Alerta* donde; una vez encontrado el estímulo que sea capaz de desencadenar dicha respuesta, las células se encontrarán en un estado *Completamente Activado* (45,46). Es importante hacer notar que el rumbo de la activación celular dependerá de una gama de estímulos a los que sean sometidos los fagocitos mononucleares y de la acción conjunta de dichos estímulos conforme al tiempo.

El análisis del desarrollo de la activación celular fue logrado gracias a la caracterización de estados de activación definidos por medio de marcadores (45); permitiendo clasificar a los macrófagos en los diferentes estados de desarrollo, como residentes, de respuesta, alerta y completamente activados. Tales estadios están relacionados con cambios muy notables en la expresión, ya sea aumento o

disminución, de diferentes proteínas de membrana y de secreción (45,47). También se observó que en muchos casos los cambios en la expresión de proteínas correlacionaba con cambios en la habilidad para ejecutar una función compleja; tal es el caso de la expresión de las moléculas clase II del MHC utilizadas por el macrófago para la presentación de antígenos a las células T, que se encuentran expresadas en mayor proporción en los macrófagos en estado de alerta que en aquéllos que se encuentran en los otros estados de activación mencionados anteriormente.

Podemos definir la activación de los macrófagos como la adquisición de capacidades para completar una determinada función (45) como: fagocitosis, procesamiento y presentación de antígenos, lisis de parásitos intracelulares, destrucción de células tumorales, entre otras. Dicha capacidades dependen de los atributos que posea el macrófago como características específicas de la composición celular y del metabolismo; y representan, a nivel intracelular, la expresión génica de moléculas reguladas independientemente; mientras que las funciones representan el resultado final de la interacción de dichas moléculas. (48)

Se considera que el estado fisiológico de los macrófagos es el permanecer relativamente inactivos en los tejidos hasta tener contacto con la señal apropiada para inducir la activación; por lo que deben tomarse en cuenta como células que pueden ser moduladas en los tejidos en un gran número de formas y; una vez que han sido activados, el cese de la señal inductiva más la aplicación de señales supresivas regresa las células al estado basal.(48)

Se ha establecido que el aumento o disminución en la expresión de proteínas refleja alteraciones en niveles de mRNA específico, que en ocasiones es resultado de alteraciones en la transcripción del gen en cuestión. Estas alteraciones en la transcripción son a menudo mediadas por la acción de segundos mensajeros sobre proteínas específicas, modificando su estructura o permitiendo la unión eficaz de factores de transcripción a las regiones regulatorias de los genes que controlan. (48)

Las diferentes vías a las que puede dirigirse el proceso de activación de macrófagos, una vez que han sido estimulados por receptores que se expresan en la superficie membranal, inician respuestas cronológicamente diferentes: respuestas tempranas (0-5 min.), que se refieren por lo general a eventos que se llevan a cabo cerca de la membrana celular; respuestas intermedias (5 min-4 h), que son resultado de segundos mensajeros obtenidos de la respuesta temprana; y respuestas tardías (4-24 h), que refieren a eventos que requieren un lapso mayor para llevarse a cabo como, la transcripción y traducción de genes. Al igual que en otros sistemas de internalización de señales, la cascada de señalización en conjunto provocará la alteración del estado basal del macrófago para entrar en un estado de activación. (49)

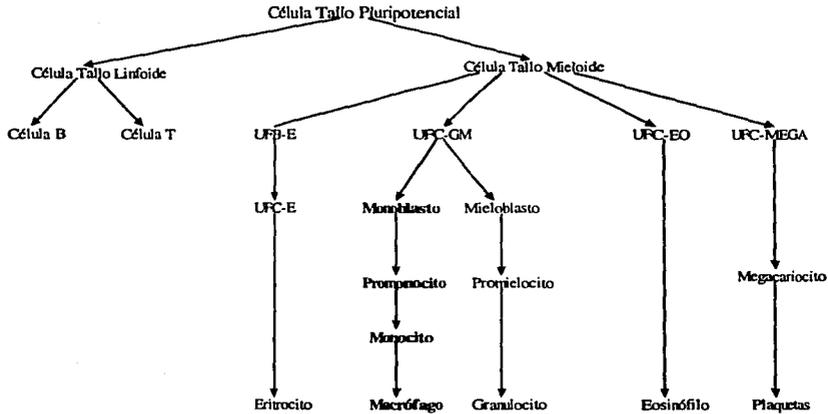
2.5 DIFERENCIACIÓN

Relación de la Activación con el Estado de Diferenciación Celular del Macrófago

La distribución en los diversos tejidos y el amplio espectro de funciones homeostáticas y de defensa que llevan a cabo los fagocitos mononucleares es muy compleja, habiéndose observado una diversidad funcional entre células del mismo tejido y entre poblaciones celulares de diferentes tejidos. Dichas diferencias reflejan en realidad los distintos tipos o estados de activación-diferenciación en el que se encuentran que puede ser resultado del tiempo de residencia de las células en el tejido, ausencia de sincronía para responder a la estimulación; o variaciones en la distribución y cantidad del estímulo (inductivo o supresivo) presentes en el tejido. Por lo tanto la respuesta está condicionada por las características del microambiente.(50,51,52)

La diversidad concerniente a la regulación de la expresión génica en los macrófagos, puede considerarse como resultado de dos fuentes: a) complejidad en el ambiente extracelular y b) complejidad en el ambiente intracelular de los macrófagos; es decir, los procesos moleculares a través de los cuales la célula responde ante un estímulo externo, que dependerán de manera importante del estado de diferenciación en el que se encuentre. Es de igual interés el hecho que cuando un estímulo induce la expresión de un gen, el mecanismo de señalización intracelular es específico; implicando que aún cuando diferentes estímulos regulen la expresión de un gen determinado, establecerán rutas de señalización intracelulares con mecanismos muy diferentes para lograrlo.

Como mencionamos anteriormente, respecto al origen de las células del sistema fagocítico mononuclear, el proceso de diferenciación celular que llevan a cabo estas células, para dar lugar a células con fenotipos definidos, podemos ilustrarlo como sigue (14) *Fig. 1:*



En ausencia de algún foco inflamatorio, los monocitos migran al azar a los diferentes tejidos, donde finalmente se diferencian en macrófagos con características morfológicas y en algunos casos funcionales típicas para el tejido en el que se localizan. Esta diferenciación terminal específica del tejido es el resultado de estímulos también específicos que otorgan al macrófago un fenotipo único.

El proceso de diferenciación de las células sanguíneas, en el que un cierto número de células tallo dan lugar a diferentes células progenitoras de linaje específico, que a su vez proliferan y diferencian para producir diversas clases de células en circulación, es posible gracias a la acción de una familia de factores hormonales glicoproteínicos de crecimiento. En este grupo se incluyen factores estimuladores de colonias, interleucinas, interferones y eritropoyetina. Sin embargo, existen otros compuestos biológicos cuya acción se limita más estrictamente a la diferenciación y activación del macrófago, tales como la 1,25 (OH)₂ Vitamina D₃, IFN- γ y TNF (14,50).

Conjuntamente a la complejidad y diversidad de la respuesta que puedan expresar las células del sistema fagocítico mononuclear, el proceso de diferenciación monocito-macrófago no se considera un fenómeno que transcurra en un solo paso y tampoco que establezca una vía única para lograrlo. Antes bien, se reconoce que de la acción de distintos agentes inductores (estímulos), se obtiene como resultado una amplia variedad de posibles fenotipos celulares, que difieren no sólo en las características morfológicas y tintoriales sino, como mencionamos con

anterioridad, en la expresión de diversos receptores, expresión y secreción de proteínas y capacidad para llevar a cabo la gran diversidad de funciones efectoras.

Entre los cambios fenotípicos que se presentan en las células fagocíticas mononucleares, se incluyen una gran diversidad de modificaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales. Dichas funciones podemos resumirlas como (14):

- Actividad Microbicida
- Actividad Tumoricida
- Quimiotaxis
- Fagocitosis
- Pinocitosis
- Presentación de Antígenos
- Secreción:
 - Especies reactivas de oxígeno
 - Hormonas polipeptídicas
 - Hormonas esteroideas
 - Componentes del complemento
 - Factores de coagulación y otras enzimas
 - Proteínas de la matriz extracelular
 - Proteínas de unión
 - Lípidos bioactivos
- Estallido Respiratorio
- Funciones modeladoras en diferentes tejidos.

Las modificaciones que se lleven a cabo durante el proceso de diferenciación fagocítica, estarán íntimamente relacionadas con la inducción o inhibición de la expresión de los genes responsables de funciones específicas.

Modelos Celulares de Diferenciación

Una limitación seria para estudiar el proceso de diferenciación/activación de los fagocitos mononucleares son las bajas cantidades de células que pueden obtenerse de sangre periférica. Además las poblaciones obtenidas pueden ser mezclas de células en distintos estadios de diferenciación/activación. Para solventar estas limitaciones, se han usado diversas líneas celulares provenientes de leucemias humanas que han sufrido un bloqueo en diferentes etapas del proceso de diferenciación; y que pueden además ser inducidas a diferenciarse en macrófagos por diversos estímulos *in vitro*. Estas líneas celulares permiten el estudio de grupos de células relativamente homogéneas a lo largo de los diferentes estados de maduración y diferenciación. Las líneas celulares mononucleares que se han empleado con mayor frecuencia son: THP-1, U-937, KG1 y HL-60. Las dos primeras se encuentran en la etapa promonocítica, con un potencial de diferenciación hacia las etapas monocítica y macrófaga; mientras que las dos últimas pertenecen al estado blástico, un estado de diferenciación más inmaduro y

por tanto con un potencial de diferenciación hacia el estado final de macrófago o, si se trata de las células HL-60, pueden también diferenciarse como células granulocíticas.(14)

En nuestro estudio, empleamos las líneas celulares THP-1 y U-937; por lo que me concretaré en lo posterior exclusivamente a estas células.

Inductores de Diferenciación Celular

Las líneas celulares mencionadas anteriormente, pueden ser estimuladas por diferentes inductores para entrar en etapas de diferenciación posteriores; tal es el caso de los ésteres de forbol, dentro de los cuales el más empleado es el Aceto-Miristato de Forbol (PMA); interferón gamma (IFN- γ), que es un inductor que también se encuentra en forma natural; 1- α ,25-hidroxi vitamina D₃ (VD₃), que semeja al componente natural 1,25 (OH)₂D₃; ácido retinóico (RA) y el dimetil sulfóxido (DMSO) entre otros (14).

Con el fin de conocer acerca de la acción de los inductores mencionados en las células fagocíticas, enunciaré algunas de las características más reconocidas de éstos como: estructura, mecanismos de internalización de señales, efectos biológicos producidos en las células u organismos por la exposición a estas sustancias *in vivo* y efectos *in vitro* en células del sistema fagocítico mononuclear por el tratamiento con los inductores de diferenciación mencionados.

Características de Inductores de Diferenciación

Vitamina D₃ (colecalfiferol). La vitamina D es un grupo de hormonas derivadas del colesterol que se encuentran naturalmente en el organismo y están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis del Ca²⁺, actuando de manera sinérgica con la hormona paratiroidea para incrementar la concentración sérica de este catión. Las vitaminas D₂ y D₃ son hormonalmente inactivas *per sé*, por lo que deben ser metabólicamente procesadas para adquirir su actividad biológica.

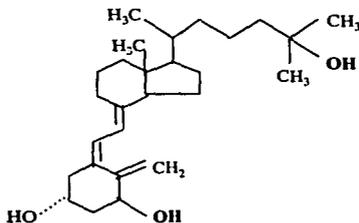


Fig. 2. 1 α ,25-Dihidroxicolecalciferol [1,25(OH)₂D] - Forma Activa

La acción de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es la de incrementar los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]$ en suero al permitir la absorción del Ca^{2+} consumido en la dieta y estimular la liberación de Ca^{2+} del hueso (53). La vitamina D activa se une a la forma citoplásmica del receptor no esteroideo, seguido por un cambio conformacional del complejo (etapa de activación) que da lugar a la traslocación intranuclear y la consecuente unión a la cromatina (57). Una vez en el núcleo funciona como factor de transcripción para la proteína de unión a Ca^{2+} (53). Además, la $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 muestra la capacidad de inducir a las células monocíticas para entrar en un proceso de diferenciación (65) y de modificar la capacidad antibacterial de las mismas (66).

Aceto-miristato de forbol (PMA). El PMA es un éster de forbol que estructuralmente semejante al diacilglicerol (DAG), activando a la proteína cinasa C (PKC), la cual en presencia de Ca^{2+} , fosforilará a otras proteínas que producirán una respuesta celular de manera similar a cuando se activa la PKC cuando interacciona con el DAG. (53, 64)

Los ésteres de forbol son los agentes promotores de tumores más efectivos que se conocen; éstos no son carcinogénicos por sí mismos pero incrementan la potencia de los carcinógenos. (53)

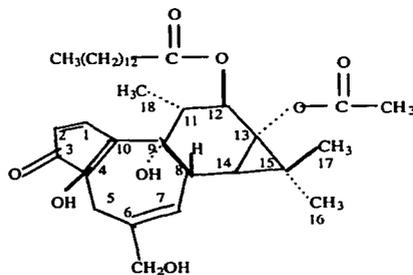


Fig. 3. Aceto miristato de forbol

Acido Retinóico all-Trans (RA). El ácido retinóico (Fig.4), un derivado de la vitamina A (retinol), se ha conceptualizado como morfógeno debido a que se ha encontrado que tiene una distribución ordenada en el desarrollo de las extremidades del pollo. En otros animales, como los ratones, se ha observado que después de una administración sistemática de RA durante la embriogénesis aparecen severas malformaciones, sobre todo del sistema óseo. (59)

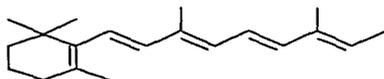


Fig. 4. **Acido retinóico all-trans**

El receptor para el RA pertenece al grupo de receptores clase II de la superfamilia de receptores nucleares. Una vez que el RA se ha unido a su receptor, éste forma un heterodímero con otro receptor de la sub-familia RXR (Fig.5), que tiene un dominio de reconocimiento de la hormona y un dominio de unión a DNA, el cual incluye una zona altamente conservada compuesta de dos dedos de zinc, que permite la unión específica de dichos receptores. (58)

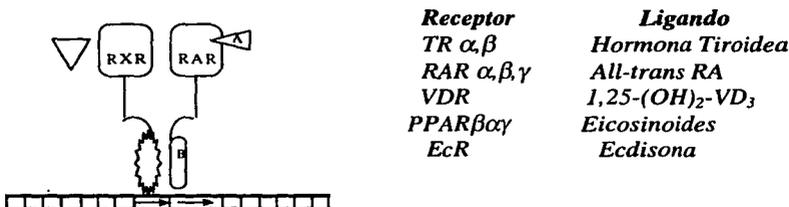


Fig. 5 . Receptor nuclear heterodimérico del ácido retinóico. A: Ligando, B: Dominio de unión al DNA. *Adaptada de Ref. 58.*

Interferón- gamma (IFN-γ). El interferón tipo γ pertenece a un grupo de glicoproteínas secretadas por células de organismos vertebrados infectadas por virus. A consecuencia de la unión a receptores de superficie de otras células, los interferones transforman tanto a las células infectadas como a las no infectadas a un estado en el cual se inhibe la replicación de una amplia variedad de virus (DNA o RNA).

El IFN-γ, producido principalmente por los linfocitos, además de prevenir la proliferación viral por la inhibición de la síntesis proteica en células infectadas, también modula la respuesta inmunológica (54). Es además importante aclarar que la acción ejercida por el IFN-γ sobre las células es específica de especie.

El modelo de señalización que siguen las células después de entrar en contacto con el IFN-γ se esquematiza en la fig.6 (56):

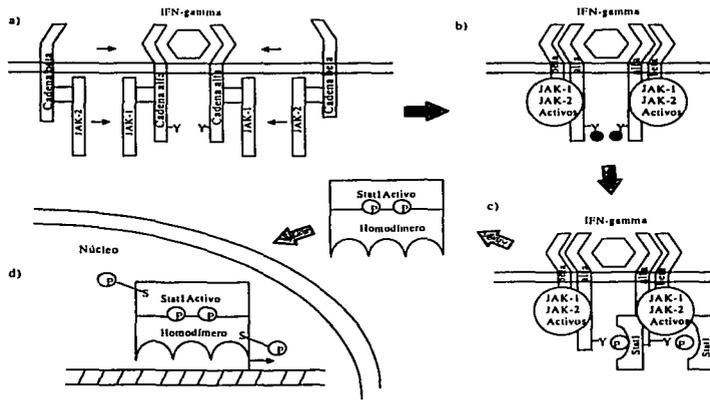


Fig. 6. Modelo de señalización del IFN- γ . a) Acoplamiento del complejo Receptor-IFN- γ . b) Activación de JAK y formación del sitio de unión para Stat1. c) Reclutamiento de Stat1, activación y formación del homodímero. d) Fosforilación en residuos de serina del homodímero Stat1, translocación al núcleo e inicio de la transcripción de genes. *Adaptado de referencia (55).*

Efectos Producidos por los Inductores durante el Proceso de Diferenciación en Modelos Celulares *in vitro*

Los inductores mencionados anteriormente se han utilizado, entre otras aplicaciones, para estudiar el proceso de diferenciación de las células del sistema fagocítico mononuclear usando como modelo a líneas celulares, como las células THP-1 y U-937. Estos modelos de diferenciación/señalización *in vitro* han permitido caracterizar algunos de los cambios producidos durante la maduración celular.

Se ha observado que el tratamiento con ciertos inductores de diferenciación en líneas celulares monocíticas, produce un efecto diferente y de magnitud distinta sobre la morfología, expresión de receptores y funciones que desempeñan las células de una misma línea celular, dependiendo del inductor utilizado. (14)

El PMA induce a las células THP-1 y U-937 a diferenciarse hacia macrófagos. Las primeras disminuyen dramáticamente la proliferación celular y sufren una drástica alteración en su morfología (60,65); las segundas, también disminuyen su proliferación cambian su morfología pero de forma menos drástica que las células THP-1.

Después de iniciado el proceso de diferenciación, las células THP-1 adquieren una gran variedad de formas; el núcleo adquiere formas más irregulares y pueden reconocerse varias vacuolas fagocíticas en el citoplasma. Este proceso de diferenciación está asociado con un incremento en la adherencia a superficies de plástico tratadas para cultivos celulares. (60)

Entre las funciones efectoras que se han observado alteradas después del tratamiento con PMA en las células THP-1 se encuentran: aumento en la fagocitosis de microesferas de látex; aumento en la liberación de iones superóxido, medido por la reducción de citocromo c; aumento en la producción de citocinas y otros mediadores del proceso inflamatorio como factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) y Prostaglandina E_2 (PGE_2) entre otros. (51)

Se ha reportado que el tratamiento con RA (**all-trans**) induce la diferenciación de células promielocíticas provenientes de una leucemia promielocítica aguda (LPA) (61). La diferenciación de las líneas THP-1, HL-60 y KG-1 resultó en la obtención de poblaciones celulares diferentes en distintos estadios de maduración en cada una de las líneas celulares mencionadas. Dichas poblaciones se caracterizaron por tinciones Wright-Giemsa, y por técnicas inmunoquímicas y la determinación de la expresión de marcadores celulares (62). Los cambios morfológicos observados se acompañaron de cambios en las funciones biológico-efectoras de las células, tales como disminución en la reducción de NBT en las células THP-1 y KG-1 tratadas con RA (62); y aumento o disminución en la expresión de la NADPH oxidasa en células NB4, provenientes de una leucemia promielocítica aguda (63)

La VD_3 en su forma activa induce a las células monocíticas a entrar en un proceso de diferenciación celular, provocando diversos cambios morfológicos y funcionales. Morfológicamente, las células THP-1 adquieren estructuras irregulares semejantes a macrófagos. La velocidad de proliferación disminuye ligeramente con respecto al control después del tratamiento con VD_3 (51).

Los cambios funcionales se ven acompañados por cambios en la expresión de proteínas membranales o del citosol, las cuales pueden ser liberadas al exterior ante ciertos estímulos. Tal es el caso de la expresión de citocinas en las células U-937, que después del tratamiento con VD_3 y ser estimuladas con lipopolisacáridos bacterianos (LPS) aumentan considerablemente la expresión de $\text{IL-1}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$ (67). En las células THP-1 también aumenta la liberación de $\text{TNF-}\alpha$ pero solo bajo la presencia de LPS; ya que la VD_3 *per sé* no provoca aumento en la producción de citocinas. Contrariamente al tratamiento con PMA, no induce la liberación de otras sustancias mediadoras del proceso de inflamación como la PGE_2 (51). En las células NB4, el tratamiento con VD_3 no provoca un aumento en la

expresión de la NADPH oxidasa.(63)

Entre los marcadores membranales que aumentan su expresión después del tratamiento con la VD₃ en las células THP-1 se encuentran: CD11b, CD14 (50,51) que son expresados en monocitos maduros. Las funciones efectoras como la fagocitosis aumenta después de 72 h de tratamiento (51), se incrementa la respuesta de células THP-1 hacia células T activadas (50), la liberación de iones superóxido también aumenta en respuesta al tratamiento.

El tratamiento con IFN- γ induce cambios en la expresión de glicoproteínas de superficie en las células THP-1, como los antígenos HLA-DR y CD54 (implicadas en el contacto célula-célula) y la liberación de citocinas como IL-6, TNF- α , IL-1 β (69); en las células U-937, el IFN- γ es un potente inductor del Fc ϵ RII e induce un aumento de la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgE por medio de este receptor (68).

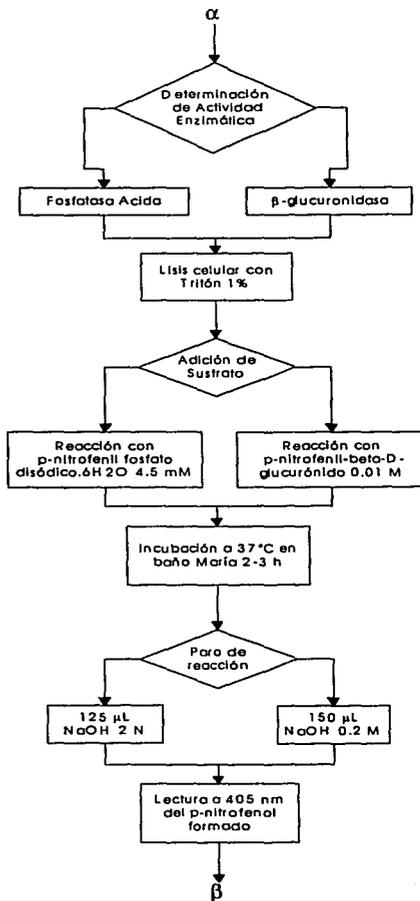
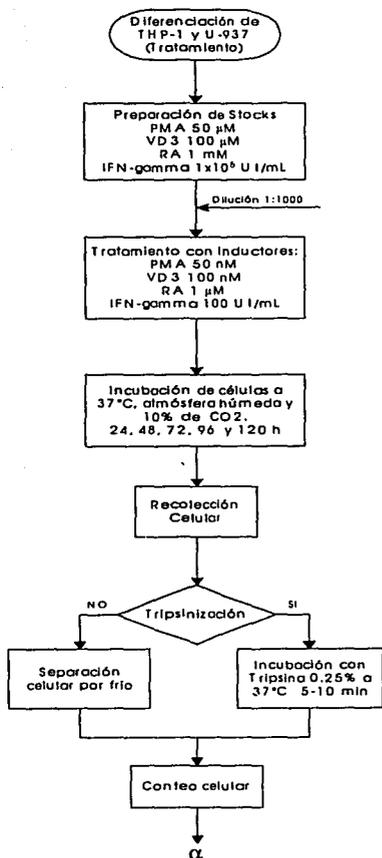
De forma similar a la acción ejercida por la VD₃, la exposición previa de las células U-937 a IFN- γ , provoca un aumento en la liberación de IL-6, TNF- α e IL-1 β al ser estimulados con LPS (70).

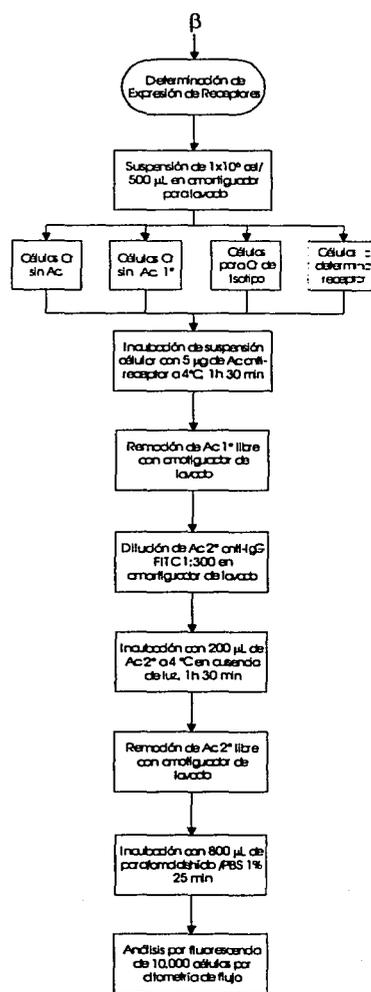
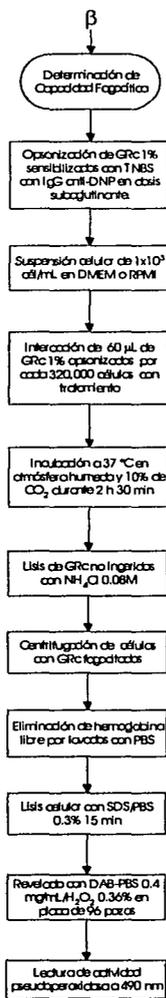
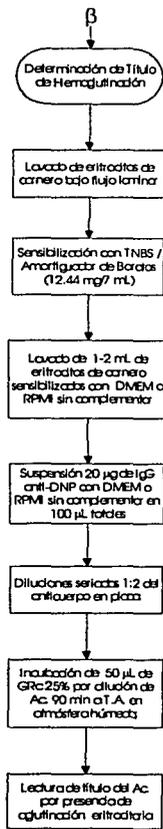
Existen otro tipo de inductores que permiten a las células monocíticas entrar en un proceso de diferenciación, cuya acción provoca la presencia de poblaciones celulares diferentes entre sí, como el Dimetilsulfóxido (DMSO) (72) y la IL-6 (71) entre otros.

CAPITULO 3

MATERIALES Y METODOS

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO





3.2 GLOSARIO

Abreviatura	Descripción
Anti-DNP	Anti-Dinitro Fenol
Cr	Control, referido a células y ensayos control
DAB	Diamino Bencidina
DGVB	Buffer de Dextrosa Gelatina y Veronal
DMEM	Medio Esencial Mínimo
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Acido Etilen-Diamin Tetracético
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Enzimática (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)
FITC	Fluoresceín Isotiocianato
γ-IFN	Interferón gamma
PBS	Solución de Amortiguador de Fosfatos
PMA	Acetomiristato de Forbol (Phorbol Miristate Acetate)
RA	Acido Retinóico (Retinol)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
TNBS	Acido Trinitrobenzen Sulfónico (Trinitrobenzene Sulfonic Acid)
TPA	Tetradecanoil Acetato de Forbol (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)
VD3	1-alfa 3-hidroxi Vitamina D3 (Colecalciferol)

3.3 PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN *in vitro* DE CÉLULAS MIELOMONOCÍTICAS U-937 Y THP-1

Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

Medio de cultivo DMEM o RPMI complementado SFB 10%

Inductores de diferenciación

Aceto-miristato de forbol	(PMA) (Sigma P8139) 5 mg.
1- α ,2-hidroxi vitamina D ₃	(VD3) (Calbiochem 679102) 50 μ g.
All- trans-ácido retinóico	(RA) (Calbiochem 554720) 500 mg.
Interferon gamma humano	(γ -IFN) (Gibco P1585)

SOLUCIONES STOCK DE INDUCTORES DE DIFERENCIACIÓN.

Para poder utilizar los diferentes inductores de diferenciación en la concentración adecuada, es conveniente preparar soluciones stock que permitan la obtención de volúmenes más exactos de manera sencilla para el tratamiento.

STOCKS 1000X (Apéndice II)

Aceto-miristato de forbol	(PMA) 50 μ M
1- α ,2-hidroxi vitamina D ₃	(VD3) 100 μ M
All- trans-ácido retinóico	(RA) 1 mM
Interferon gamma humano	(γ -IFN) 1x10 ⁵ U/ml

Estas soluciones se diluyen 1:1000 directamente en el volumen de medio de cultivo DMEM o RPMI complementado con 10 % de SFB en el que se van a resuspender las células para el tratamiento. Las concentraciones finales serán las siguientes:

PMA	50 nM
VD3	100 nM
RA	1 μ M
IFN- γ	100 U/ml

METODOLOGÍA

1.- Cosechar las células de botellas de cultivo. Contar las células y resuspenderlas en medio de cultivo fresco ($2-3 \times 10^6$ cels/10 mL medio).

2.- Si se requiere que el tratamiento premanezca por más de 48 horas, se pueden agregar 20 mL en lugar de 10 mL, con la precaución de revisar tanto las células en tratamiento como las control y considerar si requieren o no cambio de medio de cultivo DMEM o RPMI complementado después de este tiempo.

3.- Colocar la suspensión celular en cajas Petri para cultivo celular del tamaño adecuado para la cantidad de células a incubar, designando al menos una caja por cada tiempo de cada tratamiento:

- | | |
|----------------------------------|-------------------------------|
| a) 1 - 1.5×10^6 células | En cajas de 5 cm de diámetro |
| b) 1.5 - 5×10^6 células | En cajas de 12 cm de diámetro |
| c) 5 - 10×10^6 células | En cajas de 20 cm de diámetro |

4.- Incubar las cajas en la incubadora húmeda con atmósfera de 10 % de CO_2 a 37 °C por 24, 48, 72, 96 y 120 h.

5.- El cambio de medio de cultivo puede realizarse de dos formas según convenga más a las condiciones del tratamiento:

a) Retirar la mitad del medio de cultivo de la caja - con células inclusive - y colocar la misma cantidad de medio de cultivo complementado nuevo, considerando únicamente el volumen añadido de medio para determinar la cantidad del respectivo tratamiento a agregar.

b) Retirar toda la suspensión celular y centrifugar a 1500 rpm por 5 min, retirar todo el medio por inversión o succión y deshacer el pellet suavemente. Colocar medio de cultivo complementado nuevo, tomando en cuenta la densidad celular, con la cantidad considerada del respectivo tratamiento según el volumen total.

6.- Incubar nuevamente las cajas en la incubadora húmeda con atmósfera del 10 % de CO_2 a 37 °C por el tiempo restante de tratamiento.

Es recomendable que a las células U-937 se les cambie el medio a las 48 h, debido a que se dividen con rapidez y hay producción considerable de restos celulares en el medio de cultivo, lo que puede ser nocivo para las mismas. Las células THP-1, pueden permanecer con el medio hasta 72 h como máximo, ya que aunque su crecimiento es más lento en comparación con el de las células U-937, poseen un metabolismo elevado que provoca un incremento en la acidez del medio de cultivo, lo que es perjudicial para la vida de las células. Es necesario aún después del primer cambio de medio de cultivo considerar cambios posteriores según el crecimiento y metabolismo celular.

Dependerá del tiempo que dure el tratamiento, de la densidad celular y de las características microscópicas que tengan las células, el posible cambio de las células en tratamiento de una caja Petri para cultivo celular a otra de mayor tamaño.

3.4 RECOLECCIÓN DE CÉLULAS THP-1 Y U-937 DESPUÉS DE TRATAMIENTO

Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

Medio de cultivo DMEM o RPMI complementado SFB 10%

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Tripsina 0.25%- EDTA en Hank's

METODOLOGÍA

1.- Transcurrido el tiempo de incubación de las células con el tratamiento indicado, observar en el microscopio invertido la presencia o ausencia de adhesión celular en las cajas Petri de cultivo celular.

2.- Si hay presencia de adhesión celular a la superficie de cultivo, determinar el grado de la misma para evaluar la necesidad de utilizar Tripsina 0.25% o no.

SIN TRIPSINIZACIÓN

3.- Resuspender suavemente las células con el sobrenadante original, realizando los lavados necesarios con PBS frío para recuperar la mayor cantidad posible de células. Recolectar tanto el sobrenadante original como los lavados en un mismo tubo de centrifuga de 50 mL.

4.- Realizar el conteo de células totales directamente, o centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 5 minutos y retirar el sobrenadante por vacío. Resuspender el pellet en un volumen conocido de medio de cultivo complementado y contar las células.

TRIPSINIZACIÓN

5.- Colocar el sobrenadante de las células en tratamiento en un tubo para centrifuga de 50 mL, procurando resuspender aquellas células que no se encuentren fuertemente adheridas con ayuda de una pipeta Pasteur.

6.- Realizar un lavado mínimo con 10, 20 ó 30 mL de PBS frío, según el tamaño de la caja Petri, para retirar todo el medio de cultivo complementado posible; vaciando nuevamente el sobrenadante en el tubo donde se encuentra el sobrenadante original.

7.- Colocar un volumen de la solución de tripsina al 0.25% suficiente para formar una capa delgada que cubra toda la superficie de la caja de cultivo.

8.- Incubar la caja de cultivo con tapa de 5 a 10 minutos máximo, a 37 °C y 10% de CO₂ inmediatamente después de colocar la tripsina.

9.- Agregar el doble de medio de cultivo complementado con 10 % de SFB a la caja de cultivo para detener la acción de la tripsina. Resuspender con el sobrenadante para recuperar la mayor cantidad de células adheridas. Vaciar dicha suspensión en el tubo donde se encuentra el sobrenadante original.

10.- Centrifugar a 1,500 r.p.m. durante 5 minutos y retirar el sobrenadante por vacío.

11.- Descompactar el botón celular y resuspender las células en una cantidad conocida de medio DMEM o RPMI complementado para el conteo celular.

CONTEO CELULAR

1.- Resuspender perfectamente el botón celular. Colocar una pequeña gota en las dos aberturas de la cámara de Neubauer , resuspendiendo antes de cada una, para realizar el conteo por duplicado.

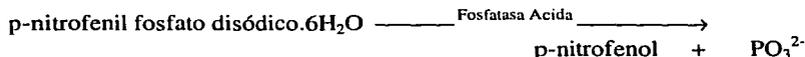
2.- La cuenta de ambas no debe tener una diferencia mayor de 4 a 6 células según la densidad celular, y no deben existir más de 150 células en el campo para disminuir al máximo el error.

3.- Si la densidad celular fuera mayor a la mencionada anteriormente, diluir la suspensión con la cantidad de medio de cultivo necesario para una densidad celular menor y volver a realizar el conteo celular.

3.5 DETERMINACIÓN DE FOSFATASA ACIDA EN EXTRACTOS CELULARES

PRINCIPIO

La fosfatasa ácida es una enzima que se encuentra en los lisosomas cuya actividad es hidrolizar los ésteres de fosfato en un medio ácido. La reacción que se lleva a cabo en el microensayo es la siguiente:



Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

Amortiguador de acetatos pH 4.5 (Tritón 0.05%) para fosfatasa ácida

Amortiguador de Lisis Tritón 1 % en agua

Hidróxido de sodio 2 N

p-nitrofenil fosfato disódico $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.5 mM en amortiguador de acetatos.

METODOLOGÍA

1.- Se lisan las células con Tritón al 1% a una concentración de 3×10^6 cels/mL por 15 min. Mantener en hielo.

2.- En placas de ELISA de 96 pozos colocar en cada pozo y por triplicado:

25 μL del lisado celular del tratamiento empleado.

100 μL de p-nitrofenil fosfato disódico $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.5 mM.

Considerar como blanco 25 μL del amortiguador de lisis (Tritón 1%) por triplicado en lugar del lisado celular.

3.- Incubar a 37 °C en baño María durante 90 min.

4.- Detener la reacción con 125 μL de NaOH 2 N en cada uno de los pozos.

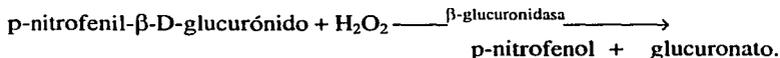
5.- Leer la absorbancia en el lector de ELISA a 405 nm.

Interpretación: La absorbancia indica la producción de p-nitrofenol y es proporcional a la actividad de la fosfatasa ácida.

3.6 DETERMINACIÓN DE β -GLUCURONIDASA EN EXTRACTOS CELULARES

PRINCIPIO

La β -glucuronidasa es una enzima que se encuentra en los lisosomas, es una exoglicosidasa que hidroliza el monosacárido correspondiente del extremo terminal no reductor de los oligosacáridos. La reacción que se lleva a cabo en el microensayo es la siguiente:



Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

Amortiguador de acetatos pH 4.5 (Ac. Acético 0.1M, Tritón 0.05%) para β -glucuronidasa.

Amortiguador de Lisis Tritón 1 % en agua

Hidróxido de sodio 0.2 M

p-nitrofenil- β -D-glucurónido 0.01 M en agua.

METODOLOGÍA

1.- Se lisan las células con Tritón al 1% a una concentración de 3×10^6 ó 4×10^6 cels/mL (según el esquema empleado) por 15 min. Mantener en hielo.

- 2.- En placas de ELISA de 96 pozos colocar en cada uno y por triplicado:
- 45 μ L del lisado celular del tratamiento empleado (equivalente a 135,000 ó 180,000 cels).
 - 90 μ L de amortiguador de acetatos (1)
 - 15 μ L de p-nitrofenil- β -D-glucurónido 0.01 M

Considerar como blanco 45 μ L del amortiguador de lisis (Tritón 1%) por triplicado en lugar del lisado celular.

3.- Incubar a 37 °C en baño María durante 2 - 3 h.

4.- Agregar 150 μ L de NaOH 0.2 M en cada uno de los pozos para detener la reacción. Leer densidad óptica a 405 nm en el lector de ELISA.

Interpretación: La absorbancia indica la producción de p-nitrofenol y es proporcional a la actividad de la β -glucuronidasa.

3.7 HEMAGLUTINACIÓN

PRINCIPIO

Al reaccionar anticuerpos dirigidos contra algún antígeno que se localice en la superficie membranal de los eritrocitos, se induce la formación de una malla celular. Esta es ocasionada por aglutinación de los eritrocitos debida a la interacción antígeno-anticuerpo, hasta un punto en que la concentración de anticuerpo es tan baja que no existen suficientes moléculas para formar la malla. El título de hemaglutinación se define como la concentración más baja de anticuerpo capaz de provocar la aglutinación de los eritrocitos de prueba.

Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

Solución de Alsever estéril.

Solución DGVB estéril.

Amortiguador de boratos, pH 8.5

Solución de TNBS/ Amortiguador de boratos 12.44 mg/7 mL.

Medio DMEM sin complementar.

Medio RPMI sin complementar.

Anticuerpo(s) anti-DNP.

Eritrocitos de carnero (GRc).

ALMACENAMIENTO DE ERITROCITOS

Realizar en la campana de flujo laminar:

- 1.- Vaciar los eritrocitos del frasco original a un frasco estéril de 100 mL.
- 2.- Agregar un volumen igual de solución de Alsever estéril al frasco original de eritrocitos, con el fin de lavar el frasco, y vaciarlo al resto de los eritrocitos para obtener una dilución 1:2.
- 3.- Los GRc se pueden conservar así diluidos y en refrigeración hasta por 4 semanas.

SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS DE CARNERO

LAVADO DE ERITROCITOS

1.- En esterilidad, utilizar aproximadamente 15 mL de la suspensión de globulos rojos de carnero (GRc) en solución de Alsever, previamente resuspendidos; y colocarlos en un tubo para centrifuga de 50 mL.

2.- Llevar a un volumen de 40 mL con DGVB estéril y resuspender suavemente los eritrocitos.

3.- Centrifugar la suspensión a 3000 r.p.m. y 4 °C durante 12 min.

4.- Retirar el sobrenadante por decantación cuidando de no perder el botón celular. Resuspender el sobrenadante que quede para deshacer fácilmente el botón celular.

5.- Repetir los pasos 2 - 4 hasta que el sobrenadante permanezca transparente.

6.- Lavar con Amortiguador de Boratos una sola vez, llevando hasta un volumen de 40 mL y resuspender nuevamente.

7.- Centrifugar a 3000 r.p.m. y 4 °C durante 12 min.

8.- Antes de retirar el sobrenadante medir aproximadamente el volumen que se obtuvo de pellet para establecer posteriormente las cantidades de TNBS a utilizar en la sensibilización. Descompactar el botón celular en el volumen remanente de Amortiguador.

SENSIBILIZACIÓN

9.- Preparar una solución de 12.44 mg de TNBS y 7 mL de amortiguador por cada mL de pellet de GRc obtenido.

10.- Agregar la solución anterior a los eritrocitos e incubar durante 10 min a temperatura ambiente en agitación suave constante y protegido de la luz, cuidando de no exceder el tiempo de incubación.

11.- Agregar a los eritrocitos ya sensibilizados, un volumen de DGVB estéril igual al que se agregó de la solución de TNBS. Resuspender suave y rápidamente.

12.- Centrifugar a 3000 r.p.m. y 4 °C durante 12 min.

13.- Retirar el sobrenadante y descompactar el botón celular en el volumen remanente de buffer.

14.- Repetir los pasos 2 - 4 hasta que el sobrenadante permanezca transparente.

15.- Mantener los eritrocitos en 40 mL de DGVB estéril y protegidos de la luz para almacenamiento.

Los eritrocitos sensibilizados permanecen en óptimas condiciones durante una semana únicamente.

DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE HEMAGLUTINACIÓN

LAVADO DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS

1.-Tomar el volumen necesario de eritrocitos sensibilizados para el ensayo a realizar en un tubo eppendorf de 1 ó 2 mL . Lavar los eritrocitos con medio DMEM o RPMI *sin complementar* 2 veces (o hasta que el medio permanezca transparente o limpio) retirando el sobrenadante con pipeta Pasteur.

2.-Tomar del pellet el volumen necesario para tener una suspensión de GRc al 2% en el volumen requerido de medio DMEM o RPMI sin complementar en tubos de 15 mL.

DILUCIONES DEL ANTICUERPO

3.- Utilizar una o varias placas de 96 pozos de fondo en V según el número de anticuerpos anti-DNP a probar.

4.- En el primer pozo colocar 100 µl de medio DMEM o RPMI sin complementar y en los pozos restantes de la fila 50 µl .

5.- Calcular el volumen (en µL) de solución de anticuerpo que contenga 20 µg del anticuerpo:

$$20 \mu\text{g} / \text{Concentración de Anticuerpo} (\mu\text{g} / \mu\text{L}) = X \mu\text{L de Ab}$$

6.- Retirar del primer pozo (que contiene 100µl) el volumen equivalente a los 20 µg del Ab (paso 5); y sustituirlo por el volumen conteniendo los 20 µg de Ab.

7.- Mezclar muy bien el anticuerpo en los 100µl. Retirar 50µl del 1er pozo y pasarlos al 2º pozo. Resuspender bien nuevamente y retirar 50µl del 2º pozo, pasarlos al 3º y así sucesivamente, hasta realizar las diluciones deseadas. Las diluciones sucesivas serán por tanto 1:2.

8.- Realizar las diluciones por duplicado.

9.- Colocar una fila para el control negativo que contenga únicamente 50µl de medio DMEM o RPMI sin complementar.

10.- Agregar 50 µl de los eritrocitos al 2% (paso 2) a cada uno de los pozos.

11.- Incubar la placa a T.A. en atmósfera húmeda (Baño o recipiente con toalla húmeda) 90 min o hasta que se forme el botón de eritrocitos en el Cr.

12.- El título de hemaglutinación será la concentración de anticuerpo en el último pozo en el que se presente la malla eritrocitaria (aglutinación).

3.8 DETERMINACIÓN DE FAGOCITOSIS DE ERITROCITOS DE CARNERO

PRINCIPIO

La cantidad de eritrocitos ingeridos por la célula fagocítica se cuantifica mediante la actividad de pseudo-peroxidasa de la hemoglobina.

La hemoglobina posee actividad de pseudo-peroxidasa por lo que, al interaccionar la hemoglobina de los eritrocitos ingeridos por los fagocitos con H_2O_2 en presencia de diaminobencidina (DAB), se produce una reacción de reducción-oxidación, donde al reducirse el peróxido de hidrógeno se liberan iones O^- que oxidan la diaminobencidina. Dicho sustrato posee un color que va desde el amarillo al café sepia en la forma oxidada. La cantidad de DAB oxidada será directamente proporcional a la concentración de hemoglobina (pseudo-peroxidasa) presente.

Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

Medio DMEM complementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%.

Medio RPMI complementado con SFB al 10%.

IgG de conejo anti-DNP.

Eritrocitos de carnero sensibilizados con TNBS (GRc sens).

Cloruro de amonio 0.08M (NH_4Cl).

Dodecil sulfato de sodio 0.3% en PBS (SDS).

Solución de Diaminobencidina 0.4 mg/mL (DAB)/ H_2O_2 0.36 % en PBS

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

OPSONIZACIÓN DE ERITROCITOS DE CARNERO

1.- Preparar un volumen suficiente de una suspensión al 1% de GRc sensibilizados con TNBS en medio DMEM o RPMI sin complementar en tubos de 5 mL o tubos Eppendorf de 2 mL.

2.- Dividir la suspensión en 2 tubos Eppendorf de 1 ó 2 mL:

a) GRc sin opsonizar

b) GRc opsonizados con la dosis subaglutinante de anticuerpo α -DNP correspondiente al título de hemaglutinación.

3.- Mantener en agitación suave y constante ambos tubos mínimo durante 30 min y protegidos de la luz.

4.- Centrifugar. Eliminar el sobrenadante y resuspender los botones de eritrocitos al 1% en medio de cultivo sin complementar.

FAGOCITOSIS

1.- Realizar una suspensión con las células mielomonocíticas a analizar de 1×10^6 cél/mL en medio DMEM o RPMI complementado con SFB al 10%. Mantener en hielo.

2.- Colocar 320 μ L de la suspensión anterior equivalentes a 320,000 células, en 6 tubos Eppendorf de 1.5 mL de la siguiente manera (por duplicado):

- a) Suspensión Celular + GRc opsonizados
- b) Suspensión Celular + GRc sensibilizados sin opsonizar
- c) Suspensión Celular

3.- Agregar 60 μ L de la suspensión de GRc al 1% opsonizados a los tubos a) y de GRc sin opsonizar a los tubos b).

4.- Centrifugar los tubos un pulso en la picocentrífuga para permitir que las células y eritrocitos sedimenten suavemente.

5.- Destapar los tubos e incubarlos en una gradilla a 37 °C y 10% de CO₂ en la incubadora durante 2 h 30 min.

6.- Centrifugar en picocentrífuga y retirar el sobrenadante por succión. Descompactar el botón celular.

7.- Agregar 1 mL de la solución hemolisante de NH₄Cl 0.08M a cada tubo para lisar los eritrocitos no ingeridos. Resuspender rápidamente y centrifugar hasta observar un pellet en el fondo de los tubos.

8.- Retirar el sobrenadante por succión y resuspender el botón celular an el residuo de solución hemolisante de NH₄Cl.

9.- Lavar 2 veces con 1 mL de PBS para retirar la hemoglobina libre, retirando perfectamente todo el sobrenadante en el último lavado.

10.- Lisar las células del pellet con 320 μ L de SDS 0.3% en PBS por 15 min.

11.- Revelar inmediatamente o guardar en congelación a -20 ó -70°C .

REVELADO POR ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PSEUDO-PEROXIDASA

1.- Homogeneizar el lisado antes de revelar. Si ha estado en congelación permitir que se equilibre con la temperatura ambiente y después homogeneizar.

2.- En placas de ELISA de 96 pozos colocar $100\ \mu\text{L}$ del lisado celular de cada tubo por triplicado.

3.- Colocar $200\ \mu\text{L}$ de solución reveladora de DAB en PBS por pozo.

4.- Incubar de 3 a 5 min o hasta el desarrollo de color a temperatura ambiente.

5.- Leer la densidad óptica a $490\ \text{nm}$ en el lector de ELISA.

3.9 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE MEMBRANA

Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

Solución amortiguadora para lavados - SFB 5% y Azida de Sodio 0.1% en PBS
IgG específico para los antígenos de superficie (primer anticuerpo)

2C5 1.256 mg/mL (Control de isotipo, IgG₁)

4F8 3.46 mg/mL (Control de isotipo, IgG_{2b})

32.2 0.41 mg/mL (α -Fc γ RI)

IV.3 1.19 mg/mL (α -Fc γ RII)

2LMP-19C 0.10 mg/mL (α -CR3)

Anti-IgG marcado con fluoresceína (FITC) 0.75 mg/mL (segundo anticuerpo)

Solución fijadora de paraformaldehído 1% en PBS

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES

1.- Realizar una suspensión de las células a analizar (1×10^6 céls / 500 μ L) en amortiguador de lavados preparado recientemente.

2.- Utilizar como tubos control:

A.- 500 μ L de suspensión celular sin anticuerpos.

B.- 500 μ L de suspensión celular sin primer anticuerpo.

C.- 500 μ L de suspensión celular para control de isotipo del primer anticuerpo.

• *REALIZAR TODO EL EXPERIMENTO A 4°C Y EN TUBOS FALCON DE POLIESTIRENO*

3.- Colocar 5 μ g del anticuerpo dirigido contra el antígeno de superficie de las células (primer anticuerpo) en 500 μ L de la suspensión celular e incubar durante 1h 30 min. a 4°C resuspendiendo ocasionalmente.

4.- Lavar 2 veces con 1 mL de amortiguador de lavados, centrifugando a 1500 r.p.m. por 4 min cada vez. Retirar el sobrenadante por decantación inmediatamente después de centrifugar.

5.- Diluir el anticuerpo anti-IgG FITC (segundo anticuerpo) 1:300 en amortiguador para lavados (2.5 μ g/mL). Colocar 200 μ l del anticuerpo diluido en los tubos.

6.- Incubar las muestras protegidas de la luz durante 1h 30min resuspendiendo ocasionalmente.

7.- Lavar 2 veces con 1 mL de amortiguador de lavados y una última vez con 1 mL de PBS; centrifugando a 1500 r.p.m. por 4 min cada vez. Retirar el sobrenadante por decantación inmediatamente después de centrifugar.

8.- Incubar con 800 μ l de paraformaldehído al 1% en PBS durante 25 min.

9.- Lavar dos veces con 1 mL de PBS centrifugando a 1500 r.p.m. por 4 min. Retirar el sobrenadante por decantación inmediatamente después de centrifugar y resuspender finalmente en 1 ml de PBS.

10.- Guardar las muestras a 4°C en oscuridad. ***máximo 7 días.**

11.- Analizar la fluorescencia promedio de 10,000 células por muestra en el citómetro de flujo (FACScan).

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Determinación de la Concentración de los Inductores de Diferenciación Necesaria para Provocar Cambios Morfológicos y en la Proliferación

Como paso inicial para la caracterización del efecto diferenciador de algunos agentes sobre células de las líneas celulares U-937 y THP-1, uno de los primeros objetivos experimentales fue definir las condiciones con respecto a la concentración de cada uno de los agentes inductores de diferenciación, que tuvieran efecto sobre las células.

Dada la imposibilidad práctica de determinar detalladamente los efectos de distintas concentraciones de cada agente inductor sobre un conjunto extenso de características celulares, se decidió seleccionar las concentraciones a emplear con base en efectos fácilmente observables, como cambios morfológicos y/o cambios en la velocidad de proliferación celular. Dichas propiedades fueron escogidas ya que se sabe que la diferenciación provoca cambios morfológicos y una disminución de la proliferación.

Incubamos células de cada una de las líneas U-937 y THP-1 en presencia de distintas concentraciones de cada uno de los agentes: PMA, RA, VD3 e IFN. Los cultivos fueron observados al microscopio cada 24 h para detectar:

- 1) Cambios en la morfología.
- 2) Disminución de la proliferación celular.
- 3) Daño o muerte celular.

El **PMA** a una concentración de 50 nM provocó un notable cambio morfológico y disminución de proliferación en las líneas celulares THP-1 y U-937 a las 24 y 48 h (Fig 1A). Además no produce muerte celular considerable.

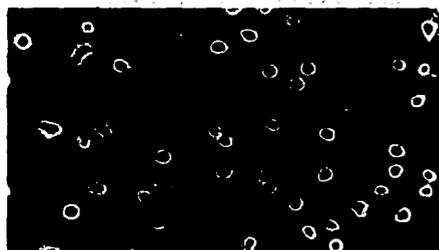
El **RA**, en una concentración de 10 μM , fue tóxico para las células, lo que se manifestó por la presencia de alta granularidad en el interior de las mismas y una alta proporción de células muertas. Sin embargo, la concentración de 1 μM fue adecuada para provocar un cambio ligero en la morfología de las células, así como también una disminución sutil de la proliferación en ambas líneas celulares sin inducir muerte celular. Este efecto fue más notorio en las células THP-1 que en las U-937.

En el caso de la **VD3**, la concentración de 100 nM resultó adecuada para provocar cambios morfológicos y disminución de proliferación que fueron evidentes en las células THP-1 en un lapso de 72 h, mientras que en las células U-937 provocó un muy ligero cambio morfológico a las 120 h de tratamiento, aunque no se evidenció cambio alguno en la proliferación celular. Dado que concentraciones mayores fueron tóxicas, la concentración de 100 nM se utilizó para los tratamientos de ambas líneas celulares.

El **IFN- γ** humano se probó en dos diferentes concentraciones 1000 y 100 U/mL, siendo la primera concentración demasiado tóxica para las células, exhibiendo un alto índice de mortalidad, mientras que la segunda provocó un cambio morfológico y toxicidad ligeros.

En las figuras 1B a 1F se ilustran los cambios morfológicos y sobre la proliferación porvocados por los distintos agentes inductores en células THP-1, a los distintos tiempos de tratamiento.

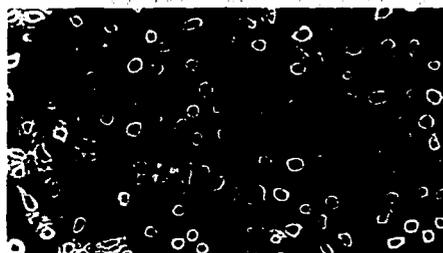
Figura 1A - Efecto del PMA (50 nM) sobre la morfología de células de la línea U937



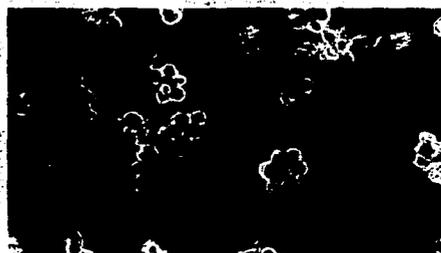
CONTROL 24 Hrs



PMA 24 Hrs



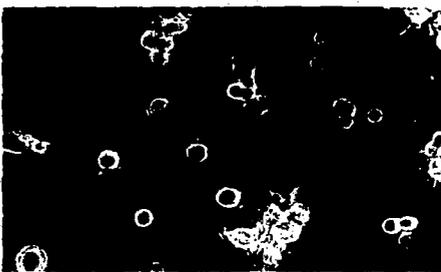
CONTROL 48 Hrs



PMA 48 Hrs



CONTROL 72 Hrs

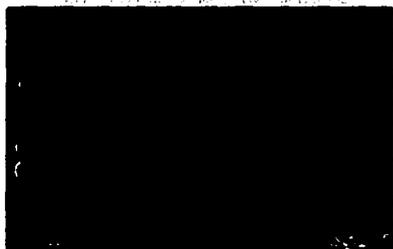


PMA 72 Hrs

Figura 1B - Efecto de inductores de diferenciación sobre células THP-1, 24 horas de tratamiento



Sin Tratamiento



PMA 50 nM



RA 1 μM

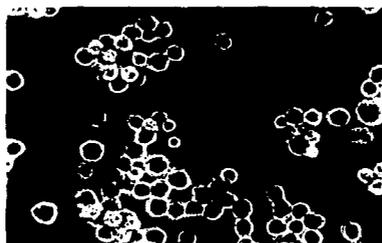


VD3 100 nM



IFN-γ 100 U/mL

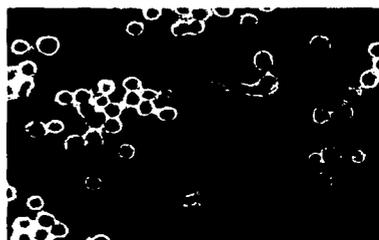
Figura 1C - Efecto de inductores de diferenciación sobre células THP-1, 48 horas de tratamiento



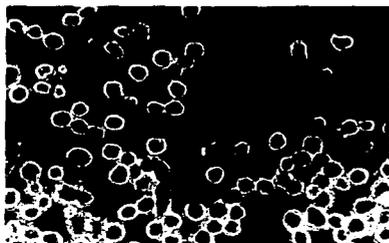
Sin Tratamiento



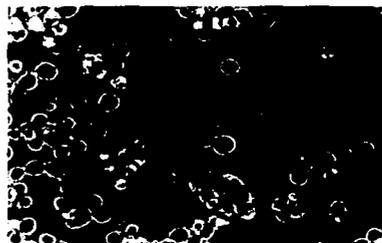
PMA 50 nM



RA 1 μM

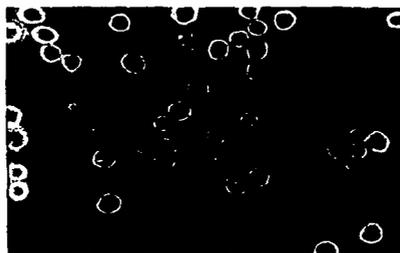


VD3 100 nM



IFN-γ 100 U/mL

Figura 1D - Efecto de inductores de diferenciación sobre células THP-1, 72 horas de tratamiento



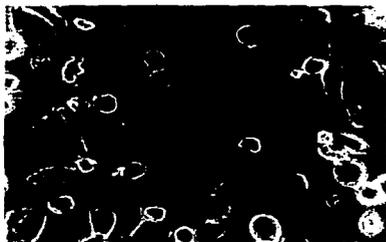
Sin Tratamiento



PMA 50 nM



RA 1 μM



VD3 160 nM



IFN-γ 100 U/mL

Figura 1E - Efecto de inductores de diferenciación sobre células THP-1, 96 horas de tratamiento



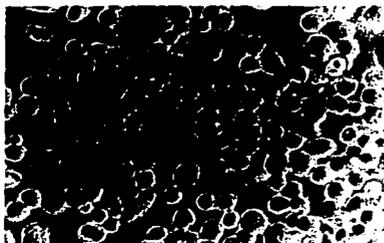
Sin Tratamiento



PMA 50 nM



RA 1 μM



VD3 100 nM



IFN-γ 100 U/mL

Figura 1F- Efecto de inductores de diferenciación sobre células THP-1, 120 horas de tratamiento

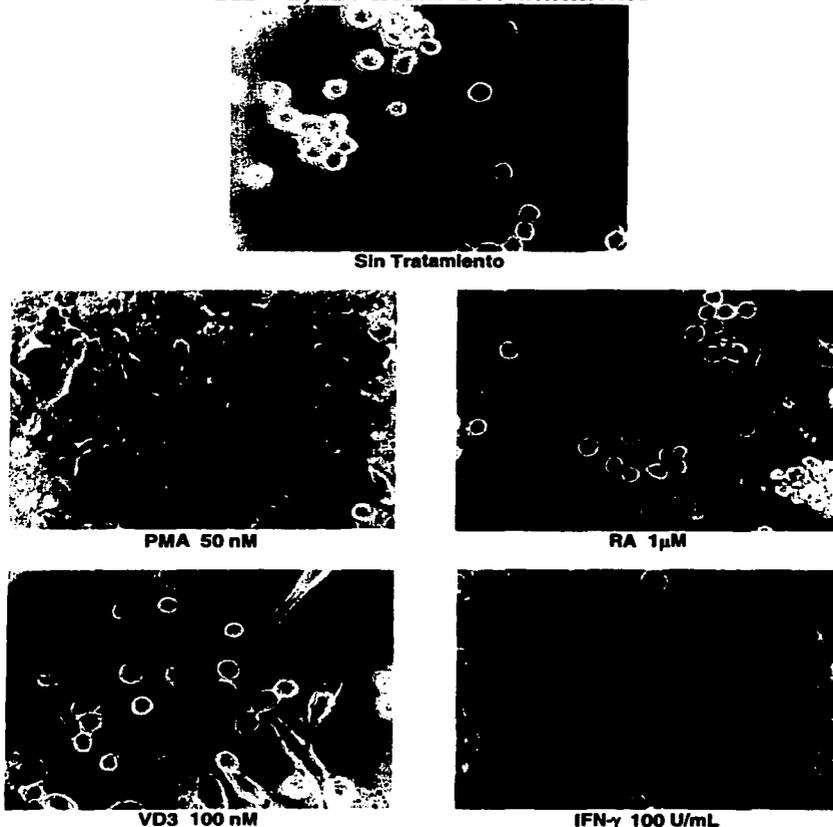


Figura 1. Efecto de los Agentes Inductores sobre la Morfología y proliferación celular. Microfotografías tomadas en microscopio invertido de las células U-937, con el tratamiento de PMA 50 nM y THP-1 con los tratamientos de PMA 50 nM, VD3 100 nM, RA 1 mM e IFN-γ 100 U/mL. Las células tratadas y sin tratamiento, se fotografiaron después de ser incubadas con los agentes inductores por los lapsos de tiempo indicados. A) Células U-937 a las 24, 48 y 72 h de tratamiento con PMA 50 nM. Los demás tratamientos no indujeron cambios apreciables en la morfología. B) Células THP-1 a las 24 h de tratamiento. C) Células THP-1 a las 48 h de tratamiento. D) Células THP-1 a las 72 h de tratamiento. E) Células THP-1 a las 96 h de tratamiento. F) Células THP-1 a las 120 h de tratamiento.

4.2 - Efecto de los Inductores de Diferenciación Sobre la Proliferación Celular

Un parámetro que puede ser indicativo de diferenciación celular es la disminución de la proliferación, ya que la célula disminuye la división celular para aumentar su tamaño y/o llevar cabo otro tipo de funciones efectoras. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la magnitud en que la proliferación disminuye depende del estado de diferenciación en el que se encuentre la célula.

En las células THP-1, que se encuentran en un estado de maduración más avanzado que las células U-937, el PMA provocó a partir de las 72 h una disminución de la proliferación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) (Apéndice I) respecto al control y demás tratamientos, al igual que un cambio morfológico muy evidente mostrando las células una fuerte adherencia al plástico y morfología semejante a los macrófagos maduros. Ambos efectos dependieron del tiempo del tratamiento. Después del PMA, el agente que mostró efectos más evidentes fue el IFN- γ que provocó una disminución estadísticamente significativa de la proliferación ($P < 0.05$) (Apéndice I) a las 48 h, sin embargo, observamos que dicho efecto no es dependiente del tiempo ya que no hubo diferencias a lo largo del tratamiento. Morfológicamente, se observó un tendencia de las células a agruparse y un daño celular ligero. El tratamiento con RA y VD₃ a pesar de disminuir la proliferación celular, no hubo diferencias significativas respecto a los demás tratamientos. El tratamiento con VD₃ sin embargo, si produjo cambios en la morfología celular, adquiriendo las células formas semejantes a macrófagos pero menos extendidas que las que adquieren con el tratamiento con PMA, mientras que el RA no provocó cambios morfológicos notables en las células. (Tabla I y Fig 2B).

En las células U-937 el tratamiento con PMA también provocó una disminución de la proliferación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) (Apéndice I) respecto al control y a los demás tratamientos a partir de las 72 h. Dicha disminución en la proliferación se acompañó de cambios morfológicos adquiriendo las células formas semejantes a macrófagos; pero más sutiles que los observados en las células THP-1. El RA provocó una disminución de la proliferación detectable aunque no fue estadísticamente significativa respecto a los demás tratamientos, y no fueron evidentes cambios morfológicos. Al contrario de la respuesta observada en las células THP-1 por el tratamiento con VD₃, las células U-937 no disminuyeron su proliferación en ningún momento. Por último, el tratamiento con IFN- γ no alteró la proliferación ni tampoco indujo cambios morfológicos evidentes. (Tabla I y Fig.2A).

En la Fig.1 se muestran microfotografías que ilustran los efectos inducidos por los agentes mencionados sobre la morfología y proliferación celular.

TABLA I.- Efecto de los Inductores de Diferenciación sobre la Proliferación Celular en las Células THP-1 y U-937. ^{a,b}

Células THP-1					
t (h)	RA	VD3	PMA^b	IFN ^{b,d}	No Exp
24			81		1
			53		2
	122	107			3
			24		4
	97	68	63		5
	96	96	29		6
	89	80	33	83	7
	102	89	41		8
	106		53	106	9
	103	73			10
			50	103	11
48			50		1
			110		2
	72	108			3
			42		4
	40		26		5
	76	70	25		6
	38	92	18		7
	73	104	14	79	8
	135	122	41		9
	99		52		10
	98	78			11
			33	69	12
72	79 ^c		20		1
	96		29		2
	59	81 ^c	26		3
	72	83	25		4
	55	101	25	105	5
	77	99	23		6
	89		46	61	7
	29	70	53		8
			39	58	9
			16	87	10
96	57 ^c	71	16	87	1
	98		27	55	2
	47		31		3
	82		31		4
			24	39	5
120	100 ^c		18	87	1
	46	60	8		2
	52		24		3
			12	63	4

TABLA I (Continuación)

Células U-937

t (h)	RA	VD3	PMA ^b	IFN	RA+VD3	No Exp
24			65			1
			38			2
	73	94			103	3
	78	92			102	4
	90	99			100	5
	95	93	63			6
			64			7
	83	156	72			8
	81	86	64	87		9
	111	79	67			10
	112		85	124		11
	107	116				12
			76	131		13
48			69			1
			113			2
	66	75			85	3
	57	90			102	4
	82	89			111	5
	109	104	70			6
			57			7
	69		56			8
	56	115	45			9
	88	106	49	156		10
	107	113	61			11
	78		24			12
	77	84				13
			84	120		14
72	34 ^c	RR			77	1
	63	128			123	2
	68	113	27			3
			69			4
	141		54			5
	53	85	21			6
	85	94	49			7
	88		29	57		8
	63		36			9
	58	55				10
			42	60		11
96	97 ^c		36	97		1
	34		22			2
	76		20			3
			30	106		4
120		63	17	84		1
	74	119	25			2
			25	69		3

^a La proliferación se midió por conteo celular por duplicado. El promedio se expresó en porcentaje con respecto al número de células en cultivos sin tratamiento.

^b Tratamiento que provocó una disminución significativa de la proliferación ($P < 0.05$).

^c Tiempo de tratamiento en el que se observó una disminución de la proliferación notable pero no significativa.

^d Efecto no dependiente del tiempo.

Figura 2A. Efecto de los agentes inductores sobre la proliferación celular.

Efecto de los Inductores de Diferenciación Sobre la Proliferación de Células U-937^a

t (h)	RA	VD3	PMA	IFN	RA+VD3
24	92	102	66	114	102
48	79	97	63	138	99
72	72	94	41	58	100
96	69		27	101	
120	74	91	22	76	

^aNúmero de células expresado como porcentaje del número de células en cultivos control

Efecto de los Inductores de Diferenciación sobre la Proliferación de Células U-937

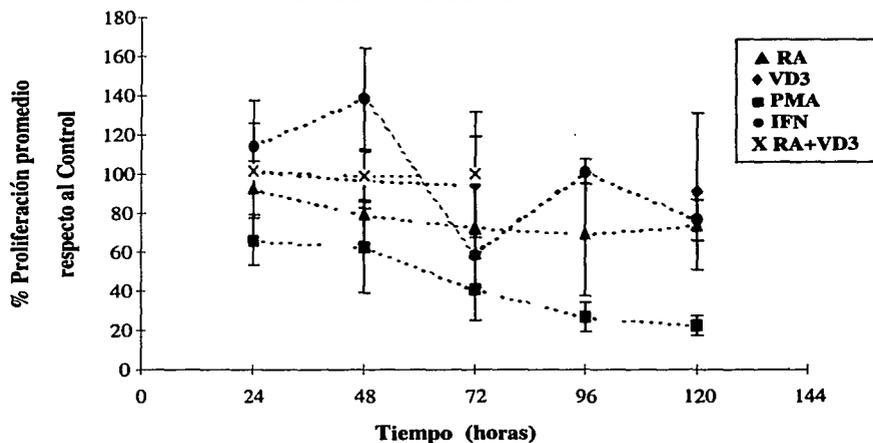


Figura 2B. Efecto de los agentes inductores sobre la proliferación celular.

Efecto de los Inductores de Diferenciación Sobre la Proliferación de Células THP-1^a

t (h)	RA	VD3	PMA	IFN
24	102	86	48	97
48	79	96	41	74
72	69	87	32	75
96	71	71	26	60
120	66	60	15	75

^aNúmero de células expresado como porcentaje del número de células en cultivos control

Efecto de los Inductores de Diferenciación en la Proliferación de Células THP-1

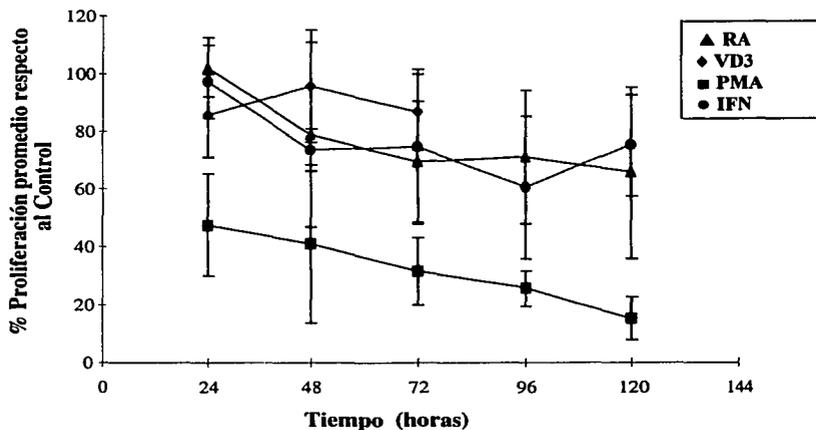


Fig.2 Efecto de los agentes inductores sobre la proliferación celular. La proliferación se midió por conteo celular en microscopio. Los datos representan los valores promedio expresados en porcentaje respecto a la proliferación de las células sin tratamiento. 2A) Células U-937 tratadas con RA 1 μ M (\blacktriangle), VD3 100 nM (\blacklozenge), RA 100 nM + VD3 100 nM (X), PMA 50 nM (\blacksquare) e IFN- γ 100 U/mL (\bullet). 2B) Células THP-1 tratadas con RA 1 μ M (\blacktriangle), VD3 100 nM (\blacklozenge), PMA 50 nM (\blacksquare) e IFN- γ 100 U/mL (\bullet).

4.3 Efecto de los Agentes Inductores de Diferenciación sobre el contenido de Enzimas Hidrolíticas.

Una de las características importantes de las células del sistema fagocítico mononuclear es su alto contenido de enzimas hidrolíticas como proteasas, fosfatasa, etc; las cuales juegan un papel importante para la destrucción de microorganismos patógenos, células senescentes y otras estructuras dañinas presentes en los tejidos.

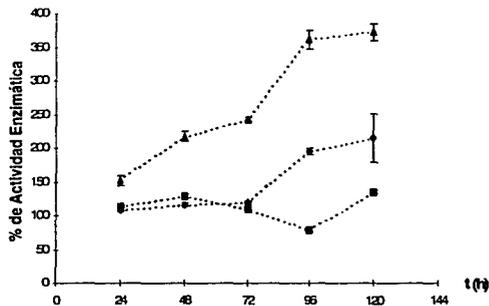
Para estudiar el efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre el contenido de las enzimas β -glucuronidasa y fosfatasa ácida, determinamos la actividad de estas enzimas en lisados celulares después de 24, 48, 72, 96 y 120 h de exposición a los siguientes tratamientos: PMA 50 nM, RA 1 μ M y VD3 100 nM. Las células se incubaron en presencia de estos agentes en medio de cultivo. El medio fue cambiado entre las 48 y 72 h y entre las 72 y 96 h por medio fresco conteniendo el inductor, según el esquema indicado en Materiales y Métodos.

Se recolectaron las células usando tripsina para desprender aquéllas en las que el tratamiento provocara la adhesión de las células a la caja Petri (PMA y VD3 a partir de las 48 h de tratamiento, RA sólo a las 120 h de tratamiento). Las células tratadas con IFN- γ y las células sin tratamiento (Cr) no se tripsinizaron. En ensayos previos, las células Cr se tripsinizaron para comprobar que la tripsina no provocaba cambios en los parámetros medidos.

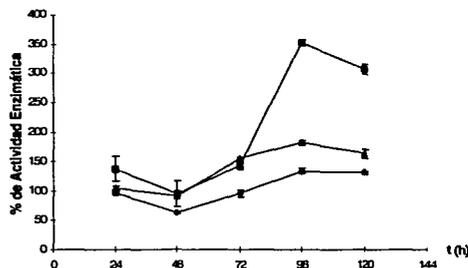
Después de los tratamientos indicados, las células se lisaron en una proporción de $3-4 \times 10^6$ cels/mL con Tritón X-100 1%. Para la determinación de β -glucuronidasa se emplearon 45 μ L del lisado y como sustrato el p-nitrofenil- β -D-glucuronido (0.01 M) en agua. Para la fosfatasa ácida se utilizaron 25 μ L del lisado y como sustrato p-nitrofenil disódico.6H₂O (4.5 mM) en el amortiguador de acetatos. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C en placas de ELISA de 96 pozos durante 2h 30 min para la β -glucuronidasa y 90 min para la fosfatasa ácida. Una vez detenida la reacción con NaOH, se realizó la lectura de densidad óptica a 405 nm en el lector de placas de ELISA. Los datos se graficaron como porcentaje de actividad enzimática con respecto a la actividad enzimática de las células control (Fig.3). Los datos de cuatro experimentos independientes se muestran en la Tabla II.

Figura 3.- Actividad de β -glucuronidasa y fosfatasa ácida en células U-937 y THP-1 durante el tratamiento con inductores de diferenciación.

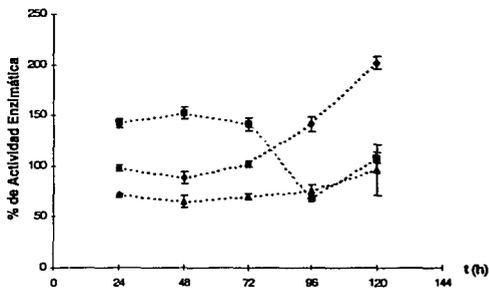
A Expresión de β -glucuronidasa en Células U-937



C Expresión de β -glucuronidasa en Células THP-1



B Expresión de Fosfatasa Ácida en Células U-937



D Expresión de Fosfatasa Ácida en Células THP-1

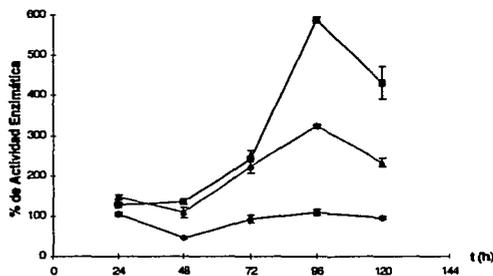


Fig.3. Actividad de β -glucuronidasa y fosfatasa ácida en células U-937 y THP-1. Las líneas celulares U-937 y THP-1. fueron tratadas por 24 a 120 h a 37°C y 10% de CO₂ con : ◆VD3 100 nM, ■ PMA 50 nM, ▲ RA 1 μ M. La actividad enzimática se midió por microensayo empleando *p*-nitrofenil- β -D-glucuronido para la determinación de β -glucuronidasa (A y C) y *p*-nitrofenil fosfato disódico.6H₂O para la fosfatasa ácida (B y D). Las gráficas se expresan en % de actividad, con respecto a la observada en las células sin tratamiento. Las gráficas corroboran el efecto del RA y VD3 sobre la actividad de la β -glucuronidasa en las células U-937 y del PMA sobre la fosfatasa ácida en las células THP-1. Gráficas representativas de 4 experimentos.

Los datos muestran efectos diferentes de cada agente inductor sobre cada una de las dos líneas celulares. En la línea celular **U-937**, el **RA** indujo un aumento significativo en la actividad de β -glucuronidasa a partir de las 24 h de tratamiento ($P=0.014$), permaneciendo el efecto hasta las 96 h (Apendice I). El efecto observado a las 120 h no se consideró significativo por no contar con suficientes datos para el análisis estadístico; sin embargo, pudo observarse un incremento de la actividad enzimática. Este efecto fue reproducible en 4 experimentos independientes. **VD3** indujo también un incremento significativo en la actividad de la enzima a las 24 y 48 h ($P=0.029$). El incremento observado a las 72 y 96 h no es estadísticamente significativo por no contar con datos suficientes para el análisis. El **PMA** no indujo cambio significativo en la actividad de β -glucuronidasa. La actividad de *fosfatasa ácida* no se vio alterada significativamente por ninguno de los tratamientos; aunque hay algunas condiciones donde se observó algún efecto, no se pudo realizar el análisis estadístico por no contar con suficientes réplicas (Tabla II).

En las células **THP-1**, el tratamiento con **PMA** produjo un incremento significativo en la actividad de la fosfatasa ácida a las 72 h ($P=0.050$) (Apéndice I). Tanto **PMA** como **RA** incrementaron considerablemente la actividad de ambas enzimas a las 96 y 120 h; pero no se puede demostrar significancia estadística por contar con datos insuficientes para el análisis estadístico. (Tabla II).

TABLA II

Efecto de los inductores de diferenciación sobre la actividad enzimática de β -glucuronidasa y fosfatasa ácida en células U-937 y THP-1.^{a,b,c}

Células U-937

Fosfatasa Acida

t (h)	RA				VD3			PMA				
	Número de Experimento											
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4	5
24	109	165	72	116	111	100	98	59	70	134	142	109
48	158	81	65	521	121	98	88	104	57	149	152	137
72	304	140	70	105	111	102	102		149	309	141	70
96			76	187			141				68	98
120			96	312			202				108	200

β -Glucuronidasa

t (h)	RA ^a				VD3 ^a			PMA				
	Número de Experimento											
	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4	5
24	<u>148</u>	<u>106</u>	<u>152</u>	<u>144</u>	118	87	109	88	77	98	113	68
48	<u>168</u>	<u>213</u>	<u>217</u>	<u>649</u>	<u>121</u>	<u>125</u>	<u>117</u>	68	57	115	131	76
72	<u>253</u>	<u>369</u>	<u>243</u>	<u>227</u>	<u>112</u>	<u>134</u>	<u>120</u>		118	144	111	54
96			<u>362</u>	<u>402</u>			195				79	153
120			373 ^b	1550 ^b			215				135	587

^a Tratamiento que provocó aumento significativo en la actividad de la enzima (RA: P=0.014, VD₃: P=0.029). Los datos subrayados indican los tiempos de tratamiento en los que se obtuvo una respuesta significativa.

^b Tiempo en que el tratamiento provocó aumento en la actividad enzimática; pero por pertenecer a una muestra pequeña no se les realizó el análisis estadístico.

^c No se observó cambio significativo en la actividad de la fosfatasa ácida después del tratamiento con el inductor en las células U-937

TABLA II (continuación)

Células THP-1

Fosfatasa Acida

t (h)	RA		PMA ^a			
	Número de Experimento					
	1	2	1	2	3	4
24	146	127	122	203	128	82
48	108	96	140	242	134	23
72	224	148	<u>180</u>		<u>242</u>	<u>122</u>
96	326 ^b	109 ^b			589 ^b	116 ^b
120	233 ^b	107 ^b			432 ^b	209 ^b

β -Glucuronidasa

t (h)	RA		PMA ^a			
	Número de Experimento					
	1	2	1	2	3	4
24	104	94	130	221	137	88
48	91	127	124	188	95	70
72	155	127	135		144	70
96	183 ^b	130 ^b			352 ^b	160 ^b
120	163 ^b	130 ^b			307 ^b	139 ^b

^a Tratamiento que provocó aumento significativo en la actividad de la enzima (PMA: P=0.071). Los datos subrayados indican los tiempos de tratamiento en los que se obtuvo una respuesta significativa.

^b Tiempo en que el tratamiento provocó aumento en la actividad enzimática; pero por pertenecer a una muestra pequeña no se les realizó el análisis estadístico.

^c El tratamiento con PMA 50 nM demostró un aumento significativo en la actividad de la fosfatasa ácida en las células THP-1 únicamente.

^d Todos los datos se encuentran expresados en porcentaje relativo a la actividad enzimática de las células sin tratamiento en cada tiempo; considerando este valor como el 100%.

4.4 -Determinación del Efecto de los Inductores de Diferenciación sobre la Capacidad Fagocítica.

Una de las principales funciones efectoras de las células fagocíticas es la de internalizar microorganismos patógenos y otros agentes perjudiciales, con el fin de destruirlos y, de ser necesario, establecer una respuesta inflamatoria más compleja, con la participación de otras células como los linfocitos T y B. Es por ello que la fagocitosis es un atributo importante de las células del sistema fagocítico mononuclear, siendo más evidente cuando las células se encuentran en un estado de maduración más diferenciado como el macrófago.

Determinamos la capacidad fagocítica de las células midiendo la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG de conejo anti-DNP, a través de los receptores Fc γ -R expresados en su superficie, que reconocen la fracción constante de la IgG. La fagocitosis se cuantificó aprovechando la actividad de pseudo-peroxidasa de la hemoglobina que, al entrar en contacto con el sustrato, induce la oxidación del mismo.

Después de mantener las células THP-1 y U-937 bajo los diferentes tratamientos, se distribuyeron 320,000 células por tubo. A cada tubo de células tratadas y sin tratamiento, se agregaron 60 μ L de una suspensión al 1% de GRc opsonizados. La reacción fagocítica se incubó durante 2 h 30 min a 37 °C y en atmósfera con 10% CO₂.

El revelado de la fagocitosis, se llevó a cabo por la reacción de la hemoglobina liberada de los eritrocitos ingeridos con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina, la cual es reducida en la reacción. La cantidad de diaminobencidina reducida que se produce es proporcional a la cantidad de hemoglobina, y se determina por la densidad óptica a 490 nm en el lector de placas de ELISA. Los datos se graficaron como porcentaje de fagocitosis con respecto a la fagocitosis efectuada por las células sin tratamiento (Cr).

El inductor de diferenciación que provocó un incremento significativo en la capacidad fagocítica de las células U-937 fue la VD3, a las 48 h (P=0.008) y 72 h (P=0.029) (Apéndice I). En tiempos posteriores de tratamiento, se observó también el efecto pero no se estableció como significativo por carencia de datos suficientes. El RA produjo un aumento notable a partir de las 96 h, pero no se estableció significancia por no poder realizar la prueba estadística. Las células THP-1, no muestran alteraciones significativas sobre la fagocitosis debida a los tratamientos; sin embargo el PMA produce una disminución considerable de la fagocitosis desde las 24 h de tratamiento. Tal efecto es también observado en las células U-937; siendo significativo a las 48 h (P=0.048) (Apéndice I). En ambas líneas celulares no se determinó significancia estadística sobre la fagocitosis por el PMA, por no contar con datos suficientes para la prueba. (Tabla III y Fig. 4)

TABLA III

Efecto de los inductores de diferenciación sobre la capacidad fagocítica de las células U-937 y THP-1.^{a,b,c}

Fagocitosis en Células THP-1 (% del control)

t (h)	VD3			RA				PMA	
	Número de Experimento								
	1	2	3	1	2	3	4	1	2
24	116	155	80	77	139		62	47	
48	136	76	45	30	99	299	45	31	90
72		111	44		80	83	86	12 ^b	26 ^b
96		219	57		155	78	10	56 ^b	42 ^b
120			93			23 ^b	54 ^b		3

Fagocitosis en Células U-937 (% del control)

t (h)	VD ₃				RA					PMA		VD ₃ +RA	
	Número de experimento												
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	1	2
24	212	77	100	285	61	24	98		186	27		107	54
48	<u>419</u>	<u>121</u>	<u>765</u>	<u>479</u>	46	7	96	79	160	<u>49</u>	<u>13</u>	57	27
72	<u>1100</u>	<u>170</u>		<u>916</u>	56	25		127	134		24 ^b	176	38
96				1531 ^b					618 ^b				
120			468 ^b					289 ^b	802 ^b	163	47		

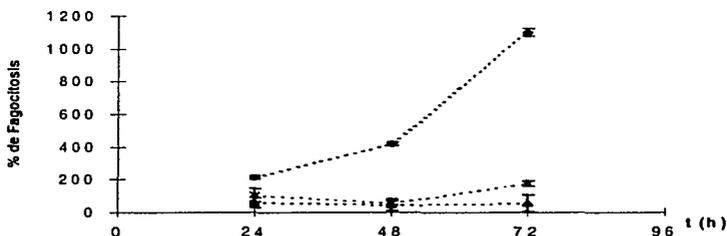
^a Tratamiento que indujo un aumento o disminución significativa sobre la fagocitosis. (VD₃: P=0.008 [48 h], P=0.029 [72 h]; PMA: P=0.048). Los datos subrayados indican los tiempos de tratamiento en los que se obtuvo una respuesta significativa.

^b Tiempo en que el tratamiento provocó aumento o disminución en la capacidad fagocítica; pero por pertenecer a una muestra pequeña no se les realizó el análisis estadístico.

^c Los datos están expresados en porcentaje respecto a la actividad fagocítica de las células sin tratamiento.

Figura 4. Efecto de los inductores de diferenciación sobre la capacidad fagocítica de las células U-937 y THP-1.

A Determinación de Actividad Fagocítica en Células U-937



B Determinación de Actividad Fagocítica en Células THP-1

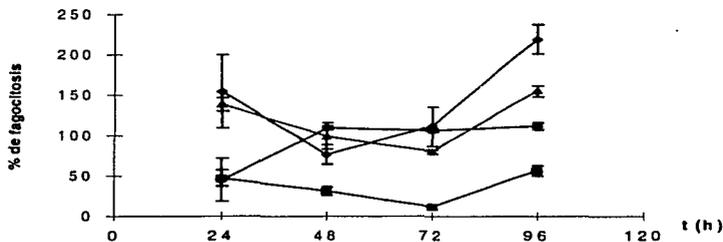


Fig. 4. Efecto de los inductores de diferenciación sobre la capacidad fagocítica de las células U-937 y THP-1. Las líneas celulares U-937 (A) y THP-1 (B) fueron tratadas por distintos lapsos de tiempo (24 a 120 h) a 37°C y 10% de CO₂ con: ◆VD₃ 100 nM, ■ PMA 50 nM, ▲ RA 1 μM, ●IFN-γ 100 U/mL. Se incubaron 320,000 céls/tubo con 60 μL de eritrocitos de carnero al 1%, opsonizados con IgG de conejo α-DNP a 37 °C y 10% de CO₂ durante 2h 30min. La actividad fagocítica se midió por absorbancia a 490 nm por la aparición de color debida a la reducción de la DAB. La fagocitosis de las células tratadas se expresó en % respecto a las células sin tratamiento (control). El efecto provocado por la VD₃ en las células U-937 es significativamente mayor al control desde las 48 h; mientras que en las células THP-1 no se observa efecto significativo con ninguno de los tratamientos. Ensayo representativo de tres.

4.5 Cuantificación de Receptores FcγRI, FcγRII y CR3 después del Tratamiento con Inductores de Diferenciación

La modificación de la expresión de receptores de superficie, es un marcador importante de diferenciación celular; dicha expresión puede ser indicativa del estado de maduración en el que se encuentre la célula. Estos cambios dependerán cualitativa y cuantitativamente de la ruta de diferenciación a la que haya sido inducida la célula por efecto del tratamiento.

Las células se incubaron con los inductores durante 24, 48, 72 y 96 h a 37°C y 10% de CO₂. Para la determinación, las células THP-1 y U-937 se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración de 1x10⁶ céls / ml.

Los marcadores de superficie cuya expresión fue analizada fueron los receptores para IgG tipo I y II y el receptor para la fracción C3b del complemento (CR3), que son receptores importantes para el reconocimiento, por parte de los monocitos-macrófagos, de partículas opsonizadas con dichas moléculas, para una fagocitosis más eficiente. Dichos marcadores se cuantificaron por la técnica de inmunofluorescencia indirecta por citometría de flujo, utilizando anticuerpos dirigidos contra las moléculas de superficie mencionadas anteriormente y un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína. Los anticuerpos 32.2 (α-FcγRI) y IV.3 (α-FcγRII) se emplearon a la concentración de 10 a 15 µg por cada 1x10⁶ células, mientras que el anticuerpo 2LMP19C (α-CR3) se empleó a una concentración de 5 µg. El segundo anticuerpo fue IgG α-IgG de ratón marcado con fluoresceína (FITC) a una concentración de 0.45 µg por cada 1x10⁶ células.

En las células **THP-1** la expresión de **CR3** se incrementó notablemente después del tratamiento con **PMA**, alcanzando un máximo de expresión a las 72 h. Con el tratamiento de **VD3** la expresión del CR3 se incrementó linealmente durante las 96 h de tratamiento; pero de forma más moderada que con el tratamiento con **PMA**. Los demás tratamientos no afectaron la expresión de dicho receptor. Con respecto al **FcγRI**, se observó una disminución en la expresión por el tratamiento de **RA** y un aumento considerable respecto al control tras el tratamiento con **IFN-γ** y **PMA** a las 48 h, para, en tiempos más largos, regresar a por niveles similares que las células control. El **FcγRII** presenta un patrón similar al receptor tipo I, siendo mayor el efecto que se presenta con el tratamiento de **PMA** que con el de **IFN-γ**. Los niveles de expresión del **FcγRII** con los demás tratamientos se mantienen en niveles basales. (Tabla IV y Fig. 5 y 6)

En las células **U-937** la expresión de **CR3** se incrementó 5 veces respecto al control por el **PMA**; en estas células este agente es el máximo inductor de expresión del CR3, en contraste con el caso de las células THP-1, en las cuales el mayor inductor de CR3 es **VD3**. El tratamiento con **RA** y **VD3** provocan también un

aumento en la expresión de dicho receptor, aunque en menor grado ya que solo se incrementa en un factor de 3. El IFN- γ por su parte, no altera la expresión del receptor. La expresión del **Fc γ RI** aumenta 5 veces con el tratamiento de PMA alcanzando un máximo de expresión a las 48 h, de manera similar el tratamiento de IFN- γ induce un aumento de solo 3 veces más con respecto al control. La expresión del **Fc γ RII** aumenta moderadamente con los tratamientos de PMA e IFN- γ , teniendo un máximo a las 48 h; sin embargo los aumentos son solo del 67 y 33 % respectivamente, en relación al control. La expresión del receptor Fc γ RII permanece en valores semejantes al control con el resto de los tratamientos. (Tabla IV y Figs. 5 y 6)

TABLA IV

Expresión de Receptores de Superficie FcγRI, FcγRII y CR3 en células U-937 y THP-1 después de Tratamiento con Inductores de Diferenciación.

Células U-937

Expresión de CR 3 (Intensidad de Fluorescencia)						
t (h)	Cr.1	VD3^b	R.A.^b	Cr.2	INF-γ	PMA^b
24	13.74	<u>32.08</u>	<u>21.95</u>	9.85	11.53	<u>23.02</u>
48	4.56	<u>30.42</u>	<u>39.52</u>	14.83	16.58	<u>49.50</u>
72	7.86	15.17	19.29	14.58	19.25	<u>55.41</u>
96	14.60	<u>35.87</u>	<u>27.87</u>	9.73	12.99	<u>54.82</u>

Expresión de FcγRI (Intensidad de Fluorescencia)						
t (h)	Cr.1	VD3	R.A.	Cr.2	INF-γ^b	PMA^b
24	4.91	4.78	5.76	4.83	<u>21.57</u>	<u>12.09</u>
48	4.02	4.97	5.07	8.01	<u>26.71</u>	<u>17.28</u>
72	3.33	5.03	4.62	7.44	<u>25.38</u>	<u>14.22</u>
96		7.56	7.33	3.79	10.70	8.78

Expresión de FcγRII (Intensidad de Fluorescencia)						
t (h)	Cr.1	VD3	R.A.	Cr.2	INF-γ^b	PMA^b
24	6.73	4.48	5.42	11.15	<u>16.85</u>	<u>17.05</u>
48	5.27	3.81	3.55	15.90	<u>20.42</u>	<u>25.29</u>
72	2.26	4.34	4.11	13.85	<u>18.67</u>	<u>20.91</u>
96	11.28	6.88	6.26	8.50	9.90	<u>24.96</u>

TABLA IV. (Continuación)

Células THP-1

Expresión de CR 3 (Intensidad de Fluorescencia)						
t (h)	Cr.1	VD3^b	R.A.	Cr.2	INF-γ	PMA^b
24	16.66	35.41	23.03	24.78	22.89	33.07
48	17.49	<u>95.17</u>	32.62	49.81	30.53	<u>199.79</u>
72	14.85	<u>97.32</u>	72.28	30.76	31.59	<u>251.01</u>
96	14.67	<u>129.97</u>	20.47	16.72	36.25	<u>165.46</u>

Expresión de FcγRI (Intensidad de Fluorescencia)						
t (h)	Cr.1	VD3	R.A.	Cr.2	INF-γ^b	PMA^b
24	52.83	45.78	30.68	35.52	66.51	53.40
48	34.37	35.33	21.74	64.89	<u>163.15</u>	<u>144.68</u>
72	35.06	24.23	18.91	48.97	58.91	26.40
96	36.59	24.85	14.56	27.26	42.49	14.58

Expresión de FcγRII (Intensidad de Fluorescencia)						
t (h)	Cr.1	VD3	R.A.	Cr.2	INF-γ^b	PMA^b
24	31.40	31.56	28.49	47.90	60.21	43.17
48	2.46	22.60	19.00	65.64	<u>242.04</u>	<u>502.68</u>
72	28.53	17.96	14.42	125.28	31.22	19.80
96	42.38	31.81	21.01	46.11	45.37	14.05

^a Los tratamientos se llevaron a cabo en dos ensayos por separado. En cada ensayo se incluyen las células control (sin tratamiento):

A : Células tratadas con VD3 100 nM y RA 1 μ M (Cr.1)

B : Células tratadas con PMA 50 nM e INF- γ 100U/mL (Cr.2)

^b Tratamiento que indujo un incremento en la expresión del receptor. Los datos subrayados indican los tiempos de tratamiento en los que se obtuvo dicha respuesta.

^c La expresión de receptores se determinó por citometría de flujo. Los datos expresan la fluorescencia promedio de 10,000 células.

Figura 5. Expresión de CR3, FcγRI y FcγRII en células U-937 y THP-1 después del tratamiento con inductores de diferenciación

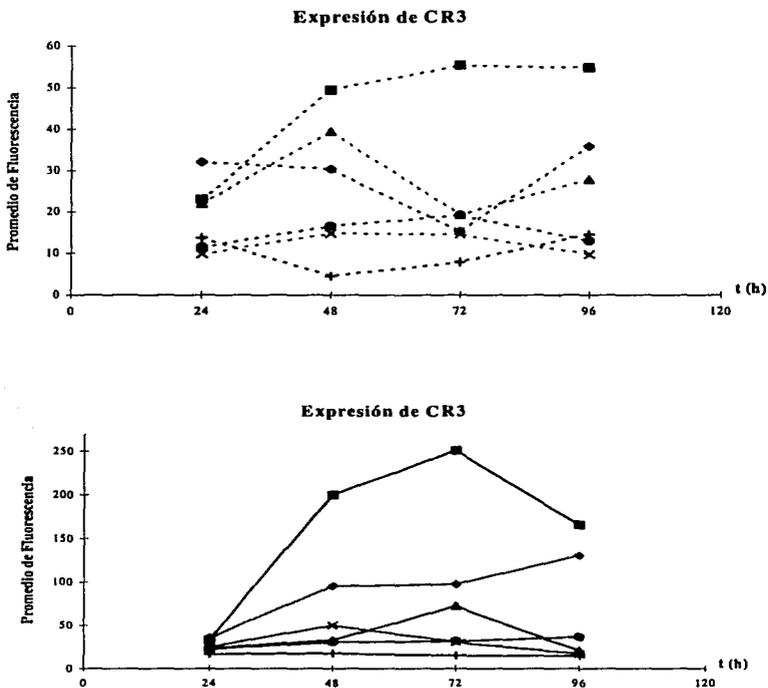


Fig. 5a. Expresión de CR3 en células U-937 y THP-1 después del tratamiento con inductores de diferenciación. La cuantificación de receptores se realizó por citofluorometría (inmunofluorescencia indirecta). Las células se incubaron con el 1^{er} anticuerpo 2LMP19C (anti-CR3) 90 min y con el 2^o anticuerpo IgG-FITC por 90 min. Cr.1: Células control para los tratamientos con VD3 y RA, Cr.2: Células control para los tratamientos con PMA e IFN-γ. Los ensayos se realizaron en días diferentes. + Cr.1, ◆ VD3 100 nM, ▲ RA 1 μM; × Cr.2, ■ PMA 50 nM, ● IFN-γ 100U/mL. Panel superior: Células U-937, Panel inferior: Células THP-1.

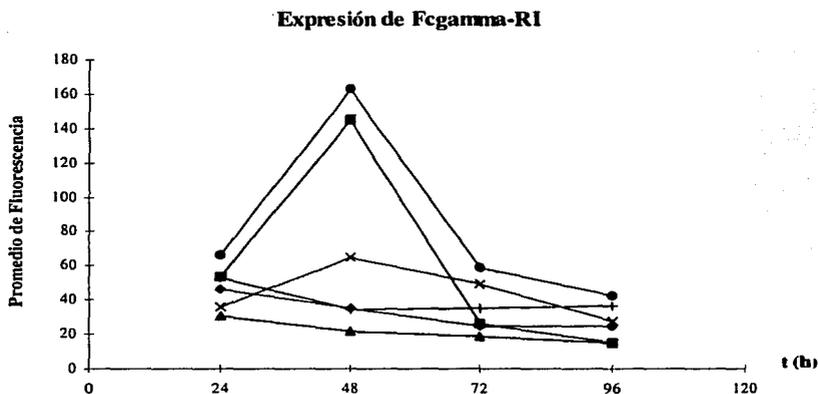
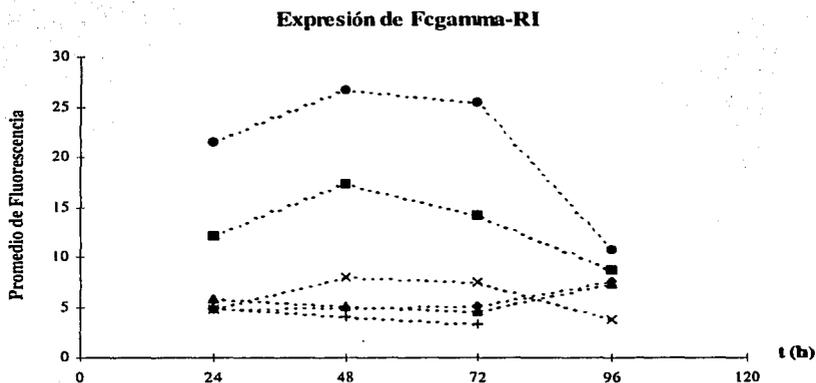


Fig. 5b. Expresión de FcγRI en células U-937 y THP-1 después del tratamiento con inductores de diferenciación. La cuantificación de receptores se realizó por citofluorometría (inmunofluorescencia indirecta). Las células se incubaron con el 1º anticuerpo 2LMP19C, 32.2 (anti-FcγRI) 90 min y con el 2º anticuerpo IgG-FITC por 90 min. Cr.1: Células control para los tratamientos con VD3 y RA, Cr.2: Células control para los tratamientos con PMA e IFN-γ. Los ensayos se realizaron en días diferentes. + Cr.1, ◆ VD3 100 nM, ▲ RA 1 μM; × Cr.2, ■ PMA 50 nM, ● IFN-γ 100U/mL. Panel superior: Células U-937, Panel inferior: Células THP-1.

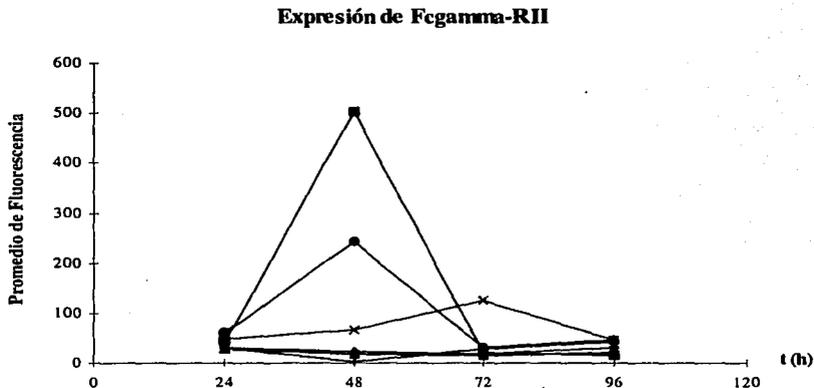
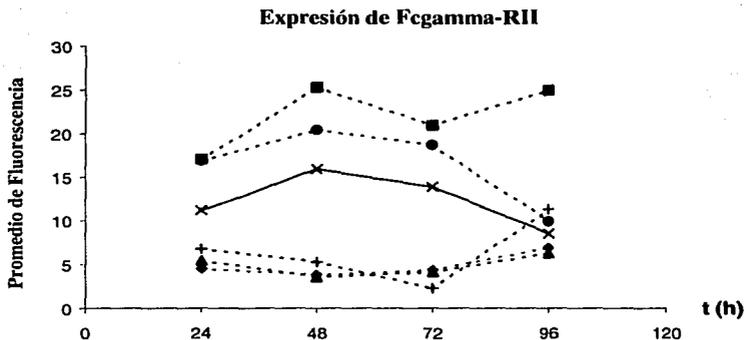


Fig. 5c. Expresión de Fc γ RII en células U-937 y THP-1 después del tratamiento con inductores de diferenciación. La cuantificación de receptores se realizó por citofluorometría (inmunofluorescencia indirecta). Las células se incubaron con el 1^{er} anticuerpo IV.3 (α -Fc γ RII) 90 min y con el 2^o anticuerpo IgG-FITC por 90 min. Cr.1: Células control para los tratamientos con VD3 y RA, Cr.2: Células control para los tratamientos con PMA e IFN- γ . Los ensayos se realizaron en días diferentes.
 + Cr.1, ♦ VD3 100 nM, ▲ RA 1 μ M, X Cr.2, ■ PMA 50 nM, ● IFN- γ 100U/mL.. Panel superior: Células U-937, Panel inferior: Células THP-1.

Figura 6 - Aumento en la fluorescencia por el efecto de los inductores de diferenciación sobre la expresión de receptores.

Figura 6A - Expresión del receptor CR3 en células U937

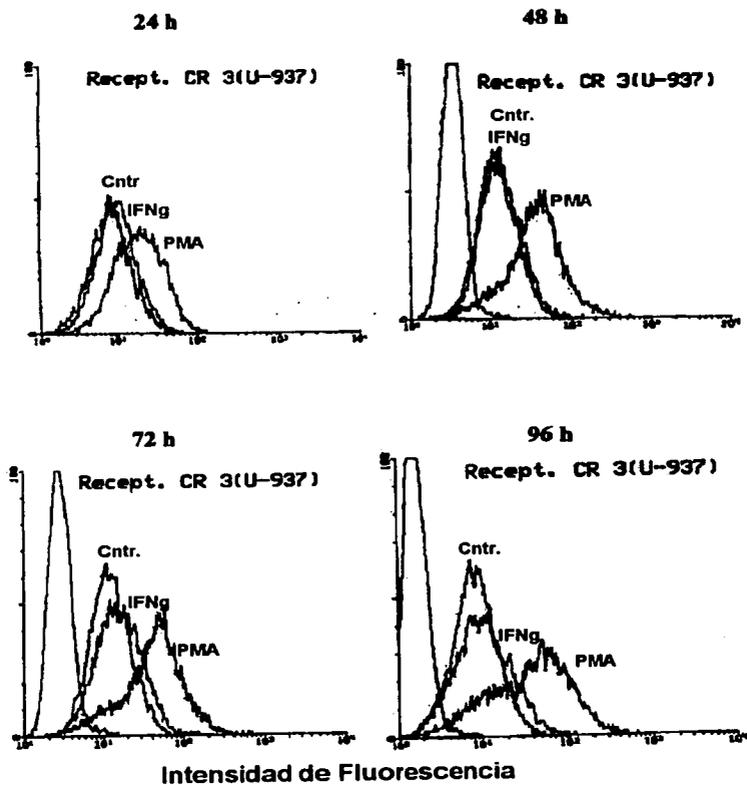


Figura 6B. Expresión del receptor CR3 en células U937

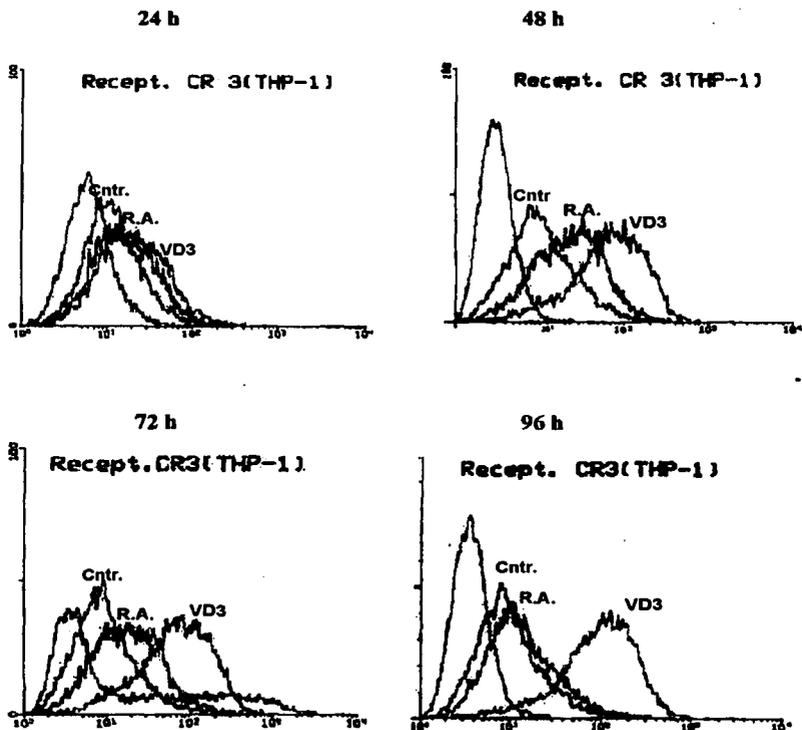


Fig. 6. Aumento en la expresión de CR3 por el efecto de los inductores de diferenciación. Los histogramas presentan el efecto de los diferentes inductores sobre la expresión del CR3 en las células THP-1 y U-937. Eje X: Intensidad de fluorescencia. Eje Y: Número de células. A. Células U-937 con tratamientos: PMA 50 nM, IFN- γ 100 U/mL. B. Células THP-1 con tratamientos: VD₃ 100 nM, RA 1 μ M.

La obtención de diferentes patrones de expresión de las moléculas de superficie mencionadas con los distintos tratamientos, implica que cada tratamiento provoca una diferenciación de la célula por rutas diferentes, lo que se refleja en el incremento/decremento de la expresión de ciertas moléculas y no de otras.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

Las células del linaje monocítico-macrófago presentan una gran heterogeneidad fenotípica, que sin duda está relacionada con las funciones específicas que va a desarrollar in vivo; esta heterogeneidad es el producto de la acción de diversas señales que afectan la célula, tanto por factores solubles propios (citocinas) o externos (moléculas microbianas), así como interacciones célula-célula. Esta heterogeneidad en las células del sistema fagocítico-mononuclear tiene gran importancia pues permite a la célula adquirir o incrementar sus capacidades, o bien modular negativamente otras, en respuesta a estímulos del microambiente en que se localice. Por otro lado, también hay evidencias de que el estadio de diferenciación puede determinar la permisividad para la infección por ciertos microorganismos patógenos, al observarse incremento en el número de células infectadas en estadios más diferenciados, como los macrófagos, por el aumento en la expresión de moléculas de superficie en comparación con los monocitos sin diferenciación (68). Así mismo, se ha demostrado que la capacidad de respuesta de las células monocíticas es dependiente del estadio de maduración en que se encuentren debido a las características fenotípicas y funcionales de cada población celular. Dicho efecto se observa en la inducción o regulación negativa de la expresión de moléculas inmunorreguladoras como el TNF- α en macrófagos, en donde la respuesta dependerá del agente inductor al que se encuentre sometido a reto (69).

Nuestro interés fue establecer y caracterizar modelos in vitro de diferenciación de células del linaje de monocitos-macrófagos, para estudiar posibles diferencias en los mecanismos de transducción de señales relacionadas o causados por el estado de diferenciación/maduración de la célula.

5.1 Efecto de la Diferenciación sobre la Proliferación Celular

Durante los procesos de inflamación aguda aumenta el número de monocitos circulantes y una gran porción de éstos migran al sitio de inflamación para posteriormente diferenciarse en macrófagos (70). Estos últimos, a diferencia de los macrófagos tisulares residentes, no poseen un potencial proliferativo y tienen una vida corta (71). Este fenómeno también ha sido observado *in vitro* durante la diferenciación de líneas celulares mielomonocíticas (72). Esta observación fue corroborada en nuestro trabajo con la inducción de las líneas celulares U-937 y THP-1 hacia procesos de diferenciación con distintos inductores.

En ambas líneas celulares se observó un decremento significativo ($P < 0.001$) de la proliferación celular durante el tratamiento con PMA 50 nM, dicho efecto fue evidente desde las 24 h de tratamiento obteniéndose el mayor efecto a las 120 h. Lo anterior concuerda con el estudio realizado por R. Hass y colaboradores donde demostró que la inducción con acetato de 13-tetradecanoil forbol (TPA) en células THP-1 y U-937 se caracteriza en parte por la aparición de fenotipos diferenciados y el detenimiento del crecimiento cuando las células detienen el ciclo celular en las fases G0-G1 entre las 24 y 36 h de tratamiento (73).

En las células THP-1 se hizo evidente, con la misma prueba estadística, que el tratamiento con IFN- γ (100U/mL) disminuye la proliferación celular, sin embargo no se pudo establecer relación alguna entre la respuesta y el tiempo de exposición al inductor. Durante el tratamiento se presentó una mortalidad celular, determinada por incorporación de azul tripán al interior de las células muertas, de aproximadamente 40%. La disminución en la proliferación celular asociada a la diferenciación se ha reportado también para las células U-937 (74); sin embargo no encontramos datos confiables en el tratamiento con dicha línea celular que permitieran concluir de efecto alguno sobre la proliferación celular.

El efecto del RA y VD₃ sobre la proliferación celular de las células THP-1 y U-937 no fue significativamente diferente respecto a las células sin tratamiento, estos resultados difieren de lo observado en ensayos donde la combinación de ambos dieron como resultado una sinergia de inhibición sobre el crecimiento celular de estas líneas celulares (75).

5.2 Efecto de los agentes Inductores de Diferenciación sobre la Morfología Celular

La morfología de ambas líneas celulares se vio alterada dramáticamente por el tratamiento con PMA (50 nM). Los cambios observados incluyen: aumento de tamaño celular, aparición de pseudópodos y adherencia a la superficie de cultivo (76), que corrobora las observaciones realizadas por M. Aepfelbacher donde al tratar células THP-1 y U-937 con éster de forbol encontró un incremento en CDC42 unido a membrana y se encontraba en estrecha relación con la adherencia y extensión celular sobre la superficie (77), además de un incremento vacuolar y morfología citoplásmica irregular (78). La respuesta fue mayor en las células THP-1 que en las U-937 probablemente debido a la activación de diferentes genes que regulan la expresión de proteínas específicas relacionadas con la adhesión celular, como se ha observado en las células resistentes a la diferenciación monocítica (79).

Aunque el cambio morfológico obtenido por el tratamiento con VD₃ en las células THP-1 fue más discreto, hay una clara diferenciación morfológica hacia macrófagos (80), aunque con una morfología diferente a la provocada por el PMA

(Fig.1). Sin embargo en las células U-937 este efecto no es concluyente a pesar de que se reporta como evidente en el trabajo realizado por M. Makishima.

Los demás tratamientos no provocaron un efecto considerable sobre la morfología de las células de ambas líneas; lo que concuerda con lo reportado por H. Hemmi durante el tratamiento de las células THP-1 con RA 10 nM al no observar cambios morfológicos aparentes; sin embargo en estas células hay claramente una diferenciación a un nivel funcional (81).

5.3 Efecto de los agentes Inductores de Diferenciación sobre Fagocitosis de Eritrocitos de Carnero

La fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG de conejo anti-DNP por las células U-937 se observa significativamente aumentada respecto al control al inducir la diferenciación con los tratamientos de VD₃ (100 nM) a partir de las 48 h y con RA 1 μM a partir de las 96 h. En contraste con estos resultados, como con los obtenidos por H. Schwende sobre diferenciación en células THP-1 tratadas con PMA y VD₃ (51), o con RA (81) las evidencias muestran que ninguno de los tratamientos realizados sobre las células THP-1 inducen un aumento estadísticamente significativo en la fagocitosis.

En ambas líneas celulares el tratamiento con PMA (50 nM) provocó una disminución considerable del proceso fagocítico desde las primeras 24 h de exposición al agente inductor, contrariamente a lo reportado por Schwende donde demuestra que células tratadas con PMA incrementan su actividad fagocítica.

5.4 Efecto de los agentes Inductores de Diferenciación sobre la expresión de Receptores

El efecto de los inductores de diferenciación sobre la actividad fagocítica de las células THP-1 y U-937 se enfocó a la relación directa entre esta actividad funcional y la inducción en la expresión de receptores para IgG (FcγRI, FcγRII y FcγRIII) y C3 (CR3). En el efecto inducido por el tratamiento con VD₃ se observó un aumento en la expresión del CR3 en ambas líneas celulares, pero no de los receptores FcγRI y FcγRII. Esto sugiere que, al no existir evidencia de incremento en la expresión de receptores para IgG tipo I y II, (ya que el receptor tipo III está ausente en células THP-1) es probable que el efecto sobre la fagocitosis dependa de otros factores bioquímicos. En este respecto, cabe mencionar que la fagocitosis basal de las células U-937 es más baja que en las THP-1, aunque el nivel de expresión de receptores para IgG no es muy diferente entre ambas. Esto apoya aún más la idea de que la capacidad fagocítica no depende únicamente del número de receptores, sino también de otros factores que la diferenciación afecta.

La expresión de los receptores CR3, Fc γ RI y Fc γ RII aumenta conforme al tiempo después del tratamiento con PMA en ambas líneas celulares, siendo sostenida para el primero, mientras que para los otros receptores solo se obtiene un máximo a las 48 h y después disminuye. Esto corrobora las observaciones realizadas por J. Auwerx, donde la expresión en células THP-1 de los receptores CR3, Fc γ RI y Fc γ RII después del tratamiento con PMA se desarrolla en un lapso de 48 h y posteriormente disminuye únicamente para los receptores Fc γ (14,82). El aumento y disminución en la expresión de estos receptores, no mostró efecto sobre la capacidad fagocítica.

El RA se reporta como un bloqueador de la formación de rosetas de eritrocitos (83) y por consecuencia un inhibidor de la fagocitosis en células THP-1 y U-937 cuando se encuentran en estadios de diferenciación tardíos; sin embargo se reporta como un inductor positivo de la inmunoeritrofagocitosis cuando se tratan las mismas líneas celulares en concentraciones de 10 nM o mayores (81).

5.5 Efecto de los agentes Inductores de Diferenciación sobre Enzimas Hidrolíticas

En reportes relacionados con la diferenciación de células monocíticas, se ha observado que el RA, VD3 y PMA provocan a las líneas celulares U-937 y THP-1 entrar en un proceso de diferenciación a macrófagos y como consecuencia un comportamiento diferente al de las células sin tratamiento. La liberación o aumento en la expresión de enzimas lisosomales son una característica importante del estado de maduración en el que se encuentran las células; ya que a medida que se encuentren más diferenciadas, dichas enzimas aumentarán su actividad para llevar a cabo la formación de fagolisosomas durante el proceso de fagocitosis.

El RA (1 μ M) aumenta significativamente la actividad de la β -glucuronidasa en las células U-937 a partir de las 72 h, mientras que en las células THP-1 no es evidente dicho cambio. Por su parte, el tratamiento con PMA (50 nM) es el que provoca un aumento en la actividad de la fosfatasa ácida en las células THP-1 a partir de las 96 h y no en las células U-937. Los demás tratamientos no muestran una actividad enzimática significativamente diferente a la de las células sin tratamiento.

5.6 Otros Efectos

El estallido respiratorio es otro de los parámetros que se han usado como indicativos de diferenciación celular, ya que los macrófagos aumentan su capacidad oxidativa durante la inflamación. Un método para medir este proceso es por medio de la reducción de NBT el cual es reducido a formazán que es un compuesto colorido que absorbe a 550 nm. En experimentos realizados encontramos que el tratamiento con PMA (50 nM) provocó un aumento considerable del estallido

respiratorio respecto al control en ambas líneas celulares (datos no mostrados), lo que concuerda con estudios realizados en los que se observan efectos similares en células THP-1 y U-937 (16 y 81).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las líneas celulares THP-1 y U-937 nos brindan modelos *in vitro* para estudiar y caracterizar los mecanismos involucrados con el proceso de diferenciación de células del sistema fagocítico mononuclear.

Las diferencias observadas en cada uno de los parámetros medidos con los diferentes tratamientos con inductores de diferenciación y la literatura reportada, indican que se obtuvieron poblaciones diferentes de células del sistema fagocítico mononuclear en diferentes estadios de diferenciación, lo que les otorgó distintas características evidenciadas por: cambios en la morfología, disminución de la proliferación, aumento/disminución en la expresión de moléculas de superficie (receptores), aumento en la actividad de enzimas lisosomales y aumento/disminución de funciones efectoras (capacidad fagocítica y reducción de NBT).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que las células del linaje mielomonocítico, a pesar de su origen poblacional común, se diferenciarán en poblaciones con características fenotípicas específicas dependiendo del microambiente en el que se encuentren, dado por la presencia de un sin número de inductores de diferenciación así como de activación celular, para establecer una respuesta definida a los diversos estímulos bajo la influencia que otorga el estado de diferenciación.

"En este momento no está resuelto, como el efecto final de tan interactuante red de mediadores en la célula se obtiene através de mecanismos diferentes o interactivos con los receptores y por las vías de transducción de señales intracelulares y se encuentra en espera de posterior investigación" (J.Auwerx (1991), de referencia 14).

Los modelos *in vitro* de diferenciación de estos tipos celulares serán, sin duda, invaluable para el estudio de estos mecanismos.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

La caracterización de los cambios fenotípicos que sufren las células monocíticas U-937 y THP-1 en un proceso de diferenciación in vitro, por la acción de diversos inductores de diferenciación; resultó en la obtención de poblaciones celulares con características diferentes a las células sin tratamiento. Dichas poblaciones resaltan que dependiendo del estímulo al que se vean sometidas las células monocíticas y del tiempo de estimulación habrá células diferentes (poblaciones intermedias) que muestren rutas diversas de internalización de la señal que les permitan ejecutar funciones diferentes. Dicha respuesta está directamente relacionada con el estado de diferenciación en el que se encuentren las células; y los cambios producidos ante un estímulo no necesariamente son comparables a los obtenidos con otro agente.

Con base en los resultados anteriores y por las evidencias en las características fenotípicas y funcionales distintas, podemos concluir que el proceso de diferenciación es sumamente dependiente del microambiente celular y que no es un fenómeno que ocurra en un solo paso.

Esto sugiere que los distintos agentes inducen poblaciones celulares diferentes según el tratamiento y el tiempo de exposición al mismo.

REFERENCIAS

1. Janeway Ch.A. and Travers P. (1996). The components of the immune system. In *Immunobiology: The immune system in health and disease*. (2nd edn). Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc. London-USA.
2. Janeway Ch.A. and Travers P. (1996). Principles of innate and adaptive immunity. In *Immunobiology: The immune system in health and disease*. (2nd edn). Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc. London-USA.
3. Silverstein A.M. (1989). A history of immunology. New York: Academic.
4. Janeway Ch.A. and Travers P. (1996). Recognition and effector mechanisms of adaptive immunity. In *Immunobiology: The immune system in health and disease*. (2nd edn). Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc. London-USA.
5. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Snyderman R. (1988). Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Raven-Press, New York.
6. Smith, L.R., Boost, K.L., and Blalock, J.E. (1987). Generation of idiotypic and anti-idiotypic antibodies by immunization with peptides encoded by complementary RNA: A possible molecular basis for the network theory. *J.Immunol.*, **138**:7-9.
7. Kiessling R., et.al. (1976). Non-T-cell resistance against a mouse Moloney lymphoma. *Int.J.Cancer*, **17**:1.
8. Unanue, E.R. (1994). Overview of the immune system. In *Sander's immunological diseases* (Vol.1-5th edn). (ed. Frank., M., Austen, K., Claman, H., and Unanue, E.)
9. Bordet, J., Gengou, O. (1901). Sur l'existence des substances sensitiltrices dans la plupart des serums antimicrobiennes. *Ann. Inst.Pasteur*, **15**:289.
10. Herman, A., et.al. (1992). Superantigens: Mechanism of T-cell stimulation and role of immune responses. *Ann.Rev.Immunol.* **9**:745.
11. Janeway Ch.A. and Travers P. (1996). The generation of T-cell ligands. In *Immunobiology: The immune system in health and disease*. (2nd edn). Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc. London-USA.
12. Douglas, S.D. and Hassan, N.F. (1990). Morphology of monocytes and macrophages. In *Haematology* (4th edn), (ed. Williams,W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., and Lichtman M.A.). Mc Graw-Hill, New York.
13. Goldman, J.M. (1989). Granulocytes, monocytes and their benign disorders. In *Postgraduate haematology* (ed. Hoffbrand, A.V. and Lewis, S.M.). Heinemann, Oxford.
14. Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, **47**:22-29.
15. Van Furth, R. (1998). Phagocytic cells: Development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, (ed. Gallin, J.I.,

- Goldstein, I.M. and Snyderman R.) Raven-Press, New York.
16. Van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, **128**:415-435.
 17. Van Furth, R., Van der Meer, J.W.M., Toivonen, H., and Rytomaa, T. (1983). Kinetic analysis of the growth of bone marrow mononuclear phagocytes in long term cultures. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **34**:227-234.
 18. Auger, M.J., and Ross, R.A. (1992). The biology of the macrophage. In *The macrophage: The natural immune system*. (ed. Lewis, C.E. and McGee J.O'D). Oxford University Press, New York.
 19. Indik, Z.K., Hunter, S., et al. (1994). The high affinity Fc γ receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: The γ subunit of Fc γ RIIIA imparts phagocytic function to Fc γ RI. *Exp. Haematol.*, **22**: 599-606
 20. Mitchell, M.A., Huang, M.M., Chien, P., Indik, Z.K., Pan, Q.X., and Schreiber A.D. (1994). Substitutions and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc γ RIIIA: Effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis. *Blood*, **84**: 1753-59.
 21. Keegan A.D., and Paul W.E. (1992). Multichain immune recognition receptors: Similarities in structure and signaling. *Immunol. Today*, **13**: 63-68
 22. Ghazizadesh, S., Bolen J., and Fleit, H.B. (1994). Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.*, **269**:8878-84.
 23. Ghazizadesh, S., Bolen J., and Fleit, H.B. (1995). Tyrosine phosphorylation and association of Syk with Fc γ RII in monocytic THP-1 cells. *Biochem. J.*, **305**:669-74.
 24. Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature (London)*, **338**:383-84.
 25. Ortega, E. (1995). How do multichain immune recognition receptors signal? A structural hypothesis. *Mol. Immunol.*, **32**:941-45.
 26. Thomas, E.D., Ramberg, R.E., Sale, G.E., Sparkes, R.S., and Golde, D.W. (1976). Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science*, **192**:1016-18.
 27. Fuller, G.M., Bunzel, R.J., Woloski, B.M., and Nham, S-U. (1987). Isolation of hepatocyte stimulation factor from human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**:1003-9.
 28. Buckley, P.J., Smith, M.R., Braverman, M.F., and Dickinson, S.A. (1987). Human spleen contains phenotypic subsets of macrophages and dendritic cells that occupy discrete microanatomic locations. *Am. J. Pathol.*, **128**:505-20.
 29. Crocker, P.R., Morris, L., and Gordon, S. (1988). Novel cell surface adhesion receptors involved in interactions between stromal macrophages and haematopoietic cells. *J. Cell Sci.*, **9** (Suppl.):185-206.
 30. Metchnikoff, E. (1968), Lectures on the comparative pathology of inflammation. Dover Publications, New York - USA.
 31. Edwards, R.L., et al. (1987). Activation of blood coagulation in Crohn's

- disease. Increased plasma fibrinopeptide A levels and enhanced generation of monocyte tissue factor activity. *Gastroenterology*, **92**:329-37.
32. Nawroth, P.P., and Stern, D.M. (1986). Modulation of endothelial cell haemostatic properties by tumour necrosis factor. *J.Exp.Med.*, **163**:740-5.
 33. Kay, M.M.B. (1975). Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **72**:3521-25.
 34. Lasser, A. (1983). The mononuclear phagocyte system: a review. *Hum.Pathol.*, **14**:108-26.
 35. Werb, Z., and Gordon, S. (1975). Secretion of a specific collagenase by stimulated macrophages. *J.Exp.Med.*, **142**:346-60.
 36. Werb, Z., and Gordon, S. (1975). Elastase secretion by stimulated macrophage: Characterization and regulation. *J.Exp.Med.*, **142**:361-77.
 37. Nathan, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. *J.Clin.Invest.*, **55**:338-46.
 38. Rocklin, R.E., Benzden, K., and Greineder, D. (1980). Mediators of immunity: Lymphokines and monokines. *Adv.Immunol.*, **29**:55-136.
 39. Babior, B.M. (1984). The respiratory burst of phagocytes. *J.Clin.Invest.*, **73**:599-601.
 40. Gabig, T.G., and Babior, B.M. (1981). The killing of pathogens by phagocytes. *Ann.Rev.Med.*, **32**:313-26.
 41. Blussé van Oud Alblas, A., and Van Furth, R. (1979). The origin, kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J.Exp.Med.*, **149**:1504-18.
 42. Issekutz, T.B., Issekutz, A.C., and Movat, H.Z. (1981). The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. *Am.J.Pathol.*, **103**:47-55.
 43. Boros, D.L. (1978). Granulomatous inflammations. *Prog.Allergy*, **24**:183-267.
 44. Chambers, T.J. (1978). Multinucleated giant cells. *J.Pathol.*, **126**:125-148.
 45. Adams, D.O., and Hamilton, T.A. (1984). The cell biology of the macrophage activation. *Ann.Rev.Immunol.*, **2**:283-318.
 46. Somers, S.D., Johnson, W.J., and Adams, D.O. (1986). Destruction of tumor cells by macrophages: Mechanisms of recognition and lysis and their regulation. In *Basic and clinical tumor immunology* (ed. Herberman, R.), pp.69-122.
 47. Adams, D.O., and Koerner, T.J. (1988). Gene regulation in macrophage development and activation. *Year Immunol.*, **4**:159-80.
 48. Adams, D.O., and Hamilton T.A. (1992). Molecular basis of macrophage activation: Diversity and its origins. In *The macrophage: The natural immune system*. (ed. Lewis, C.E. and McGee J.O'D). Oxford University Press, New York.
 49. Adams, D.O., Johnson, S.P., and Uhing, R.J. (1990). Early gene expression in the activation of mononuclear phagocytes. In *Current topics in membranes and transport*, Vol.35 (ed. Grinstein, S., and Rotstein, O.D.), pp.349-74. Academic Press, New York.

50. Vey, E., Zhang, J.H., and Dayer, J.M. (1992). IFN- γ and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T-cells. *J.Immunol.*, **149**:2040-46.
51. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., and Dieter, P. (1996). Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1.25-dihydroxyvitamin D $_3$. *J.Leuk.Biol.*, **59**:555-61.
52. Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur.J.Immunol.*, **28**:359-69.
53. Voet, D., and Voet, J.G. (1995). Biochemical Communications: Hormones and Neurotransmission. In *Biochemistry* (2nd edn.). John Wiley and Sons, Inc. USA.
54. Voet, D., and Voet, J.G. (1995). Control of eukaryotic translation. In *Biochemistry* (2nd edn.). John Wiley and Sons, Inc. USA.
55. Hall A. (1994). A biochemical function for ras--at last. *Science* **3:264(5164):1413-4**
56. Shuai, K., Horvath, C.M., Tsai Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D., and Darnell, J.E. Jr. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, **76**:821-28.
57. Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, **56**:335-44.
58. Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, **83**:835-39.
59. Voet, D., and Voet, J.G. (1995). Eukaryotic gene expression: Cell differentiation. In *Biochemistry* (2nd edn.). John Wiley and Sons, Inc. USA.
60. Auwerx, J., Staels, B., Van Vaeck, F., Verhoeven, G., and Ceuppens, J. (1991) IgG Fc receptor expression during macrophage differentiation of the monocytic leukemia cell line, THP-1. *Leuk Res* **16(3)**: 317-327.
61. Breitmann, T., Selonick, S., Collins, S. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc.Natl. Acad. Sci.*, **77**:2936-40.
62. Drach, J., Lopez-Berestein, G., McQueen, T., Andreeff, M., and Mehta, K. (1993). Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res.*, **53**:2100-04.
63. N'Diaye, E-N., Vassiere, C., Gonzalez-Christen, J., Grégoire, C., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (1997). Expression of NADPH oxidase is induced by all-trans retinoic acid but not by phorbol myristate acetate and 1.25 dihydroxyvitamin D $_3$ in the human promyelocytic cell line NB4. *Leukemia*, **11**:2131-36.
64. Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and

- activation of protein kinase C. *Science*, **258**: 607-14.
65. Dodd, R.C., Cohen, M.S., Newman, S.L., and Gray, T.K. (1983). Vitamin D metabolites change the phenotype of monoblastica U-937 cells. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, **80**:7538.
 66. Rook, G.A.W., Steele, J., Fraher, L., Barker, S., Karmali, R., O'Riordan, J., and Stanford, J. (1986). Vitamin D₃, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology*, **57**:159.
 67. Roux-Lombard, P., Cruchaud, A., and Dayer, J.M., (1986). Effect of interferon γ and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on superoxide anion, prostaglandin E₂, and mononuclear cell factor production by U-937. *Cell Immunol.*, **97**:286.
 68. Bosque F., Milon G, Valderrama L, Saravia NG (1998). Permissiveness of human monocytes and monocyte derived macrophages to infection by promastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis*. *J Parasitol*, **84(6)**:1250-6.
 69. Caron E, Peyrard T, Kohler S, Cabane S, Liautard JP, Dornand J 1994. Live *Brucella* spp. Fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U-937 derived phagocytes. *Infect Immun* **62(12)**:5267-74
 70. Van Furth R (1985). Monocyte production during inflammation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **8(2)**: 205-11.
 71. Takahashi K, Naito M, Takeya M (1996). Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int* **46(7)**: 473-85.
 72. Nagata Y, Diamond B, Bloom BR (1983). The generation of human monocyte/macrophage cell lines. *Nature*, **8-14**; **306(5943)**:597-9.
 73. Hass R, Gunji H, Datta R, Kharbanda S, Hartmann A, Weichselbaum R, Kufe D, (1992). Differentiation and retordifferentiation of human myeloid leukemia cells is associated with reversible induction of cell cycle-regulatory genes. *Cancer Res.* **15**; **52(6)**: 1445-50.
 74. A. Sedo et.al. *Immunol Lett* (1996) Nov; **53(2-3)**:125-30.
 75. Defaque H, Dornand J, Commes T, Cabane S, Sevilla C, Marti J, (1994). Different combinations of retinoids and vitamin D₃ analogs efficiently promote growth inhibition and differentiation of myelomonocytic leukemia cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* **271(1)**: 193-199.
 76. Drexler HG, Otsuka K, Gaedicke G, Minowada J, (1986). Changes in isoenzyme profiles during induction of differentiation in human myelomonocytic leukemia cell lines. *Cancer Res*, **46(12 Pt 1)**: 6078-82.
 77. Aepfelbacher M, Vauti F, Weber PC, Glomset JA, (1994). Spreading of differentiating human monocytes is associated with a major increase in membrane-bound CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A* **10**; **91(10)**: 4263-74
 78. Prieto J, Eklund A, Patarroyo M, (1994). Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol*, **156(1)**: 191-211.
 79. Stock, A. et.al. *Chem.* **39** (1926) 466-468.
 80. Makishima M, Kanatani Y, Yamamoto-Yamaguchi Y, Honna Y, (1996).

Enhancement of activity of lalpha. 25-dihydroxyvitamin D3 for growth inhibition and differentiation induction of humanmyelomonocytic leukemia cells by tretinoin tocoferil, an alpha-tocopherol ester of all-trans retinoic acid.*Blood* 15;**87(8)**: 3384-3394.

81. Hemmi H, Breitman TR (1985). Induction of functional differentiation of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) by retinoic acid and cholera toxin. *Jpn J Cancer Res* 76**(5)**: 345-51.
82. Auwerx J, Staels B, Van Vaeck F, Ceuppens JI, (1992). Changes in IgG Fc receptor expression induced by phorbol 12-myristate 13-acetate treatment of THp-1 monocytic leukemia cells. *Leuk Res* 16**(3)**: 317-327.
83. Nakamura T, Hemmi H, (1988). Retinoic acid regulates IgG Fc receptor expression in human myelomonocytic leukemia cells and normal peropheral monocytes. *Eur J Haematol* 41**(3)**: 258-266.

APENDICE II

Preparación de Soluciones

Aceto-miristato de forbol (PMA) 50 μ M.

PMA P8139-Sigma	1 mg
DMSO.....	1.62 mL Stock 1
PMA 1 mM.....	100 μ L
DMEM 10% SFB.....	2 mL Stock 2

All- trans-ácido retinóico (RA) 1 mM

RA 554720 Calbiochem.....	6.83 mg
Etanol 96 %.....	22.73 mL Stock

Amortiguador de acetatos pH 4.5 (Tritón 0.05%) β -glucuronidasa (1).

Acetato de sodio	0.579 g.
Acido acético glacial	325 μ L
Tritón X-100.....	50 μ L
Agua desionizada	aforar a 100 mL.
Ajustar pH con NaOH dil.	

Amortiguador de acetatos pH 4.5 (Ac. Acético 0.1M, Tritón 0.05%) fosfatasa ácida (2).

Acetato de sodio	0.579 g.
Acido acético glacial	600 μ L.
Tritón X-100.....	50 μ L
Agua desionizada	aforar a 100 mL.
Ajustar pH con NaOH dil.	

Amortiguador de fosfatos (PBS)

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O.....	7.2 g
Na ₂ HPO ₄ anh.....	22 g
ó Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	55.418g
NaCl.....	175g
Agua desionizada.....	aforar a 1000 mL(PBS 20X)
Ajustar pH=7.5 con lentejas de NaOH	
PBS 20X.....	10 mL
Agua desionizada.....	aforar a 200 mL (PBS 1X)

Amortiguador para lavados - SFB 5% y Azida de Sodio 0.1% en PBS
 Suero Fetal Bovino..... 10 mL
 Azida de Sodio..... 10 g
 Solución buffer de fosfatos.....aforar a 100 mL
 Filtrar con membrana de 0.45 μ m. No usar después de 48 h.

Amortiguador de boratos
 Acido bórico.....12.3688 g
 NaCl..... 8.766 g
 Agua desionizada.....aforar a 1000 mL
 Ajustar pH = 8.5

Anticuerpos anti-receptor
 Concentración de anticuerpo μ g/ μ L x 5 μ g = Volumen de anticuerpo
 requerido(μ L).

Cloruro de amonio 0.08M (NH₄Cl) pH 7.2
 NH₄Cl..... 0.424 g
 Agua desionizada.....aforar a 100 mL
 Ajustar pH con HCl diluido

1- α ,2-dihidroxi vitamina D₃ (VD₃) 100 μ M
 VD₃ 679102 Calbiochem..... 50 μ g
 Etanol 96%.....1.19 mL Stock

Dodecil sulfato de sodio en PBS 0.3% (SDS)
 Dodecilsulfato de sodio (SDS)..... 30 g
 PBS..... aforar a 100 mL (Stock)
 SDS 3%..... 10 mL
 PBS..... aforar a 100 mL

Hidróxido de sodio 0.2 M
 Hidróxido de sodio.....8 g
 Agua desionizada.....aforar a 200 mL (Stock)
 Hidróxido de sodio 1 M.....20 mL
 Agua desionizada.....aforar a 100 mL

Hidróxido de sodio 2 N
 Hidróxido de sodio.....8 g
 Agua desionizada.....aforar a 100 mL

IgG anti-DNP para opsonización:

Título de hemaglutinación ($\mu\text{g}/\text{mL}$) x Vol. de GRc 1% a opsonizar (mL) =
 μg de anticuerpo anti-DNP.

Vol. de anticuerpo = $\frac{\mu\text{g de anticuerpo anti-DNP}}{\text{Concentración de anticuerpo anti-DNP}}$.

Interferon gamma humano (IFN- γ) 1×10^5 U/ml

IFN- γ P1585 Gibco.....	500,000 U (0.05 mg)
Agua destilada.....	500 μL Stock 1
IFN- γ 1×10^6 U/mL.....	100 μL
DMEM 10% SFB.....	1 mL Stock 2

Medio DMEM sin complementar

Medio D-MEM deshidratado.....	1 sobre
Bicarbonato de sodio.....	3.7 g
Agua desionizada.....	aforar a 1 L

Ajustar pH 7.1 - 7.2 con HCl 1N.
Filtrar en esterilidad con membrana de 0.22 μm

Medio RPMI sin complementar

Medio RPMI deshidratado.....	1 sobre
Bicarbonato de sodio.....	2.2 g
Hepes.....	5.97 g
Mercaptoetanol (1:100).....	357.8 μL
Agua desionizada.....	aforar a 1 L

Ajustar pH 7.4 - 7.6 con NaOH 2N.
Filtrar en esterilidad con membrana de 0.22 μm

Medio DMEM o RPMI complementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%

Para 500 mL de medio	
SFB.....	50 mL
Mezcla de antibióticos (100X).....	5 mL
Glutamina (100X).....	5 mL
Aminoácidos no esenciales (100X).....	5 mL
Piruvato (100X).....	5 mL

p-nitrofenil- β -D-glucurónido 0.01 M (Sustrato para β -glucuronidasa)
p-nitrofenil- β -D-glucurónido.....3.152 mg
Agua desionizada.....1 mL

p-nitrofenil fosfato disódico.6H₂O, 4.5 mM (Sustrato de fosfatasa ácida)
p-nitrofenil disódico.6H₂O.....1.184 mg
Buffer de acetatos (2).....1 mL

Solución de Alsevers estéril

Dextrosa.....10.25 g
NaCl.....2.1 g
Citrato de sodio dihidratado.....4.0 g
Ac. Cítrico.monohidratado.....0.275 g
Agua destilada.....aforar a 500 mL
Ajustar pH 6.0 - 6.2 .
Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μ m

Solución DGVB estéril

Gelatina.....0.25 g
Barbital.....0.23 g
Dextrosa.....12.5 g
NaCl.....2.1 g
CaCl₂ 1 M.....75 μ L
MgCl₂ 1M.....250 μ L
Agua desionizada.....aforar a 500 mL
Ajustar pH = 7.5

Solución de Diaminobencidina/H₂O₂ en PBS (DAB)

DAB.....4 mg
H₂O₂ 30%.....120 μ L
PBS.....aforar a 10 mL

Solución fijadora de paraformaldehído 1% en PBS

- a) Determinar el volumen a utilizar de paraformaldehído y preparar una solución de paraformaldehído al 1% en PBS.
- b) Disolver en poco volumen de PBS la cantidad calculada de paraformaldehído, mantener la solución a baño María (agua caliente) y agitación constante.
- c) Agregar NaOH para terminar de disolver.
- d) Ajustar el pH a 7.5 con HCl.
- e) Ajustar el volumen para obtener la solución al 1%.
- f) Filtrar con membrana 0.45.

Solución de Hank's

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1.85 g
MgSO ₄	0.97 g
KCl.....	4 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
NaCl.....	80 g
Na ₂ HPO ₄	0.47 g
Agua desionizada.....	aforar a 1L (Stock 10X)
Hank's 10X.....	10 mL
Agua desionizada.....	aforar a 100 mL(1X)

Solución de Hank's Completo

Albumina sérica bovina (BSA).....	1 g
Glucosa.....	1 g
Hepes.....	2 mL de solución Stock 1M

Solución de Lisis Tritón 1 %

Tritón X-100.....	1 mL
Agua desionizada	aforar a 100 mL

Solución de TNBS/Buffer de boratos para Sensibilización

Por cada 1 mL de GRc obtenido en el pellet:

TNBS.....	12.44 mg
Buffer de Boratos.....	7 mL

Tripsina 0.25%, EDTA 10 mM

Solución de Hank's balanceada

sin Ca ²⁺ ni Mg ²⁺ pH 7.4.....	10 mL
Tripsina.....	0.025 g
EDTA 0.5 M (50 X).....	100 µL

APENDICE II

Preparación de Soluciones

Aceto-miristato de forbol (PMA) 50 μ M.

PMA P8139-Sigma	1 mg
DMSO.....	1.62 mL Stock 1
PMA 1 mM.....	100 μ L
DMEM 10% SFB.....	2 mL Stock 2

All- trans-ácido retinóico (RA) 1 mM

RA 554720 Calbiochem.....	6.83 mg
Etanol 96 %.....	22.73 mL Stock

Amortiguador de acetatos pH 4.5 (Tritón 0.05%) β -glucuronidasa (1).

Acetato de sodio	0.579 g.
Acido acético glacial	325 μ L
Tritón X-100.....	50 μ L
Agua desionizada	aforar a 100 mL.
Ajustar pH con NaOH dil.	

Amortiguador de acetatos pH 4.5 (Ac. Acético 0.1M, Tritón 0.05%) fosfatasa ácida (2).

Acetato de sodio	0.579 g.
Acido acético glacial	600 μ L.
Tritón X-100.....	50 μ L
Agua desionizada	aforar a 100 mL.
Ajustar pH con NaOH dil.	

Amortiguador de fosfatos (PBS)

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	7.2 g
Na ₂ HPO ₄ anh.....	22 g
ó Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	55.418g
NaCl.....	175g
Agua desionizada.....	aforar a 1000 mL(PBS 20X)
Ajustar pH=7.5 con lentejas de NaOH	
PBS 20X.....	10 mL
Agua desionizada.....	aforar a 200 mL (PBS 1X)

Amortiguador para lavados - SFB 5% y Azida de Sodio 0.1% en PBS
Suero Fetal Bovino..... 10 mL
Azida de Sodio..... 10 g
Solución buffer de fosfatos..... aforar a 100 mL
Filtrar con membrana de 0.45 μ m. No usar después de 48 h.

Amortiguador de boratos
Acido bórico.....12.3688 g
NaCl..... 8.766 g
Agua desionizada.....aforar a 1000 mL
Ajustar pH = 8.5

Anticuerpos anti-receptor
Concentración de anticuerpo μ g/ μ L x 5 μ g = Volumen de anticuerpo
requerido(μ L).

Cloruro de amonio 0.08M (NH_4Cl) pH 7.2
 NH_4Cl 0.424 g
Agua desionizada.....aforar a 100 mL
Ajustar pH con HCl diluído

1- α ,2-dihidroxi vitamina D_3 (VD_3) 100 μ M
 VD_3 679102 Calbiochem..... 50 μ g
Etanol 96%.....1.19 mL Stock

Dodecil sulfato de sodio en PBS 0.3% (SDS)
Dodecilsulfato de sodio (SDS)..... 30 g
PBS..... aforar a 100 mL (Stock)
SDS 3%..... 10 mL
PBS..... aforar a 100 mL

Hidróxido de sodio 0.2 M
Hidróxido de sodio.....8 g
Agua desionizada.....aforar a 200 mL (Stock)
Hidróxido de sodio 1 M.....20 mL
Agua desionizada.....aforar a 100 mL

Hidróxido de sodio 2 N
Hidróxido de sodio.....8 g
Agua desionizada.....aforar a 100 mL

IgG anti-DNP para opsonización:

Título de hemaglutinación ($\mu\text{g}/\text{mL}$) x Vol. de GRc 1% a opsonizar (mL) =
 μg de anticuerpo anti-DNP.

Vol. de anticuerpo = $\frac{\mu\text{g de anticuerpo anti-DNP}}{\text{Concentración de anticuerpo anti-DNP}}$.

Interferon gamma humano (IFN- γ) 1×10^5 U/ml

IFN- γ P1585 Gibco..... 500,000 U (0.05 mg)
Agua destilada..... 500 μL Stock 1
IFN- γ 1×10^6 U/mL..... 100 μL
DMEM 10% SFB..... 1 mL Stock 2

Medio DMEM sin complementar

Medio D-MEM deshidratado..... 1 sobre
Bicarbonato de sodio..... 3.7 g
Agua desionizada..... aforar a 1 L
Ajustar pH 7.1 - 7.2 con HCl 1N.
Filtrar en esterilidad con membrana de 0.22 μm

Medio RPMI sin complementar

Medio RPMI deshidratado..... 1 sobre
Bicarbonato de sodio..... 2.2 g
Hepes..... 5.97 g
Mercaptoetanol (1:100)..... 357.8 μL
Agua desionizada..... aforar a 1 L
Ajustar pH 7.4 - 7.6 con NaOH 2N.
Filtrar en esterilidad con membrana de 0.22 μm

Medio DMEM o RPMI complementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%

Para 500 mL de medio
SFB..... 50 mL
Mezcla de antibióticos (100X)..... 5 mL
Glutamina (100X)..... 5 mL
Aminoácidos no esenciales (100X)..... 5 mL
Piruvato (100X)..... 5 mL

p-nitrofenil- β -D-glucurónido 0.01 M (Sustrato para β -glucuronidasa)
 p-nitrofenil- β -D-glucurónido.....3.152 mg
 Agua desionizada.....1 mL

p-nitrofenil fosfato disódico.6H₂O, 4.5 mM (Sustrato de fosfatasa ácida)
 p-nitrofenil disódico.6H₂O.....1.184 mg
 Buffer de acetatos (2).....1 mL

Solución de Alsevers estéril

Dextrosa.....10.25 g
 NaCl.....2.1g
 Citrato de sodio dihidratado.....4.0 g
 Ac. Cítrico.monohidratado.....0.275 g
 Agua destilada.....aforar a 500 mL
 Ajustar pH 6.0 - 6.2 .
 Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μ m

Solución DGVB estéril

Gelatina.....0.25 g
 Barbital.....0.23 g
 Dextrosa.....12.5 g
 NaCl.....2.1 g
 CaCl₂ 1 M.....75 μ L
 MgCl₂ 1M.....250 μ L
 Agua desionizada.....aforar a 500 mL
 Ajustar pH = 7.5

Solución de Diaminobencidina/H₂O₂ en PBS (DAB)

DAB.....4 mg
 H₂O₂ 30%.....120 μ L
 PBS.....aforar a 10 mL

Solución fijadora de paraformaldehído 1% en PBS

- a) Determinar el volumen a utilizar de paraformaldehído y preparar una solución de paraformaldehído al 1% en PBS.
- b) Disolver en poco volumen de PBS la cantidad calculada de paraformaldehído, mantener la solución a baño María (agua caliente) y agitación constante.
- c) Agregar NaOH para terminar de disolver.
- d) Ajustar el pH a 7.5 con HCl.
- e) Ajustar el volumen para obtener la solución al 1%.
- f) Filtrar con membrana 0.45.

Solución de Hank's

CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	1.85 g
MgSO ₄	0.97 g
KCl.....	4 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
NaCl.....	80 g
Na ₂ HPO ₄	0.47 g
Agua desionizada.....	aforar a 1L (Stock 10X)
Hank's 10X.....	10 mL
Agua desionizada.....	aforar a 100 mL(1X)

Solución de Hank's Completo

Albumina sérica bovina (BSA).....	1 g
Glucosa.....	1 g
Hepes.....	2 mL de solución Stock 1M

Solución de Lisis Tritón 1 %

Tritón X-100.....	1 mL
Agua desionizada	aforar a 100 mL

Solución de TNBS/Buffer de boratos para Sensibilización

Por cada 1 mL de GRc obtenido en el pellet:

TNBS.....	12.44 mg
Buffer de Boratos.....	7 mL

Tripsina 0.25%, EDTA 10 mM

Solución de Hank's balanceada

sin Ca ²⁺ ni Mg ²⁺ pH 7.4.....	10 mL
Tripsina.....	0.025 g
EDTA 0.5 M (50 X).....	100 µL

APENDICE I

ANALISIS ESTADÍSTICOS

Determinación de Proliferación en Células U-937
Determinación de Proliferación en Células THP-1
Determinación de Actividad de β -glucuronidasa en Células U-937
Determinación de Actividad de Fosfatasa Acida en Células THP-1
Determinación de Fagocitosis en Células U-937

Determinación de Proliferación en Células U-937

ONE WAY ANALYSIS OF VARIANCE:

Input Columns:

RA24 , RA48 , RA72 , RA96 , VD324 , VD348 , VD372 , VD3120 , PMA24 , PMA48 ,
 PMA72 , PMA96 , PMA120 , IFN24 , IFN48 , IFN72 , IFN96 , IFN120 , RAVD324 ,
 RAVD348 , RAVD372

Normality Test: Failed (P = 0.048)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.431)

Group	N	Mean	Std Dev	SEM
RA24	9	92.222	14.8221	4.9407
RA48	10	78.9	18.4418	5.8313
RA72	9	72.556	30.3361	10.112
RA96	3	69	32.078	18.5203
VD324	8	101.875	24.3512	8.6095
VD348	10	83.3	15.5496	4.9172
VD372	6	93.833	25.119	10.2548
VD3120	2	91	39.598	28
PMA24	9	66	12.7475	4.2492
PMA48	10	62.8	23.9342	7.5686
PMA72	8	40.875	15.9592	5.6424
PMA96	4	27	7.3937	3.6968
PMA120	3	22.333	4.6188	2.6667
IFN24	3	114	23.6432	13.6504
IFN48	2	138	25.4558	18
IFN72	2	58.5	2.1213	1.5
IFN96	2			
IFN120	2			
RAVD324	3			
RAVD348	3			
RAVD372	2			

IFN96	101.5	6.364	4.5
IFN120	76.5	10.6066	7.5
RAVD324	101.667	1.5275	0.8819
RAVD348	99.333	13.2035	7.6231
RAVD372	100	32.5269	23

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	20	60251.9025	3012.5951	7.233	< 0.001
Residual	89	37068.4611	416.4996		
Total	109	97320.3636			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P < 0.001$). To isolate which group(s) differ from the others, use a multiple comparison procedure

All Pairwise Multiple Comparisons: (Bonferroni t-test method)

Comparison	Diff of Mean	t	P < 0.05				
IFN48	vs	PMA120	1.16E+02	6.209	Yes		
IFN48	vs	PMA96	1.11E+02	6.28	Yes		
IFN48	vs	PMA72	97.125	6.02	Yes		
IFN48	vs	IFN72	79.5	3.895	Yes		
IFN48	vs	PMA48	75.2	4.757	Yes		
IFN48	vs	PMA24	72	4.513	Yes		
IFN48	vs	RA96	69	3.704	No		
IFN48	vs	RA72	65.444	Do	not	test	
IFN48	vs	IFN120	61.5	Do	not	test	
IFN48	vs	RA48	59.1	Do	not	test	
IFN48	vs	VD348	54.7	Do	not	test	
IFN48	vs	VD3120	47	Do	not	test	
IFN48	vs	RA24	45.778	Do	not	test	
IFN48	vs	VD372	44.167	Do	not	test	
IFN48	vs	RAVD348	38.667	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
IFN48	vs	RAVD372	38	Do	not	test	
IFN48	vs	IFN96	36.5	Do	not	test	
IFN48	vs	RAVD324	36.333	Do	not	test	
IFN48	vs	VD324	36.125	Do	not	test	
IFN48	vs	IFN24	24	Do	not	test	
IFN24	vs	PMA120	91.667	5.501	Yes		
IFN24	vs	PMA96	87	5.582	Yes		
IFN24	vs	PMA72	73.125	5.293	Yes		
IFN24	vs	IFN72	55.5	2.979	No		
IFN24	vs	PMA48	51.2	Do	not	test	
IFN24	vs	PMA24	48	Do	not	test	
IFN24	vs	RA96	45	Do	not	test	
IFN24	vs	RA72	41.444	Do	not	test	
IFN24	vs	IFN120	37.5	Do	not	test	
IFN24	vs	RA48	35.1	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05

IFN24	vs	VD348	30.7	Do	not	test	
IFN24	vs	VD3120	23	Do	not	test	
IFN24	vs	RA24	21.778	Do	not	test	
IFN24	vs	VD372	20.167	Do	not	test	
IFN24	vs	RAVD348	14.667	Do	not	test	
IFN24	vs	RAVD372	14	Do	not	test	
IFN24	vs	IFN96	12.5	Do	not	test	
IFN24	vs	RAVD324	12.333	Do	not	test	
IFN24	vs	VD324	12.125	Do	not	test	
VD324	vs	PMA120	79.542		5.757	Yes	
VD324	vs	PMA96	74.875		5.991	Yes	
VD324	vs	PMA72	61		5.978	Yes	
VD324	vs	IFN72	43.375	Do	not	test	
VD324	vs	PMA48	39.075	Do	not	test	
VD324	vs	PMA24	35.875	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
VD324	vs	RA96	32.875	Do	not	test	
VD324	vs	RA72	29.319	Do	not	test	
VD324	vs	IFN120	25.375	Do	not	test	
VD324	vs	RA48	22.975	Do	not	test	
VD324	vs	VD348	18.575	Do	not	test	
VD324	vs	VD3120	10.875	Do	not	test	
VD324	vs	RA24	9.653	Do	not	test	
VD324	vs	VD372	8.042	Do	not	test	
VD324	vs	RAVD348	2.542	Do	not	test	
VD324	vs	RAVD372	1.875	Do	not	test	
VD324	vs	IFN96	0.375	Do	not	test	
VD324	vs	RAVD324	0.208	Do	not	test	
RAVD324	vs	PMA120	79.333		4.761	Yes	
RAVD324	vs	PMA96	74.667		4.79	Yes	
RAVD324	vs	PMA72	60.792		4.4	Yes	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
RAVD324	vs	IFN72	43.167	Do	not	test	
RAVD324	vs	PMA48	38.867	Do	not	test	
RAVD324	vs	PMA24	35.667	Do	not	test	
RAVD324	vs	RA96	32.667	Do	not	test	
RAVD324	vs	RA72	29.111	Do	not	test	
RAVD324	vs	IFN120	25.167	Do	not	test	
RAVD324	vs	RA48	22.767	Do	not	test	
RAVD324	vs	VD348	18.367	Do	not	test	
RAVD324	vs	VD3120	10.667	Do	not	test	
RAVD324	vs	RA24	9.444	Do	not	test	
RAVD324	vs	VD372	7.833	Do	not	test	
RAVD324	vs	RAVD348	2.333	Do	not	test	
RAVD324	vs	RAVD372	1.667	Do	not	test	
RAVD324	vs	IFN96	0.167	Do	not	test	
IFN96	vs	PMA120	79.167		4.249	Yes	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
IFN96	vs	PMA96	74.5		4.215	Yes	
IFN96	vs	PMA72	60.625		3.758	No	
IFN96	vs	IFN72	43	Do	not	test	
IFN96	vs	PMA48	38.7	Do	not	test	

IFN96	vs	PMA24	35.5	Do	not	test	
IFN96	vs	RA96	32.5	Do	not	test	
IFN96	vs	RA72	28.944	Do	not	test	
IFN96	vs	IFN120	25	Do	not	test	
IFN96	vs	RA48	22.6	Do	not	test	
IFN96	vs	VD348	18.2	Do	not	test	
IFN96	vs	VD3120	10.5	Do	not	test	
IFN96	vs	RA24	9.278	Do	not	test	
IFN96	vs	VD372	7.667	Do	not	test	
IFN96	vs	RAVD348	2.167	Do	not	test	
IFN96	vs	RAVD372	1.5	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
RAVD372	vs	PMA120	77.667		4.169	Yes	
RAVD372	vs	PMA96	73		4.13	Yes	
RAVD372	vs	PMA72	59.125	Do	not	test	
RAVD372	vs	IFN72	41.5	Do	not	test	
RAVD372	vs	PMA48	37.2	Do	not	test	
RAVD372	vs	PMA24	34	Do	not	test	
RAVD372	vs	RA96	31	Do	not	test	
RAVD372	vs	RA72	27.444	Do	not	test	
RAVD372	vs	IFN120	23.5	Do	not	test	
RAVD372	vs	RA48	21.1	Do	not	test	
RAVD372	vs	VD348	16.7	Do	not	test	
RAVD372	vs	VD3120	9	Do	not	test	
RAVD372	vs	RA24	7.778	Do	not	test	
RAVD372	vs	VD372	6.167	Do	not	test	
RAVD372	vs	RAVD348	0.667	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
RAVD348	vs	PMA120	77		4.621	Yes	
RAVD348	vs	PMA96	72.333		4.641	Yes	
RAVD348	vs	PMA72	58.458	Do	not	test	
RAVD348	vs	IFN72	40.833	Do	not	test	
RAVD348	vs	PMA48	36.533	Do	not	test	
RAVD348	vs	PMA24	33.333	Do	not	test	
RAVD348	vs	RA96	30.333	Do	not	test	
RAVD348	vs	RA72	26.778	Do	not	test	
RAVD348	vs	IFN120	22.833	Do	not	test	
RAVD348	vs	RA48	20.433	Do	not	test	
RAVD348	vs	VD348	16.033	Do	not	test	
RAVD348	vs	VD3120	8.333	Do	not	test	
RAVD348	vs	RA24	7.111	Do	not	test	
RAVD348	vs	VD372	5.5	Do	not	test	
VD372	vs	PMA120	71.5		4.955	Yes	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
VD372	vs	PMA96	66.833		5.073	Yes	
VD372	vs	PMA72	52.958	Do	not	test	
VD372	vs	IFN72	35.333	Do	not	test	
VD372	vs	PMA48	31.033	Do	not	test	
VD372	vs	PMA24	27.833	Do	not	test	
VD372	vs	RA96	24.833	Do	not	test	
VD372	vs	RA72	21.278	Do	not	test	
VD372	vs	IFN120	17.333	Do	not	test	

VD372	vs	RA48	14.933	Do	not	test	
VD372	vs	VD348	10.533	Do	not	test	
VD372	vs	VD3120	2.833	Do	not	test	
VD372	vs	RA24	1.611	Do	not	test	
RA24	vs	PMA120	69.889		5.137	Yes	
RA24	vs	PMA96	65.222		5.318	Yes	
RA24	vs	PMA72	51.347	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
RA24	vs	IFN72	33.722	Do	not	test	
RA24	vs	PMA48	29.422	Do	not	test	
RA24	vs	PMA24	26.222	Do	not	test	
RA24	vs	RA96	23.222	Do	not	test	
RA24	vs	RA72	19.667	Do	not	test	
RA24	vs	IFN120	15.722	Do	not	test	
RA24	vs	RA48	13.322	Do	not	test	
RA24	vs	VD348	8.922	Do	not	test	
RA24	vs	VD3120	1.222	Do	not	test	
VD3120	vs	PMA120	68.667		3.686	No	
VD3120	vs	PMA96	64	Do	not	test	
VD3120	vs	PMA72	50.125	Do	not	test	
VD3120	vs	IFN72	32.5	Do	not	test	
VD3120	vs	PMA48	28.2	Do	not	test	
VD3120	vs	PMA24	25	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
VD3120	vs	RA96	22	Do	not	test	
VD3120	vs	RA72	18.444	Do	not	test	
VD3120	vs	IFN120	14.5	Do	not	test	
VD3120	vs	RA48	12.1	Do	not	test	
VD3120	vs	VD348	7.7	Do	not	test	
VD348	vs	PMA120	60.967	Do	not	test	
VD348	vs	PMA96	56.3	Do	not	test	
VD348	vs	PMA72	42.425	Do	not	test	
VD348	vs	IFN72	24.8	Do	not	test	
VD348	vs	PMA48	20.5	Do	not	test	
VD348	vs	PMA24	17.3	Do	not	test	
VD348	vs	RA96	14.3	Do	not	test	
VD348	vs	RA72	10.744	Do	not	test	
VD348	vs	IFN120	6.8	Do	not	test	
VD348	vs	RA48	4.4	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
RA48	vs	PMA120	56.567	Do	not	test	
RA48	vs	PMA96	51.9	Do	not	test	
RA48	vs	PMA72	38.025	Do	not	test	
RA48	vs	IFN72	20.4	Do	not	test	
RA48	vs	PMA48	16.1	Do	not	test	
RA48	vs	PMA24	12.9	Do	not	test	
RA48	vs	RA96	9.9	Do	not	test	
RA48	vs	RA72	6.344	Do	not	test	
RA48	vs	IFN120	2.4	Do	not	test	
IFN120	vs	PMA120	54.167	Do	not	test	
IFN120	vs	PMA96	49.5	Do	not	test	
IFN120	vs	PMA72	35.625	Do	not	test	

IFN120	vs	IFN72	18	Do	not	test	
IFN120	vs	PMA48	13.7	Do	not	test	
IFN120	vs	PMA24	10.5	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
IFN120	vs	RA96	7.5	Do	not	test	
IFN120	vs	RA72	3.944	Do	not	test	
RA72	vs	PMA120	50.222	Do	not	test	
RA72	vs	PMA96	45.556	Do	not	test	
RA72	vs	PMA72	31.681	Do	not	test	
RA72	vs	IFN72	14.056	Do	not	test	
RA72	vs	PMA48	9.756	Do	not	test	
RA72	vs	PMA24	6.556	Do	not	test	
RA72	vs	RA96	3.556	Do	not	test	
RA96	vs	PMA120	46.667	Do	not	test	
RA96	vs	PMA96	42	Do	not	test	
RA96	vs	PMA72	28.125	Do	not	test	
RA96	vs	IFN72	10.5	Do	not	test	
RA96	vs	PMA48	6.2	Do	not	test	
RA96	vs	PMA24	3	Do	not	test	
Comparison	Diff	of	Mean	t	P	<	0.05
PMA24	vs	PMA120					
PMA24	vs	PMA96	39	Do	not	test	
PMA24	vs	PMA72	25.125	Do	not	test	
PMA24	vs	IFN72	7.5	Do	not	test	
PMA24	vs	PMA48	3.2	Do	not	test	
PMA48	vs	PMA120	40.467	Do	not	test	
PMA48	vs	PMA96	35.8	Do	not	test	
PMA48	vs	PMA72	21.925	Do	not	test	
PMA48	vs	IFN72	4.3	Do	not	test	
IFN72	vs	PMA120	36.167	Do	not	test	
IFN72	vs	PMA96	31.5	Do	not	test	
IFN72	vs	PMA72	17.625	Do	not	test	
PMA72	vs	PMA120	18.542	Do	not	test	
PMA72	vs	PMA96	13.875	Do	not	test	
PMA96	vs	PMA120	4.667	Do	not	test	

Determinación de Proliferación en Células THP-1

ONE WAY ANALYSIS OF VARIANCE:

Input Columns:

IFN120 , IFN96 , IFN72 , IFN48 , IFN24 , PMA120 , PMA96 , PMA72 , PMA48 ,
PMA24 , VD372 , VD348 , VD324 , RA120 , RA96 , RA72 , RA 48 , RA 24

Normality Test: Passed (P = 0.085)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.594)

Group	N
IFN120	2
IFN96	3
IFN72	3
IFN48	2
IFN24	3
PMA120	4
PMA96	5
PMA72	9
PMA48	10
PMA24	9
VD372	5
VD348	5
VD324	6
RA120	3
RA96	4
RA72	8
RA 48	8
RA 24	7

Group	Mean	Std Dev	SEM
IFN120	75	16.9706	12
IFN96	60.333	24.4404	14.1107
IFN72	74.667	26.3122	15.1914
IFN48	74	7.0711	5
IFN24	97.333	12.5033	7.2188
PMA120	15.5	7	3.5
PMA96	25.8	6.2209	2.7821
PMA72	31.778	11.4758	3.8253
PMA48	41.1	27.4204	8.6711
PMA24	47.444	17.9451	5.9817
VD372	86.8	13.0461	5.8344
VD348	99.2	19.5243	8.7316
VD324	85.5	14.6799	5.9931
RA120	66	29.5973	17.088
RA96	71	23.2522	11.6261
RA72	69.5	21.3675	7.5546
RA 48	78.875	32.0555	11.3333
RA 24	102.143	10.3831	3.9245

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Treatments	17	61889.1797	3640.5400	8.980	< 0.001

Residual	78 31621.3099	405.4014
Total	95 93510.4896	

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P < 0.001$). To isolate which group(s) differ from the others, use a multiple comparison procedure

All Pairwise Multiple Comparisons: (Bonferroni t-test method)

Comparison	Diff of mean	t	P < 0.05	
RA 24 vs PM/	86.643	6.866	Yes	
RA 24 vs PM/	76.343	6.475	Yes	
RA 24 vs PM/	70.365	6.935	Yes	
RA 24 vs PM/	61.043	6.152	Yes	
RA 24 vs PM/	54.698	5.391	Yes	
RA 24 vs IFN/	41.81	3.009	No	
RA 24 vs RA1	36.143	Do	not test	
RA 24 vs RA7	32.643	Do	not test	
RA 24 vs RA9	31.143	Do	not test	
RA 24 vs IFN/	28.143	Do	not test	
RA 24 vs IFN/	27.476	Do	not test	
RA 24 vs IFN/	27.143	Do	not test	
RA 24 vs RA	23.268	Do	not test	
RA 24 vs VD9	16.643	Do	not test	
RA 24 vs VD9	15.343	Do	not test	
Comparison	Diff of	Mean	t	P < 0.05
RA 24 vs IFN/	4.81	Do	not test	
RA 24 vs VD9	2.943	Do	not test	
VD348 vs PM	83.7	6.197	Yes	
VD348 vs PM	73.4	5.764	Yes	
VD348 vs PM	67.422	6.003	Yes	
VD348 vs PM	58.1	5.268	Yes	
VD348 vs PM	51.756	4.608	Yes	
VD348 vs IFN	38.867	Do	not test	
VD348 vs RA	33.2	Do	not test	
VD348 vs RA/	29.7	Do	not test	
VD348 vs RA/	28.2	Do	not test	
VD348 vs IFN	25.2	Do	not test	
VD348 vs IFN	24.533	Do	not test	
VD348 vs IFN	24.2	Do	not test	
VD348 vs RA	20.325	Do	not test	
Comparison	Diff of	Mean	t	P < 0.05
VD348 vs VD/	13.7	Do	not test	
VD348 vs VD/	12.4	Do	not test	
VD348 vs IFN	1.867	Do	not test	
IFN24 vs PM/	81.833	5.321	Yes	
IFN24 vs PM/	71.533	4.865	Yes	
IFN24 vs PM/	65.556	4.884	Yes	
IFN24 vs PM/	56.233	4.243	Yes	
IFN24 vs PM/	49.889	3.717	No	
IFN24 vs IFN/	37	Do	not test	
IFN24 vs RA1	31.333	Do	not test	

IFN24 vs RA7	27.833	Do	not	test	
IFN24 vs RA9	26.333	Do	not	test	
IFN24 vs IFN4	23.333	Do	not	test	
IFN24 vs IFN5	22.667	Do	not	test	
IFN24 vs IFN6	22.333	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05
IFN24 vs RA7	18.458	Do	not	test	
IFN24 vs VD3	11.833	Do	not	test	
IFN24 vs VD3	10.533	Do	not	test	
VD372 vs PM	71.3		5.279	Yes	
VD372 vs PM	61		4.79	Yes	
VD372 vs PM	55.022		4.899	Yes	
VD372 vs PM	45.7		4.144	Yes	
VD372 vs PM	39.356	Do	not	test	
VD372 vs IFN	26.467	Do	not	test	
VD372 vs RA	20.8	Do	not	test	
VD372 vs RA7	17.3	Do	not	test	
VD372 vs RA9	15.8	Do	not	test	
VD372 vs IFN	12.8	Do	not	test	
VD372 vs IFN	12.133	Do	not	test	
VD372 vs IFN	11.8	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05
VD372 vs RA	7.925	Do	not	test	
VD372 vs VD:	1.3	Do	not	test	
VD324 vs PM	70		5.386	Yes	
VD324 vs PM	59.7		4.897	Yes	
VD324 vs PM	53.722		5.062	Yes	
VD324 vs PM	44.4		4.27	Yes	
VD324 vs PM	38.056	Do	not	test	
VD324 vs IFN	25.167	Do	not	test	
VD324 vs RA	19.5	Do	not	test	
VD324 vs RA7	16	Do	not	test	
VD324 vs RA9	14.5	Do	not	test	
VD324 vs IFN	11.5	Do	not	test	
VD324 vs IFN	10.833	Do	not	test	
VD324 vs IFN	10.5	Do	not	test	
VD324 vs RA	6.625	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05
RA 48 vs PM/	63.375		5.14	Yes	
RA 48 vs PM/	53.075		4.624	Yes	
RA 48 vs PM/	47.097		4.814	Yes	
RA 48 vs PM/	37.775		3.955	Yes	
RA 48 vs PM/	31.431	Do	not	test	
RA 48 vs IFN!	18.542	Do	not	test	
RA 48 vs RA1	12.875	Do	not	test	
RA 48 vs RA7	9.375	Do	not	test	
RA 48 vs RA9	7.875	Do	not	test	
RA 48 vs IFN-	4.875	Do	not	test	
RA 48 vs IFN'	4.208	Do	not	test	
RA 48 vs IFN'	3.875	Do	not	test	
IFN120 vs PM	59.5		3.412	No	
IFN120 vs PM	49.2	Do	not	test	
IFN120 vs PM	43.222	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05

IFN120 vs PM	33.9	Do	not	test	
IFN120 vs PM	27.556	Do	not	test	
IFN120 vs IF	14.667	Do	not	test	
IFN120 vs RA	9	Do	not	test	
IFN120 vs RA	5.5	Do	not	test	
IFN120 vs RA	4	Do	not	test	
IFN120 vs IF	1	Do	not	test	
IFN120 vs IF	0.333	Do	not	test	
IFN72 vs PM	59.167	Do	not	test	
IFN72 vs PM	48.867	Do	not	test	
IFN72 vs PM	42.889	Do	not	test	
IFN72 vs PM	33.567	Do	not	test	
IFN72 vs PM	27.222	Do	not	test	
IFN72 vs IF	14.333	Do	not	test	
IFN72 vs RA1	8.667	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05
IFN72 vs RA7	5.167	Do	not	test	
IFN72 vs RA9	3.667	Do	not	test	
IFN72 vs IF	0.667	Do	not	test	
IFN48 vs PM	58.5	Do	not	test	
IFN48 vs PM	48.2	Do	not	test	
IFN48 vs PM	42.222	Do	not	test	
IFN48 vs PM	32.9	Do	not	test	
IFN48 vs PM	26.556	Do	not	test	
IFN48 vs IF	13.667	Do	not	test	
IFN48 vs RA1	8	Do	not	test	
IFN48 vs RA7	4.5	Do	not	test	
IFN48 vs RA9	3	Do	not	test	
RA96 vs PMA	55.5	Do	not	test	
RA96 vs PMA	45.2	Do	not	test	
RA96 vs PMA	39.222	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05
RA96 vs PMA	29.9	Do	not	test	
RA96 vs PMA	23.556	Do	not	test	
RA96 vs IFN9	10.667	Do	not	test	
RA96 vs RA1:	5	Do	not	test	
RA96 vs RA7:	1.5	Do	not	test	
RA72 vs PMA	54	Do	not	test	
RA72 vs PMA	43.7	Do	not	test	
RA72 vs PMA	37.722	Do	not	test	
RA72 vs PMA	28.4	Do	not	test	
RA72 vs PMA	22.056	Do	not	test	
RA72 vs IFN9	9.167	Do	not	test	
RA72 vs RA1:	3.5	Do	not	test	
RA120 vs PM	50.5	Do	not	test	
RA120 vs PM	40.2	Do	not	test	
RA120 vs PM	34.222	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05
RA120 vs PM	24.9	Do	not	test	
RA120 vs PM	18.556	Do	not	test	
RA120 vs IFN	5.667	Do	not	test	
IFN96 vs PM	44.833	Do	not	test	
IFN96 vs PM	34.533	Do	not	test	
IFN96 vs PM	28.556	Do	not	test	

IFN96 vs PM/	19.233	Do	not	test	
IFN96 vs PM/	12.889	Do	not	test	
PMA24 vs PV	31.944	Do	not	test	
PMA24 vs PV	21.644	Do	not	test	
PMA24 vs PV	15.667	Do	not	test	
PMA24 vs PV	6.344	Do	not	test	
PMA48 vs PV	25.6	Do	not	test	
PMA48 vs PV	15.3	Do	not	test	
PMA48 vs PV	9.322	Do	not	test	
Comparison	Diff of	Mean		t	P < 0.05
PMA72 vs PV	16.278	Do	not	test	
PMA72 vs PV	5.978	Do	not	test	
PMA96 vs PV	10.3	Do	not	test	

DESCRIPTIVE STATISTICS:

The following has been indicated:
 " Upper left at column 1, row 1"
 " Lower right at column n 13, row 5"

	PMA24	PMA48	PMA72
Mean	102.992	119.799	167.383
Standard Dev	37.236	39.904	100.82
Std Error of M	16.652	17.846	50.41
Median	108.973	136.827	145.088
25 percentile	67.362	92.363	105.766
75 percentile	136.135	149.755	229

	PMA96	PMA120	VD324
Mean	83.523	154.643	69.916
Standard Dev	21.043	64.587	51.027
Std Error of M	14.88	45.67	29.46
Median	83.523	154.643	98.748
25 percentile	68.643	108.972	32.937
75 percentile	98.403	200.313	99.687

	VD48	VD72	RA24
Mean	102.489	71.72	115.525
Standard Dev	16.725	52.585	38.187
Std Error of M	9.656	30.36	19.093
Median	98	102	112.492
25 percentile	90.849	33.75	90.559
75 percentile	115.25	102.12	140.492

	RA48	RA72	RA96
Mean	206.492	154.55	131.411
Standard Dev	213.687	103.718	78.023
Std Error of M	106.844	51.859	55.17
Median	119.5	122.399	131.411
25 percentile	73.36	87.1	76.241
75 percentile	339.623	222	186.582

	RA120
Mean	204.255
Standard Dev	152.915
Std Error of M	108.127
Median	204.255
25 percentile	96.128
75 percentile	312.383

DESCRIPTIVE STATISTICS:

The following has been indicated:

Upper left cont column 1, row 1

Lower right cc at column 13, row 5

	PMA24	PMA48	PMA72
Mean	89.034	89.254	106.709
Standard Dev	17.858	31.873	37.9
Std Error of M	7.986	14.254	18.95
Median	88.575	75.88	114.4
25 percentile	74.738	65.025	82.418
75 percentile	101.911	118.923	131

	PMA96	PMA120	VD324
Mean	115.97	361.478	104.833
Standard Dev	52.421	320.211	16.018
Std Error of M	37.067	226.424	9.248
Median	115.97	361.478	109.499
25 percentile	78.903	135.054	92.625
75 percentile	153.037	587.901	115.875

	VD48	VD372	RA24
Mean	120.957	122.099	137.608
Standard Dev	4.065	11.11	21.317
Std Error of M	2.347	6.414	10.658
Median	121	120.298	146.136
25 percentile	117.902	114.075	125.136
75 percentile	124	130.575	150.079

	RA48	RA72	RA96
Mean	312.12	273.122	382.766
Standard Dev	226.1	64.838	28.337
Std Error of M	113.05	32.419	20.038
Median	215.443	248.381	382.766
25 percentile	190.5	235.245	362.729
75 percentile	433.74	311	402.804

	RA120
Mean	961.852
Standard Dev	832.291
Std Error of M	588.518
Median	961.852
25 percentile	373.333
75 percentile	1550.37

Determinación de Actividad de beta-glucuronidasa en Células U-937
Tratamiento con RA 1 micro-M
Tiempo 24 h

t-TEST:

Input Columns:
RA24, CR24

Normality Test: Failed (P = 0.001)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
RA24	4
CR24	4

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
RA24	146.136	125.136	150.079
CR24	100.000	100.000	100.000

T = 10 n(small) = 4 n(big) = 4 P = 0.014

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.014).

Determinación de Actividad de beta-glucuronidasa en Células U-937
Tratamiento con RA 1 micro-M
Tiempo 48 h

t-TEST:

Input Columns:
RA48, CR48

Normality Test: Failed ($P = 0.001$)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
RA48	4
CR48	4

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
RA48	215.443	190.500	433.740
CR48	100.000	100.000	100.000

$T = 10$ $n(\text{small}) = 4$ $n(\text{big}) = 4$ $P = 0.014$

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups ($P = 0.014$).

Determinación de Actividad de beta-glucuronidasa en Células U-937
Tratamiento con RA 1 micro-M
Tiempo 72 h

t-TEST:

Input Columns:
RA72, CR72

Normality Test: Failed (P = 0.001)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
RA72	4
CR72	4

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
RA72	248.381	235.245	311.000
CR72	100.000	100.000	100.000

T = 10 n(small) = 4 n(big) = 4 P = 0.014

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.014).

Fagocitosis en Células U-937
Tratamiento con VD3 50 nM
Tiempo 72 h

t-TEST:

Input Columns:
CR72, VD372

Normality Test: Failed (P = 0.007)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
CR72	4
VD372	3

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
CR72	100.000	100.000	100.000
VD372	916.084	356.307	1054.021

T = 10 n(small) = 4 n(big) = 3 P = 0.029

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.029).

Fagocitosis en Células U-937
Tratamiento con VD3 50 nM
Tiempo 48 h

t-TEST:

Input Columns:
VD348 CR48

Normality Test: Failed (P = 0.006)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
VD348	4
CR48	5

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
VD348	449.231	270.22	622.211
CR48	100	100	100

T = 15 n(small) = 5 n(big) = 4 P = 0.008

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.008).

Fagocitosis en Células U-937
Tratamiento con PMA 50 nM
Tiempo 48 h

t-TEST:

Input Columns:
PMA48, CR48

Normality Test: Failed (P = 0.007)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
PMA48	2
CR48	5

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
PMA48	31.351	13.351	49.351
CR48	100	100	100

T = 3 n(small) = 2 n(big) = 5 P = 0.048

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.048).

Fagocitosis en Células U-937

DESCRIPTIVE STATISTICS

The following subregion has been indicated

Upper left corner at column 1, row 1

Lower right corner at column 13, row 6

	VD324	VD348	VD372
Mean	168.616	446.215	728.599
Standard Deviation	97.722	263.878	492.667
Std Error of Mean	48.861	131.939	284.441
Median	156.024	449.231	916.084
25 percentile	88.416	270.22	356.307
75 percentile	248.817	622.211	1054.021
	RA24	RA48	RA72
Mean	92.252	95.233	85.366
Standard Deviation	690441	48.168	53.681
Std Error of Mean	34.72	24.084	26.84
Median	79.36	87.52	91.318
25 percentile	42.514	62.18	40.249
75 percentile	141.99	128.285	130.483
	RA96	RA120	RAVD324
Mean	682.217	545.404	80.227
Standard Deviation	90.86	362.881	37.187
Std Error of Mean	64.248	256.596	26.295
Median	682.217	545.404	80.227
25 percentile	617.696	288.808	53.932
75 percentile	746.465	802	106.522
	RAVD348	RAVD372	PMA48
Mean	41.633	106.977	31.351
Standard Deviation	21.261	97.4	25.456
Std Error of Mean	15.034	68.901	18
Median	41.633	106.977	31.351
25 percentile	26.599	38.076	13.351
75 percentile	56.667	175.877	49.351
	PMA120		
Mean	105.042		
Standard Deviation	82.623		
Std Error of Mean	58.423		
Median	105.042		
25 percentile	46.618		
75 percentile	163.465		

Fagocitosis en Células THP-1

DESCRIPTIVE STATISTICS

The following subregion has been indicated

Upper left corner at column 1, row 1

Lower right corner at column 12, row 5

	RA24	RA48	RA72
Mean	92.775	51.034	82.692
Standard Deviation	40.383	33.004	3.012
Std Error of Mean	23.315	16.502	1.739
Median	77.373	37.462	82.569
25 percentile	66.13	29.861	80.45
75 percentile	123.288	72.207	84.965
	RA96	RA120	VD324
Mean	80.901	38.769	117
Standard Deviation	72.617	21.775	37.397
Std Error of Mean	41.926	15.398	21.591
Median	78.095	38.769	116.493
25 percentile	26.819	23.372	89.017
75 percentile	135.684	54.167	145.11
	VD348	VD372	VD396
Mean	85.926	27.71	138.065
Standard Deviation	46.401	23.498	114.692
Std Error of Mean	26.79	16.616	81.099
Median	76.099	27.71	138.065
25 percentile	52.943	11.095	56.966
75 percentile	121.365	44.326	219.164
	PMA48	PMA72	PMA96
Mean	60.441	18.715	48.957
Standard Deviation	41.126	10.105	9.889
Std Error of Mean	29.081	7.145	6.992
Median	60.441	18.715	48.957
25 percentile	31.36	1.57	41.964
75 percentile	89.521	25.86	55.949

Determinación de Actividad de Fosfatasa Acida en Células THP-1
Tratamiento con PMA 50 nM
Tiempo 72 h

t-Test:

Input Columns:
PMA72, CR72

Normality Test: Failed (P=0.036)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST

Group	N
PMA72	3
CR72	3

Group	Median	25-75 percentiles	
PMA72	180	136.794	226.763
CR72	100	100	100

T=6 n(small)= 3 n(big)= 3 P= 0.050

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance there is a statistically significant difference between the input groups (P= 0.050).

Determinacion de actividad de beta-glucuronidasa en Células THP-1

DESCRIPTIVE STATISTICS

The following subregion has been indicated

Upper left corner at column 1, row 1

Lower right corner at column 10, row 5

	PMA24	PMA48	PMA72
Mean	144.478	119.669	116.737
Standard Deviation	55.909	51.207	40.214
Std Error of Mean	27.954	25.604	23.218
Median	133.598	109.442	135
25 percentile	109.366	82.758	86.724
75 percentile	179.59	156.579	142.184

	RA48	RA72	RA96
Mean	108.752	141.069	157.212
Standard Deviation	25.972	19.73	37.712
Std Error of Mean	18.365	13.952	26.667
Median	108.752	141.069	157.212
25 percentile	90.388	127.117	130.546
75 percentile	127.117	155.02	183.879

	PMA96	PMA120	RA24
Mean	256.451	223.475	99.129
Standard Deviation	135.373	118.535	7.843
Std Error of Mean	95.723	83.817	5.546
Median	256.451	223.475	99.129
25 percentile	160.727	139.658	93.584
75 percentile	352.174	307.292	104.675

	RA120
Mean	147.135
Standard Deviation	23.203
Std Error of Mean	16.407
Median	147.135
25 percentile	130.728
75 percentile	163.542

Determinación de Actividad de beta-glucuronidasa en Células U-937
Tratamiento con VD3 100 nM
Tiempo 72 h

t-TEST:

Input Columns:
CR72, VD372

Normality Test: Failed (P = 0.007)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
CR72	4
VD372	3

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
CR72	100.000	100.000	100.000
VD372	120.298	114.075	130.575

T = 10 n(small) = 4 n(big) = 3 P = 0.029

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.029).

Determinación de Actividad de beta-glucuronidasa en Células U-937
Tratamiento con VD3 100 nM
Tiempo 48 h

t-TEST:

Input Columns:
VD48, CR48

Normality Test: Failed (P = 0.007)

Use nonparametric test because assumptions for parametric test were violated.

MANN-WHITNEY RANK SUM TEST:

Group	N
VD48	3
CR48	4

Group	Median	25 - 75 Percentiles	
VD48	121.000	117.902	124.000
CR48	100.000	100.000	100.000

T = 10 n(small) = 4 n(big) = 3 P = 0.029

The difference in the median values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.029).

Determinación de Actividad de beta-glucuronidasa en Células U-937
Tratamiento con RA 1 micro-M
Tiempo 96 h

t-TEST:

Input Columns:
RA96, CR96

Normality Test: Passed (P > 0.200)
Levene median test terminated due to insufficient data.

Group	N
RA96	2
CR96	2

Group	Mean	Std Dev	SEM
RA96	382.766	28.3374	20.0375
CR96	100.000	0.0000e+000	0.0000e+000

Difference	282.766	20.0375
------------	---------	---------

t = 1.411e+001 with 2 degrees of freedom. P = 0.005

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0.005).