



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Diferenciación de monocitos a macrófagos in vitro en un
modelo de hipoxia**

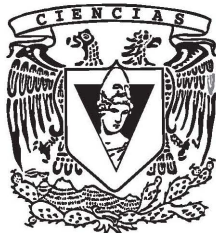
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

EUGENIO CONTRERAS CASTILLO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARIA ISABEL SADA OVALLE**

Ciudad Universitaria, CDMX 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Contreras
Castillo
Eugenio
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
412061787
2. Datos del tutor
Dra.
María Isabel
Sada
Ovalle
3. Datos del sinodal 1
M. en IBB
Diana Elodia
Aguilar
León
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Rosario
Ortiz
Hernández
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Leslie
Chávez
Galán
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Lucero De Los Angeles
Ramon
Luing
7. Datos del trabajo escrito
Diferenciación de monocito a macrófago
en condiciones hipóxicas, un modelo in vitro
75 p
2016

***Porque en mi reflejo te veo a ti:
a mi hermano Eduardo
por ser el impulso de cada día
la esperanza de vivir
y el anhelo de envejecer a tu lado.***

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la casa del conocimiento y la razón por brindarme la oportunidad de tener una educación de excelencia.

A la Facultad de Ciencias por su excelencia académica y por darme las herramientas para salir del país y demostrarle al mundo que como Ciencias no hay dos.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por ser un instituto de excelencia en investigación y atención al paciente.

A la Dra. Isabel Sada por creer en mí, ser fortaleza en momentos de incertidumbre y ser ejemplo de excelencia académica.

A la Dra. Lucero por la enseñanza brindada y el apoyo en este proyecto.

A la Dra. Leslie, la Dra. Rosario y a la M. en IBB Diana Elodia por tomarse el tiempo de la revisión de esta tesis, sus consejos y comentarios.

A la Universidad de California campus Los Angeles

A mis profesores por inspirarme a seguir adelante: QBP Beatriz Sánchez Monroy, Dr. Alejandro Marche Cova, M. Georgina Nieto, Dra. Guadalupe Judith Márquez, Dr. Frank Raúl Gio Argaez, Dra. Laura del Carmen Vargas.

A la Universidad de California Los Angeles y por los conocimientos adquiridos.

Dedicatoria

A mis padres por su amor y por la vida otorgada.

Mamá cada noche recuerdo los abrazos, besos y consejos con los cuales cada atardecer me despedías. Me llevaste en tu vientre y desde ese momento tu amor hacia mí nunca faltó, me enseñaste a ser generoso, a ser agradecido con Dios y con la vida. No existen palabras para agradecer tu apoyo, pues con tu esfuerzo y trabajo me permitiste seguir mis sueños. Te amo.

Papá tu canas me enseñan a amar y a perdonar, tu abrazo que perdura me conforta y me fortalece. El hombre que soy lleva grabado en mi alma tu amor y tu enseñanza. Te amo.

Roberto, hermano mayor, tu ejemplo y dedicación me impulsa a seguir adelante. Ejemplo de valor y perseverancia, has sido un gran pilar en mi vida. Gracias por tu apoyo y cariño. Porque el amor fraternal siempre perdura.

A mis abuelos Javier y Elisa por ser un ejemplo de vida y de trabajo. Gracias por el apoyo y amor brindado.

A mis abuelos Tere y Salvador por ser el pilar de una gran familia.

A mi querida Tía Lili por enseñarme que la felicidad no esta en la riqueza si no en los pequeños detalles de la vida. Tú me has enseñado que cada momento es valioso y a mirar al futuro con optimismo. Por todo tu apoyo y confianza, por el cariño mutuo y por el abrazo cálido de cada mañana.

A mi tía Lourdes por ser un ejemplo de generosidad, inteligencia y cariño.

A mi Tío Javier por ser el ejemplo a seguir, por el apoyo y la confianza. A mi Tío Marcos por enseñarme a entender y apreciar el arte, por tu cariño y confianza.

A la Dra. Isabel por ser ejemplo de perseverancia, éxito profesional y amor al próximo.

A la Dra. Lucero por sus enseñanzas, las buenas charlas y la amistad fundada.

A mi mejor amiga Andrea y a la Sra. Ofelia por hacerme parte de su familia, por su apoyo y consejos. Por enseñarme a ser generoso y a luchar por seguir viviendo.

A mi amigo José Luis Bañales por enseñarme que no hay edad para ser joven, por el apoyo brindado, el cariño y por introducirme al mundo de la opera.

A mi amigo Juan Moran por tu amistad sincera y la confianza brindada.

A Fernanda Calzada por ser mi primera amiga en esta gran ciudad.

A mis grandes amigos foráneos de la facultad: Ganesh y Sergio porque tomar la clase de Ciencias de la Tierra fue la mejor decisión en la carrera.

A mis amigos de la facultad: a Gerardo Mejía por tu optimismo y amistad; Paul Hernández por la buena música y la amistad brindada; Katia Navarrete por las tardes de café; Fer Núñez porque que dos carreras simultaneas nunca fueron un problema; Isaura Reyes por tu esfuerzo y dedicación; Ricardo Muñiz por los buenos consejos y las experiencias compartidas; Alejandro Fábregas por ser ejemplo de dedicación y pasión por la ciencia; Mario por tu originalidad y optimismo; Parsifal por tu obra maestra: "Oncogene"; Andrés Puig por la buena charla; Bianni por la sonrisa de cada día; Samantha por las tardes en el INMEGEN; Iván Linares por las películas recomendadas; Ilse por la buena música y por los consejos brindados; Franco Díaz porque siempre se vive mejor en la del Carmen; Tania porque siempre te vi con una gran sonrisa; Gera y Bertha por su originalidad; Demian por los buenos consejos y la amistad sincera; Charly y Chucho por su optimismo y alegría; Karime por los bellos recuerdos y sonrisas compartidas; y a todos aquellos que hicieron de mi estancia en la facultad la mejor experiencia de mi vida.

A Luis Lievano porque siempre se puede ser joven, a Catalina por llevar siempre una sonrisa y a Jero el consejero por las tardes de cigarro y la buena charla.

A Nictée porque mostrarme que los recuerdos, sentimientos y amistades también se llevan en la piel.

A Fernanda Real por las risas y la amistad sincera. Ameyalli porque tu alma poeta me inspira a ver la vida con optimismo. A Zaida por ser compañera de opera y secar mis lagrimas de cocodrilo.

A mis amigos del laboratorio de Inmunología Integrativa: Luis, Ranferi, Fernanda, Jessica y con especial cariño a Ana y Paola porque las horas en el laboratorio siempre fueron divertidas a su lado.

A Dámaris por sus consejos, las tardes de charla y por ayudarme a entender el mundo de la citometría. A la Sra. Jose por su ayuda, su cariño y por los desayunos no merecidos.

A la Dra. Paula Licon por su paciencia, sus consejos y enseñanzas.

A mis amigos del laboratorio 125 Nte: José Luis, Enrique, Diego, Aranzazú, Rafal, Adriana, Lupe y con especial cariño a mi jarocho favorita: Arely. A mi buapachosa favorita Nisa, porque: "Quién necesita belleza cuando tiene el gen del buen humor".

A mis amigos del IFC Laura, Yuli y Emilio.

Índice general

Abreviaturas.....	8
I. Introducción.....	11
I.I Inmunidad innata	11
I.II Macrófagos	13
I.III Macrófagos residentes de tejido	15
I.IV Monocitos	17
I.V Ontogenia y origen de los monocitos	19
I.V.I Monocitos derivados de medula ósea.....	19
I.V.II Monocitos extra-medulares.....	19
I.VI Movilización de monocitos	21
I.VII Macrófagos derivados de monocitos.....	22
I.VIII Distribución de oxígeno en los tejidos	27
I.IX Hipoxia.....	28
I.X Consecuencias biológicas de la hipoxia.....	29
I.XI Maduración de monocitos en condiciones hipóxicas.....	31
II. Justificación.....	34
III. Hipótesis.....	34
IV. Objetivos.....	35
V. Materiales y métodos.....	36
V.I Obtención de células mononucleares totales.....	36
V.II Separación de monocitos y diferenciación de macrófagos.....	36
V.III Cámara de hipoxia.....	37
V.IV Recuperación de células adherentes.....	38
V.V Inmuno-fenotipificación.....	38
V.VI Extracción de RNA.....	33
V.VII Cuantificación de RNA.....	40
V.VIII Obtención de cDNA.....	40
V.IX Selección de genes endógenos.....	41
V.IX.I Validación de genes endógenos y genes blanco.....	41

	V.X Detección de IFN γ en sobrenadantes de cultivo.....	43
	V.XI Análisis estadístico.....	44
VI.	Resultados	44
	VI.I Validación de genes endógenos.....	44
	VI.II Cinética de expresión de HLA-DR, CD80, CD86, TLR-2, TLR-4 y CXCR4 en condiciones normóxicas e hipóxicas.....	47
	VI.III Cinética de expresión de HIF-1 α , GLUT-1 y Tim-3 en condiciones normóxicas e hipóxicas.....	53
	VI.IV Secreción de IFN γ durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones normóxicas e hipóxicas.....	58
VII.	Discusión.....	59
VIII.	Conclusiones.....	66
IX.	Perspectivas.....	66
X.	Bibliografía.....	67

Abreviaturas

AKT	Proteína cinasa B
ARNT	Receptor translocador nuclear de aril hidrocarburos
AT-1	Receptor tipo I de angiotensina
ATP	Adenosín trifosfato
CEACAM1	Molécula de adhesión celular 1 asociada al antígeno carcinoembrionario.
CMH	Células madre hematopoyéticas
CMN	Células mononucleares totales
CSF-1	Factor estimulante de colonias 1
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligro
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
GATA 6	Factor transcripcional GATA6 o factor 6 de unión a GATA
GLUT-1	Transportador de glucosa tipo I
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas
HIF-1	Factor inducible de hipoxia
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano
HMGB1	High mobility group box 1
IFN γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
IRF	Factor regulador de interferón
IMF	Intensidad media de fluorescencia
LPS	Lipopolisacáridos
MCT1	Transportador de ácidos monocarboxílicos 1

MD2	Antígeno linfocitario 96
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibitorio de la migración de macrófagos factor
mmHg	Milímetros de mercurio
mTOR	Blanco de rapamicina en células de mamífero
Myd88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
OODD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer salino-fosfato
pH	Potencial de hidrógeno
PHD	Prolil hidroxilasas
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
PPAR γ	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma
PRR	Receptores de reconocimiento de patrón
pVHL	Proteína von Hipperl-Lindau
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RPLO	Proteína larga ribosomal
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640
SCF	Factor de células madre
SIRP α	Proteína reguladora de la señal alfa
TCR	Receptor de linfocitos T
Tim-3	Proteína de célula T con dominios inmunoglobulina y mucina

TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

I. Introducción

Todo organismo multicelular se apoya de una defensa inmune para su sobrevivencia. A lo largo del proceso evolutivo, una gama de estrategias de defensas han surgido para el mantenimiento de la homeostasis de los organismos. Hasta hace poco, el paradigma de la evolución del sistema inmune, recaía en la habilidad de activar una respuesta inmune innata. La respuesta inmune innata recae en la activación de procesos metabólicos y celulares para la erradicación de componentes ajenos al organismo, sin generación de memoria, respuesta que se puede encontrar evolutivamente desde los invertebrados. Es a partir de los vertebrados mandibulados donde podemos encontrar un sistema que permite la generación de una respuesta inmune de memoria, comúnmente llamado sistema inmune adaptativo (Boehm, 2012).

En un organismo sano, el sistema inmune innato provee la primera línea de defensa contra señales de daño internas o externas, mediante el inicio de una respuesta inflamatoria protectora que se desarrolla a través del tiempo en distintas fases, iniciación, inflamación, resolución y restablecimiento de la integridad del tejido. La primera fase de la respuesta inflamatoria tiene como objetivo la destrucción de patógenos; le prosigue una fase de remoción de restos celulares, material dañado de matriz extracelular y células en apoptosis y termina con una fase de recuperación en la cual el tejido es reparado y se restauran las condiciones funcionales de un tejido (Italiani et al., 2014).

I.1 Inmunidad Innata

La respuesta inmune innata se compone de barreras anatómicas, tanto físicas, químicas y celulares que permiten la defensa del organismo contra cualquier patógeno. Dentro de las barreras físicas podemos encontrar a las capas de células epiteliales en la piel, el área de las mucosas y tejido glandular; áreas del cuerpo que están expuestas al ambiente externo y que previenen infección bloqueando la entrada de patógenos al cuerpo. Las barreras químicas en las superficies incluyen la presencia de sustancias solubles que poseen actividad antimicrobiana (lisozimas, lactoferrinas, defensinas,

proteínas surfactantes, proteína C reactiva, etc.) así como moléculas que acidifican el pH. Aquellos patógenos que evaden las barreras físicas y químicas pueden sobrevivir en espacios extracelulares o pueden infectar células y eventualmente replicándose y esparciéndose a otras partes del cuerpo (Owen et al., 2012).

La respuesta inmune innata mediada por células, es aquella que está dirigida a patógenos que logran evadir las barreras físicas y químicas. Esta respuesta se caracteriza por ser rápida e iniciar en cuestión de minutos después la infección. Las células como macrófagos y células dendríticas son consideradas parte de la respuesta inmune innata, las cuales presentan receptores extracelulares e intracelulares llamados PRRs receptores de reconocimiento de patrones (*PRR por sus siglas en ingles Pattern recognition receptors*). Estos receptores detectan PAMPs (*PAMPs por sus siglas en ingles Pathogen-associated molecular patterns*), tales como ácidos nucleicos de origen microbiano, lipoproteínas y carbohidratos; así como patrones moleculares asociados a daño celular DAMPS (*DAMPS por sus siglas en ingles Damage-associated molecular patterns*) como es ATP, IL-1 α , ácido úrico, proteínas de unión a calcio como: S100A8 y S100A9 y proteínas de unión a ADN como la proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 HMGB1 (*HMGB1 por sus siglas en ingles High mobility group box 1*). La activación de estos receptores provoca la oligomerización y ensamblaje de complejos de señalización que promueven la secreción de factores que inducen el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de infección e inflamación (Newton et al., 2012).

Las células que expresan éstos receptores son activadas al presentarse la interacción del receptor con su ligando y pueden erradicar al patógeno mediante distintos procesos, como la fagocitosis, la secreción de citocinas pro inflamatorias, la secreción de péptidos antimicrobianos y/o reclutamiento de células fagocíticas como neutrófilos, células dendríticas, monocitos y/o macrófagos (Owen et al., 2012).

I.II Macrófagos

Los macrófagos fueron descritos a finales del siglo XIX por el científico ruso llamado Ilya Metchnikoff (Epelman et al., 2014) cuyos trabajos de investigación fueron de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos de la inmunidad innata.

Su interés en los procesos de digestión de los organismos primitivos lo llevó a la observación de células fagocíticas capaces de digerir microorganismos y degradarlos. Metchnikoff observó que la fagocitosis era un proceso activo y que aquellas células eran capaces de degradar un diverso número de microorganismos ya que contenían en su citoplasma vacuolas, encargadas de degradar patógenos, tales como espiroquetas y levaduras.

Metchnikoff describió la presencia de macrófagos en diversas zonas anatómicas, por ejemplo: en hígado las células de Kupffer, en bazo los macrófagos de pulpa roja y blanca, en pulmón los macrófagos alveolares, en nódulos linfáticos e intestino los macrófagos intestinales (Gordon, 2008). Además, identificó que esta subpoblación celular presentan una forma ameboide, tienen capacidad de migración dirigida o quimiotaxis así como la extensión de pseudopodos durante el proceso de fagocitosis (Figura 1). Actualmente se sabe que los macrófagos se distribuyen en distintas zonas anatómicas del cuerpo como en el tejido adiposo, hueso, sistema nervioso central, corazón, intestino hígado, pulmón, en la cavidad peritoneal, piel, riñón, bazo, nódulos linfáticos, timo, entre otros (Davies et al., 2013).

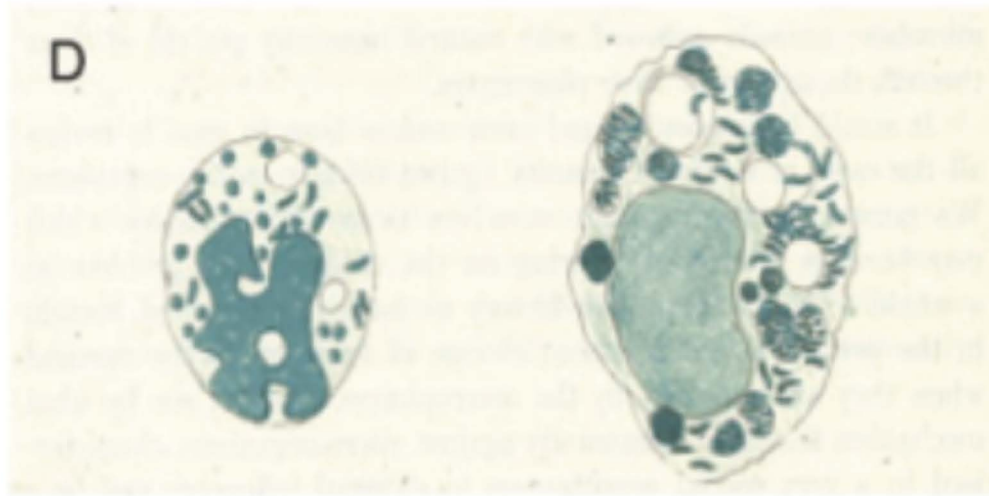


Figura 1. En la imagen de la izquierda se observan micrófagos (leucocitos polimorfonucleados) y en la de la derecha macrófagos. Células identificadas, por Metchnikoff, utilizando técnicas de tinción con anilina. En sus trabajos describe a los macrófagos en órganos como hígado, pulmón, bazo, nódulos linfáticos e intestino (Modificado de Gordon S., 2008).

A mediados del siglo XX Ralph van Furth propuso que los macrófagos eran células diferenciadas que habían perdido la capacidad de proliferación y eran constantemente reconstituidos por monocitos circulantes provenientes de la médula ósea (Furth et al., 1968; Italianiet al., 2014; Lavin et al., 2015) a lo que llamo el sistema fagocítico mononuclear. (Furth et al., 1968; Italiani et al., 2014; Lavin et al., 2015). Este sistema se consideraba la fuente única de reconstitución y mantenimiento de poblaciones de macrófagos; sin embargo, en los últimos años, trabajos en modelos murinos han demostrado que en la mayoría de los tejidos los macrófagos residentes de tejido derivan de precursores embrionarios y persisten en el tejido auto renovándose, independientemente de los monocitos circulantes, cuando el tejido está en equilibrio (Bruttger et al., 2015; Epelman et al., 2014; Ginhoux et al., 2014). Experimentalmente usando modelos murinos de parabiosis, en el cual es posible combinar la circulación de dos ratones congénicos, permiten evaluar la contribución fisiológica de los monocitos circulantes en las poblaciones de macrófagos residentes de tejido, en este sentido se

demostró que el mantenimiento de la población macrófagos residentes de tejido es independiente de la contribución de monocitos proveniente de médula ósea. (Hashimoto et al., 2013)

Otros experimentos similares han confirmado que las poblaciones de los macrófagos alveolares, las células de Kupffer y los macrófagos de la pulpa roja del bazo se mantienen a lo largo del tiempo independientemente de la contribución de precursores en la circulación (Lavin et al., 2015). Sólo ciertas poblaciones de macrófagos son reemplazados a lo largo de la vida adulta de un organismo, entre ellos podemos encontrar a los macrófagos del intestino y de la dermis (Bain et al., 2014).

En contraste a la mayor parte de los tejidos del cuerpo, en donde los macrófagos se mantienen sin contribución de monocitos circulantes, una gran proporción de monocitos migran a tejidos dañados y se diferencian a macrófagos o células dendríticas. Evidencia experimental sugiere que aunado a esta diferenciación de monocitos a macrófagos las poblaciones de macrófagos residentes de tejido se expanden en procesos infecciosos. Al término de la infección se desconoce si los macrófagos derivados de monocito permanecen como macrófagos residentes o mueren por apoptosis (Italiani et al., 2014).

I.III Macrófagos residentes de tejido

Durante la gestación temprana (día 7.5 de gestación de ratón) los macrófagos se localizan y se expanden en el saco vitelino mediante un proceso denominado hematopoyesis primitiva o mesoblástica. Las islas de sangre de saco vitelino, provienen de una célula llamada hemangioblastos, y son un grupo de eritroblastos primitivos rodeadas por una cubierta endotelial y ubicadas entre el endodermo visceral exterior y las capas de células mesoteliales que comprenden el saco vitelino. Las islas de sangre contienen células endoteliales y precursores hematopoyéticos (Ferkowicz, 2005; Golub et al., 2013). En el día 8.25 del desarrollo en el saco vitelino, se genera el progenitor mieloides-eritroide (definido como c-Kit⁺, AA4.1⁺ (CD93⁺), CD41⁺, VE-cadherina⁺,

CD16/32⁺ y CD45¹⁰) , el cual es capaz de se generar únicamente eritrocitos y macrófagos (Gomez Perdiguero et al., 2014; Perdiguero et al., 2015).

Estudios con ratones genéticamente modificados que posibilitan hacer un seguimiento de un tipo celular específico han permitido identificar el destino de los macrófagos generados en el saco vitelino (Epelman et al., 2014). A partir de un progenitor mieloide-eritroide se desarrollan todos los macrófagos residentes de tejido, desarrollo que es independiente de la expresión de factores de transcripción como lo es Runx1 y no depende de la expresión de c-myc (Perdiguero et al., 2015).

La hematopoyesis definitiva comienza al día 10.5 y anatómicamente en la esplacnopleura paraaórtica, posterior a la aorta-gónada mesonefros (Sheng, Ruedl, & Karjalainen, 2015). En esta etapa del desarrollo se generan células madre hematopoyéticas (CMH) inmaduras y posteriormente CMH maduras, las cuales tienen la capacidad de reconstituir el sistema inmune, es decir tienen capacidad de generar cualquier linaje hematopoyético, posteriormente dichas células migran al hígado fetal. En el hígado fetal las CMH se expanden dividiéndose o reclutando mas progenitores (Hoeffel et al., 2015) y se conforma el principal órgano hematopoyético durante el periodo restante del desarrollo (hematopoyesis hepática). Finalmente, es a partir del periodo perinatal en donde la médula ósea se convierte en el principal órgano hematopoyético productor de los linajes inmunes (Epelman et al., 2014).

En los tejidos, los macrófagos se caracterizan por su dependencia del factor estimulante de colonias tipo1 (*por sus siglas en ingles Colony stimulating factor 1; también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos M-CSF*); sin embargo, en algunos tejidos los macrófagos dependen de la presencia de otras citocinas y metabolitos para su diferenciación y mantenimiento. Evidencia proveniente de técnicas de secuenciación de nueva generación ha permitido caracterizar los programas transcripcionales y epigenéticos de los macrófagos residentes de diversos tejidos (Lavin et al., 2015).

Los macrófagos residentes de tejido comparten la expresión de ciertos transcritos, sugiriendo que las señales del microambiente del tejido contribuyen a la regulación del perfil transcripcional de los macrófagos. La ontogenia y las señales ambientales modelan la identidad a través de las modificaciones epigenéticas, de elementos regulatorios (como potenciadores y promotores) así como factores de transcripción específicos. Ejemplo de ello es el factor de transcripción GATA6 para los macrófagos de la cavidad peritoneal y el receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR γ) para los macrófagos alveolares (Lavin et al., 2015).

I.IV Monocitos

Los monocitos son una población leucocitaria presente en todos los vertebrados, existiendo evidencia de una población homóloga en la hemolinfa de las moscas. Los monocitos son definidos por su localización, su fenotipo y su morfología, así como un patrón característico de expresión génica (Ginhoux & Jung, 2014). La proporción de monocitos en sangre periférica en humanos y ratones es de aproximadamente 10% y 4% respectivamente.

Los monocitos son células que tienen un diámetro de 12 a 15 μm . El núcleo ocupa aproximadamente la mitad del área de la célula y generalmente es reniforme, aunque puede encontrarse en forma ovalada. El núcleo contiene entre uno o dos nucléolos rodeados de cromatina. un citoplasma disperso, poco retículo endoplásmico y una gran cantidad de ribosomas y polisomas. En el citoplasma se encuentran un gran número de vesículas que contienen gránulos ricos en enzimas como la fosfatasa ácida, arilsulfatasa y peroxidasa y miden alrededor de 0.05 a 0.2 μm de diámetro, (Kaushansky et al., 2010).

Los monocitos al salir a sangre periférica a partir de los sitios de hematopoyesis se pueden mantener en circulación de uno a tres días, tiempo después del cual, si no son reclutados a los sitios de inflamación, mueren por apoptosis y son removidos de la circulación (Yang et al., 2014). Sin embargo, se ha reportado que, en condiciones homeostáticas, los monocitos pueden migrar a tejidos no linfoides sin diferenciarse a

macrófago o célula dendrítica (Jakubzick et al., 2013). Los autores proponen que estos monocitos sobreexpresan MHC de clase II y subsecuentemente recirculan a nódulos linfáticos, en donde son capaces de presentar antígeno a linfocitos T. Debido a que los monocitos infiltrados a tejidos mantienen el perfil de expresión característico de un monocito, se les denominaron “monocitos de tejido”, confiriéndoles ahora a los monocitos una función efectora y no de precursor de macrófago o célula dendrítica. (Ginhoux et al., 2016; Italiani et al., 2014).

El comité de nomenclatura de la Unión internacional de la Sociedad de Inmunología ha establecido una nomenclatura para dividir a los monocitos en tres subgrupos basada en la expresión de marcadores de superficie como CD14 y CD16 (Figura 2); clásicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermedios ($CD14^{++}CD16^{+}$) y no clásicos ($CD14^{+}CD16^{++}$) (Biswas & Mantovani, 2014).

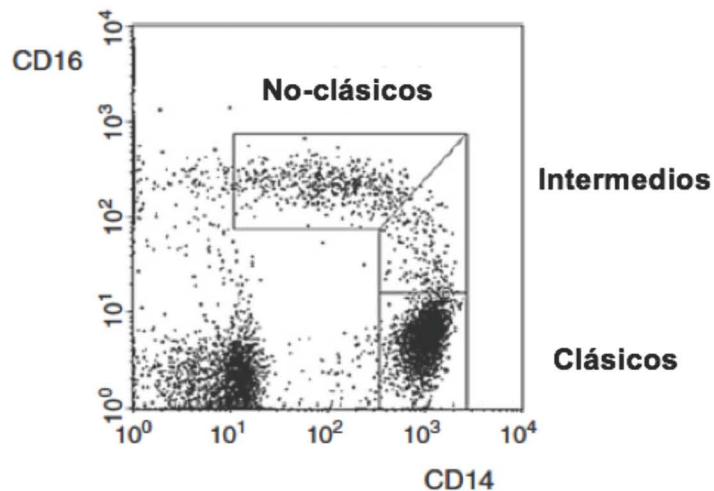


Figura 2. Gráfico de puntos de distribución de las tres subpoblaciones de monocitos en sangre periférica de humanos. Monocitos clásicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), los intermedios ($CD14^{++}CD16^{+}$) y los no clásicos ($CD14^{+}CD16^{++}$). (Modificado de Biswas et al., 2014)

I.V Ontogenia y origen de los monocitos

Los monocitos provienen de precursores hematopoyéticos. Las células madre hematopoyéticas son células pluripotentes localizadas en nichos especializados, lugar donde producen progenitores intermediarios de los monocitos. Hasta ahora se conocen cuatro intermediarios monocíticos: el progenitor común mieloide, el progenitor de granulocitos y macrófagos, el progenitor de macrófagos y células dendríticas, y el progenitor común monocito (Hettinger et al., 2013; Pittet et al., Swirski, 2014) perdiendo, éste último, progresivamente la capacidad de auto renovación restringiendo su linaje al fagocítico mononuclear.

En los adultos podemos distinguir dos sitios de origen de los monocitos: medular y extra-medular que son descritos a continuación.

I.V.I Monocitos derivados de medula ósea

La medula ósea es el sitio primario de hematopoyesis en los adultos. Dentro de la médula, las CMH se encuentran localizadas en nichos específicos, en éstos nichos se pueden encontrar células de soporte como son: células mesenquimales, células reticulares, macrófagos, neuronas, linfocitos T reguladores, células endoteliales, células perivasculares, células NK, entre otras. Éstas células de soporte secretan citocinas y factores de crecimiento que guían a las CMH a diferenciarse en diversos linajes (Cordeiro-Spinetti et al., 2015).

I.V.II Monocitos extra-medulares

Desde hace mas de 5 décadas se conoce que las CMH y sus precursores se pueden encontrar en circulación (Bronte & Pittet, 2013). Las CMH en circulación expresan el marcador CD47, proteína tipo inmunoglobulina que es capaz de interaccionar con el receptor SIRP-alpha en macrófagos, interacción que inhibe la fagocitosis (Bronte & Pittet, 2013). Si existe la señal correcta principalmente señal de TLR, las CMH y sus precursores pueden diferenciarse afuera de la médula ósea. Éste proceso, llamado hematopoyesis extra-medular ocurre predominantemente en el hígado, durante el

desarrollo embrionario y en el bazo en los adultos. Durante un estado de equilibrio las CMH senescentes se pueden localizar en el bazo sin embargo en un estado de inflamación aguda el bazo se convierte en un órgano mielopoyético (Freedman et al., 1981; Golub et al., 2013).

La hematopoyesis en bazo se ha reportado solo bajo condiciones patológicas como cáncer, anemia, mielo fibrosis infarto de miocardio, artritis y colitis descrito en diversos modelos murinos y en humanos (Freedman et al., 1981; Golub et al., 2013). Este proceso ocurre en la pulpa roja del bazo, en los sinusoides, y en este sitio anatómico es donde las células endoteliales secretan el factor de célula madre o SCF (*por sus siglas en ingles Stem cell factor*) y las células estromales Tcf21⁺ secretan CXCL12. Éstos factores confieren un nicho en el bazo que es permisible para el mantenimiento de CMH afuera de la médula ósea (Inra et al., 2015). En humanos se ha descrito en patologías como cáncer, bronquitis, cirrosis, neumonía, infarto al miocardio y embarazo. (Miwa et al., 2013; Singounas et al., 1991) y en concordancia con lo demostrado por Inra *et al* en muestras de bazo de estos pacientes se encuentra altamente expresado CXCL12, quimiocina asociada a marcador de nicho hematopoyético (Miwa et al., 2013).

La hematopoyesis extra-medular es inducida por factores como GM-CSF, IL-1b e IL-3, y depende del factor transcripcional C/EBP β (Bronte et al., 2013; Pittet et al., 2014). La producción de los monocitos provenientes de bazo es dependiente de la hormona angiotensina II y de la activación del receptor de angiotensina (AT-1) (Cortez-Retamozo et al., 2013).

Debido a que los monocitos derivados de bazo se producen en un estado de inflamación, y su contraparte de médula ósea producida en homeostasis, existe evidencia que indica que los monocitos proveniente de bazo generan una progresión de la enfermedad. Un ejemplo de este proceso es:

Los monocitos provenientes de bazo pueden promover la progresión tumoral debido a que migran al estroma del tumor y contribuyen a la formación de macrófagos

asociados a tumor (Cortez-Retamozo et al., 2013), así como a la inducción de tolerancia en células CD8+ de memoria hacia antígenos tumorales (Pittet et al., 2014). En un modelo murino de arteroesclerosis, al comparar los monocitos provenientes de bazo con los de médula ósea, la expresión a nivel de mensajero de genes que codifican a proteínas pro inflamatorias como IL-1b, IL-1 α e IL-18 se ven incrementadas confiriendo un estado pro inflamatorio y progresión de la enfermedad (Dutta et al., 2012). También se ha reportado que los monocitos de bazo se acumulan en el corazón e inducen dilatación ventricular a largo plazo, disfunción y fibrosis, y no así los monocitos provenientes de médula ósea (Ismahil et al., 2014).

El entendimiento de las diferencias funcionales de los monocitos provenientes de medula ósea y extramedulares, su asociación a desarrollo de patologías y su respuesta hacia patógenos puede dar pauta al desarrollo de terapias dirigidas a controlar los distintos respuestas celulares.

I.VI Movilización de monocitos

La movilización de monocitos de medula ósea en condiciones de no infección depende de distintos factores. La retención de monocitos en médula ósea depende de la expresión del receptor CX3CR1, CXCL12/CXCR4, entre otros; y la liberación homeostática de monocitos circulantes depende predominantemente de los ligandos de CCR2: CCL2 y CCL7 (Serbina et al., 2006).

CCL2 es la quimiocina que en condiciones de homeostasis tiene una expresión basal baja; sin embargo, durante un proceso inflamatorio su expresión aumenta rápidamente (Jung et al., 2015). En condiciones inflamatorias CCL2 es rápidamente liberada en la médula ósea y promueve la liberación de monocitos clásicos a sangre periférica (Owen et al., 2012). Ratones deficientes en CCR2 y CCL2 al ser infectados por bacterias mueren por sepsis debido a que no hay movilización de monocitos de médula ósea a sitios de infección (Serbina et al., 2006).

Se ha descrito en modelos murinos que en la medula ósea los monocitos CCR2 positivos se encuentran en contacto con células estromales productoras de CCL2, en condiciones de infección las células estromales liberan CCL2 y activan el receptor CCR2 de los monocitos. La activación del receptor desensibiliza la señal de permanencia de CXCL12/CXCR4 y activa la movilización del monocito hacia sangre periférica (Jung et al., 2015).

En condiciones fisiológicas homeostáticas el número de monocitos clásicos circulantes Ly6Chi (murinos), así como el reclutamiento hacia tejidos es regulado por genes asociados a los ciclos circadianos como lo es *Bmal1*. En los monocitos Ly6Chi, *Bmal1* se une al promotor de CCL2 e induce su silenciamiento mediante el reclutamiento de proteínas del complejo represor polycomb tipo 2. Las oscilaciones diurnas incrementan selectivamente el número de células monocíticas en sangre periférica, la capacidad de los monocitos de infiltrarse al tejido y la capacidad del organismo a controlar una infección (Nguyen et al., 2013). Éste mecanismo adaptativo permite al organismo anticiparse a alguna infección durante el tiempo en el que se encuentra en actividad el organismo.

I.VII Macrófagos derivados de monocitos

En condiciones de inflamación los monocitos circulantes producidos por progenitores mieloides migran a tejidos inflamados y se diferencian en macrófagos o células dendríticas. El desarrollo de monocitos/macrófagos en condiciones homeostáticas depende, principalmente, del factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1 conocido también como M-CSF). Los monocitos maduros expresan en su superficie el receptor CSF-1R, en circulación el factor de crecimiento se une a su receptor, activando un circuito de señalización responsable de la disminución de la proliferación de los monocitos. Por otro lado el factor GM-CSF es un factor que participa en el desarrollo de fagocitos mononucleares que se desarrollan en condiciones de inflamación y no en condiciones homeostáticas (Italiani & Boraschi, 2014).

Durante el proceso de maduración de monocitos a macrófagos, la célula aumenta de tamaño, el número de lisosomas y la cantidad de enzimas hidrolíticas dentro de los lisosomas (como son fosfatasas, esterases, glucoronidasas, lisozima y arilsulfatasa) incrementan. Al mismo tiempo el tamaño y el número de mitocondrias se acrecentan, así como su requerimiento energético, ejemplo de ello es el incremento en la producción de lactato. El complejo de Golgi, aumentan de tamaño y en la complejidad de las vesículas (Kaushansky et al., 2010).

Una vez que las células han adquirido, las características de maduración de monocitos/macrófagos, su capacidad proliferativa es limitada y su vida media puede variar entre un día a varios meses, dependiendo del microambiente o el proceso infeccioso (Kaushansky et al., 2010). Durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos diferentes receptores son expresados en diferente intensidad, algunas de estas moléculas son:

HLA-DR

El complejo mayor de histocompatibilidad ó antígeno leucocitario humano (por sus siglas en inglés *Human leukocyte antigen*) es una glicoproteína de tipo II que están codificadas en la región centromérica del cromosoma 6 (Robinson et al., 2013), las isoformas clásicas son HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ, su expresión tienen como principal función la presentación de antígenos para la activación de linfocitos T CD4⁺ (Jendro et al., Se ha reportado que la expresión del HL-DR aumenta con respecto a los días de diferenciación de monocito a macrófago (Chávez-Galán et al., 2015)

CD14

CD14 es una molécula que caracteriza al linaje mielóide. Es un polipéptido de 356 aminoácidos que se encuentra de manera soluble o unida a membrana, puede unirse a la membrana debido a la presencia de un grupo glicosilfosfatidilinositol. En la superficie puede unirse al receptor TLR-4, y su activación induce la expresión de citocinas pro inflamatorias como: IL-6, IL-1 β y TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa *por sus siglas en inglés Tumor necrosis factor alpha*) (Zamani et al., 2013). Otra de sus funciones

principales es fungir como receptor para endotoxinas como los lipopolisacáridos (LPS). (Kaushansky et al., 2010). Con respecto a su expresión superficial, aumenta en los monocitos y disminuye en granulocitos y macrófagos (Kaushansky et al., 2010).

CD80/CD86

La activación correcta de los linfocitos T requiere tres tipos de señales: la primera es la interacción del complejo MHC con el complejo de TCR, la segunda es la interacción de proteínas co-estimuladoras y la tercera es la señalización a través de citocinas pro inflamatorias y la interacción de las moléculas CD40 y CD40L (Owen et al., 2012).

Las proteínas CD80 y CD86, también llamadas B7-1 y B7-2, son parte del grupo de proteínas de co-estimulación que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígeno y que se unen a la proteína CD28, la cual se localiza en la superficie de las células T. Ésta interacción y la señalización subsecuente es crucial para la activación del linfocito T, de lo contrario el linfocito T entra en un estado de anergia (Jin, Fan, & Li, 2011). Se ha reportado que la expresión de CD80/CD86 varía con respecto al proceso de diferenciación *in vitro* de monocito a macrófago, sin embargo se ha observado que la expresión de CD86 aumenta con respecto a los días de diferenciación. Por otro lado la expresión de CD80 fluctúa con respecto a sus días de diferenciación (Chávez-Galán et al., 2015; Santin et al., 1999)

Los macrófagos tienen distintas moléculas de superficie que les confieren la capacidad de responder de manera eficaz contra la presencia de un patógeno: Entre ellos los PRR como los TLRs, la molécula de superficie TIM-3 que recientemente se identificó como una molécula de activación en la respuesta ante patógenos como *Mycobacterium tuberculosis*, y receptores de quimiocinas que permiten su movilidad hacia tejidos inflamados.

TLR

Los receptores tipo-Toll (TLR, por sus siglas en ingles *Toll-like receptors*) son una familia parte de los PRR. En el humano existen 10 tipos de receptores tipo TLR (TLR 1-10) y son expresados por células del sistema inmune, así como en tejidos no linfoides (Brubaker et al., 2015). Pueden reconocer componentes extracelulares (TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10) o intracelulares (TLR 3, 7, 8 y 9) (Brubaker et al., 2015), su vía general de señalización incluye a las moléculas adaptadoras MyD88 (*por sus siglas en ingles myeloid differentiation 88*), MAL (MyD88 adaptor like), TRIF (*por sus siglas en ingles TIR-domain containing adaptor inducing interferón β*), y TRAM (*por sus siglas en ingles TRIF-related adaptor molecule*), la activación de estas proteínas resulta en la activación de factores de transcripción como NF- κ B (*por sus siglas en ingles Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y el factor regulador de interferón (IRF *por sus siglas en ingles Interferon regulatory factors*) que resulta en la secreción de citocinas pro-inflamatorias, Interferones tipo I y quimiocinas que promueven la eliminación del patógeno (Acheke et al., 2016)

Dentro de los TLRs: TLR2 y TLR4 inmunológicamente importantes para la identificación de componentes extracelulares de las bacterias tales como LPS y lipoproteínas. TLR4 en conjunto con CD14 es parte importante de reconocimiento de LPS y componentes extracelulares de bacterias Gram negativas. El reconocimiento de LPS por TLR4 activa cascadas de señalización intracelular y movilización de proteínas adaptadoras como Myd88 y TRIF, lo que induce la producción de citocinas pro inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , e IL-12 (Farhat et al., 2008). Por otro lado, el receptor TLR2 es importante para el reconocimiento de componentes bacterianos y de la pared celular de los hongos. TLR2 dimeriza con TLR1 o TLR6 para reconocer lipoproteínas triaciladas y lipoproteínas diaciladas, respectivamente. Ambas dimerizaciones inician la activación de las vías de señalización de Myd88 y activación del factor de transcripción NF- κ B (Tunis et al., 2014).

TIM3

TIM3 es una proteína transmembranal conformada por tres dominios: el amino terminal con dominio inmunoglobulina (IgV), un dominio tipo mucina, seguido por un dominio transmembranal y una cola citoplasmática. TIM3 fue descrita por primera vez en linfocitos Th1, como regulador negativo de la activación de las células T cuando se da la unión con su ligando Galectina-9 y CEACAM1 (por sus siglas en inglés *carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1*) (Huang et al., 2014). En células del sistema inmune innato como los macrófagos también se ha descrito a TIM3 como regulador negativo de la activación de los macrófagos (Zhang et al., 2012). Sin embargo, también se ha reportado que TIM3 en macrófagos puede funcionar como molécula co-activadora (Ocaña-Guzman et al., 2016).

CXCR4

CXCR4 es un receptor transmembranal que interacciona con el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF *por sus siglas en inglés Macrophage migration inhibitory factor*) y la quimiocina CXCL12 (Chatterjee et al., 2015). La interacción de MIF con CXCR4 activa flujo de calcio, induce una rápida activación de integrinas, subsecuentemente quimiotaxis y unión mediada por integrinas (Li & Ley, 2015).

I.VIII Distribución de oxígeno en los tejidos.

El oxígeno es la molécula vital para los seres vivos, juega un papel importante en el metabolismo. Sin embargo, la difusión simple de los gases a los tejidos, así como de nutrientes no es suficiente para las necesidades metabólicas de los tejidos. Consecuentemente, es necesario proveer a los tejidos y a las células con concentraciones de oxígeno óptimas.

Diversas estrategias fisiológicas se han conservado durante la evolución para maximizar la captura y el transporte de oxígeno a los órganos. En los mamíferos, el oxígeno es absorbido por los pulmones. Debido a que el oxígeno es poco soluble, se une a la hemoglobina que se localiza en los glóbulos rojos. Un sistema de vasos sanguíneos permite la entrega de oxígeno por todo los tejidos del cuerpo. La macrovasculatura permite la circulación rápida de la sangre (arterias) y la microvasculatura (arterias y capilares) permiten la distribución de oxígeno a los tejidos. La oxigenación controlada es crucial para mantener los requerimientos metabólicos de cada órgano (Carreau et al., 2011) (Ver Tabla 1).

% Oxígeno	Distribución de oxígeno.
100.0	Presión atmosférica estándar.
21.0	Oxígeno en el aire a la presión atmosférica normal.
13.5	Concentración de oxígeno inspirado en los alveolos.
9.5	Concentración de oxígeno en la arteria.
6.5	Concentración de oxígeno aproximada al extremo venoso de la circulación

Tabla 1 Distribución aproximada de oxígeno en los tejidos. (Modificada de: Mckeown, 2014).

De acuerdo a la concentración de oxígeno en los tejidos se pueden distinguir distintos conceptos (Hammond et al., 2014; Mckeown, 2014):

- **Normoxia:** Concentración de oxígeno atmosférica. (20.9% O₂)
- **Fisioxia:** Concentración fisiológica del oxígeno en tejidos periféricos, la cual varía con respecto a la localización del tejido (entre 1.05 a 8.03 % O₂). (Ver Tabla 2)
- **Hipoxia:** Concentración de oxígeno por debajo a los niveles fisiológicos en cada tejido.

Tejido	pO ₂ mmHg	%O ₂
Cerebro	35	4.6
Pulmón	42.8	5.6
Hígado	31	4.08
Riñón	72	9.5
Musculo	25	3.25
Medula Ósea	54.9	7.14
Piel	8-35	1.05 - 4.61
Intestino	61	8.03
Páncreas	51.6	6.8

Tabla 2 Valores reportados de fisioxia en tejidos específicos en presión parcial de oxígeno y porcentaje de oxígeno. (Factor de conversión: 1mmHg = 0.13% O₂). (Modificada de Hammond et al., 2014 & Mckeown 2014).

I. IX Hipoxia

Se define como hipoxia al estado en el cual los niveles de oxígeno en los tejidos se encuentran por debajo de los niveles fisiológicos. La hipoxia ocurre cuando hay un desequilibrio entre el suministro y el consumo de oxígeno.

La hipoxia se describe en dos formas clásicas: crónica y aguda. El primer registro de la hipoxia crónica es de 1955, Thomlinson y Gray describieron a la hipoxia crónica como el producto del consumo de oxígeno por las células cercanas a las venas, dejando niveles inadecuados de oxígeno para las células mas allá de las vénulas, y por eso también es llamada hipoxia limitada a la difusión (Denekamp et al., 1999). otras causas de la hipoxia crónica pueden ser la hipoxemia producto de la apnea obstructiva de sueño (Araoz Illanes et al., 2011)

La hipoxia aguda es el resultado de las fluctuaciones en la perfusión de los tejidos, debido al cierre temporal de capilares o al cese de flujo sanguíneo por unos minutos o incluso horas. Este proceso es fisiológicamente temporal, por lo que también es llamada hipoxia cíclica (Denekamp et al., 1999).

La hipoxia patológica se desarrolla como un estado aberrante de tejido dañado o degenerado como resultado de una aportación de sangre deficiente o insuficiente vascularización. La hipoxia patológica se observa en tumores sólidos, inflamación, tejidos isquémicos, procesos de reparación de heridas y enfermedades pulmonares obstructivas. Es en ésta condición en donde el fenotipo y funcionalidad de las células expuestas a este ambiente se ve modificando, promoviendo la angiogénesis, activación, reprogramación metabólica y el reclutamiento de infiltrados leucocitarios (Bosco et al., 2008)

I.X Consecuencias biológicas de la hipoxia

El factor de inducible de hipoxia o HIF-1 (*por sus siglas en ingles Hypoxia Inducible Factor*) es un factor transcripcional heterodimérico, es el principal factor de transcripción inducible por hipoxia y es el responsable de controlar la expresión de alrededor de 70 genes, En normoxia, la proteína es prácticamente indetectable y su tiempo de vida media es de 5-8 minutos, por otro lado en hipoxia, la vida media de la proteína aumenta hasta 30 minutos (Moroz et al., 2009). HIF es una proteína hélice-bucle-hélice básica que forma complejos heterodimericos. El complejo regulatorio se conforma a partir de HIF-1 β , que

se expresa constitutivamente, y una de las isoformas de HIF-1 α : HIF-1 α o HIF-2 α . Aunado a este complejo diversas proteínas se unen a complejos coactivadores y modulan la transcripción de los genes diana (Lucólis et al., 2009).

Bajo condiciones hipóxicas tres proteínas de la familia de HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) median la respuesta a las bajas concentraciones de oxígeno tanto en tejidos normales como tumorales. Las proteínas HIF- α funcionan como sensores regulatorios de los niveles de oxígeno. HIF-1 α y HIF-2 α son reguladores críticos para la respuesta a la hipoxia, mientras que la función de HIF-3 α es desconocida. Dichas proteínas, ejercen una función regulatoria a nivel transcripcional. Para actuar como factores de transcripción las proteínas de la familia de HIF- α , heterodimerizan con el receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos ARNT (*por sus siglas en ingles Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) también llamado HIF-1 β (Wu et al., 2015). Debido a que la expresión de HIF-1 β es constitutiva la actividad del complejo HIF-1 es regulada exclusivamente por la expresión de HIF-1 α (Lucólis et al., 2009).

La estabilidad de la subunidad HIF-1 α es regulada a nivel postranscripcional por la disponibilidad de oxígeno a través de la enzima dependiente de hierro prolin-hidroxilasa (PHD *por sus siglas en ingles Prolyl-hydroxylases*). HIF-1 α tiene un dominio de degradación altamente sensible al oxígeno (OODD: *por sus siglas en ingles Oxygen dependent degradation domain*). En condiciones normóxicas, las PHD se activan e hidroxilan a HIF-1 α en las prolinas 402 y 564. La hidroxilación en éstos residuos de prolina permite la interacción con los aminoácidos 549-572 del dominio β de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL). pVHL es un componente del complejo E3 de la ubiquitin ligasa encargado de ubiquitinar a HIF-1 α , conduciéndolo a ser degradado por el proteosoma. La actividad de las PHD es dependiente de la disponibilidad de oxígeno y el intermediario del ciclo de Krebs, α -cetoglutarato (Palazon et al., 2014).

En condiciones de hipoxia, las subunidades HIF-1 α y HIF2- α heterodimerizan con HIF-1 β para funcionar como factores transcripcionales de aquellos genes cuya expresión

esta mediada por elementos de respuesta a la hipoxia, los cuales favorecen el incremento de suplemento de oxígeno y entrega de nutrientes a las células mediante la inducción de angiogénesis y eritropoyesis. Los elementos de respuesta a hipoxia, caracterizados por la secuencia consenso 5'-TACGTG-3', se distribuyen a lo largo de los cromosomas y conforman alrededor de 100 genes descritos (Krohn et al., 2008). Adicionalmente, para abastecer las necesidades metabólicas de las células se induce la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas. Posterior a la estabilización de HIF-1 α , la proteína heterodimérica activa la transcripción de numerosos genes incluidos (GLUT-1, VEGF, CA9), los cuales participan en el proceso de angiogénesis, proliferación, metabolismo glicolítico y la regulación de pH.

I.XI Maduración de monocitos en condiciones hipóxicas

En etapas tempranas del desarrollo en la médula ósea, los monocitos inmaduros están expuestos a bajas concentraciones de oxígeno (52 mmHg) (Figura 3). Esta claramente definido que la hipoxia es un factor fundamental durante la monocitopoyesis humana, debido a que se ha demostrado experimentalmente que al cultivar progenitores de médula ósea y cultivarlos en condiciones hipóxicas (<5%), los progenitores formaban mayores colonias cuando se compara con aquellos diferenciadas en condiciones de normoxia (Villarruel et al., 2008).

La extravasación de los monocitos es un evento temprano en la respuesta inflamatoria, proceso mediado por señales quimiotácticas, así como moléculas de adhesión expresadas en células endoteliales. Los monocitos migran hacia un gradiente definido de quimiocinas y dependiendo a la condición patológica pueden enfrentarse a un ambiente carente de oxígeno, como puede ser en las articulaciones inflamadas, placas ateroscleróticas, heridas y tumores sólidos (Strehl et al., 2014). En las células endoteliales, se sobre expresan moléculas de adhesión en condiciones hipóxicas, así como un incremento en la secreción de moléculas quimio tácticas como lo es VEGF, endotelina, polipéptido activador de monocitos endoteliales II, angiopoyetina 2 y la quimioquina CXCL12 (Bosco et al., 2008).

Bajo condiciones de inflamación los macrófagos se acumulan en sitios de hipoxia estable como son las heridas y los tumores solidos, en donde pueden llegar a estar expuestos a condiciones de hipoxia crónica (0.3-2.2% O₂) (Mckeown, 2014). Actualmente se sabe que valores de tensión de O₂ menores a 2.5%, que se puede considerar hipoxia en el laboratorio, ocurre en tejidos como parte de su fisiología normal, incluyendo áreas con alta vascularización como es el bazo (Strehl et al., 2014).

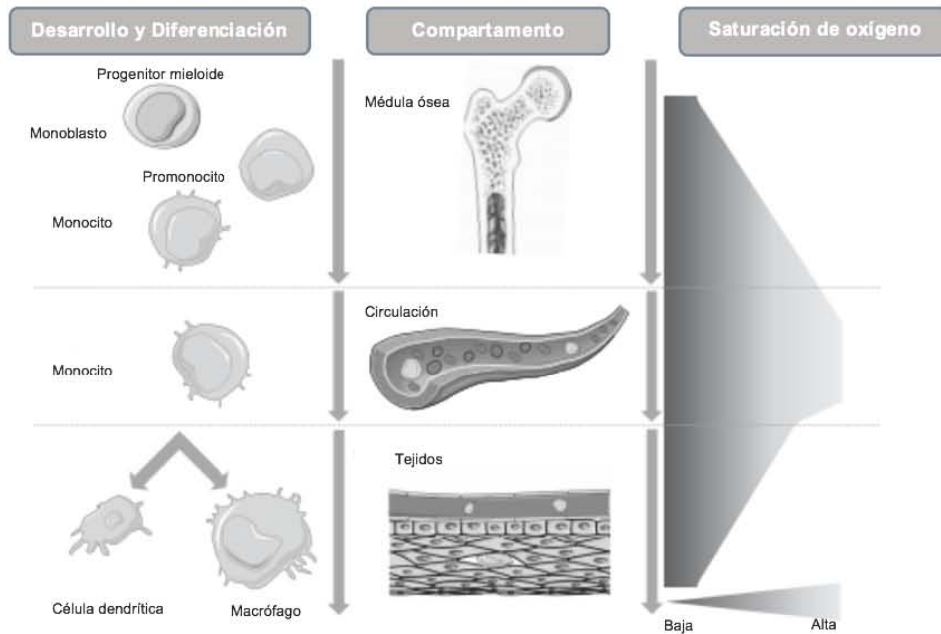


Figura 3. Saturación de oxígeno en diversas etapas del desarrollo de monocitos y macrófagos en distintos compartimentos del cuerpo médula, circulación y tejidos. Durante el proceso de desarrollo y diferenciación de los monocitos así como en diferenciación de monocito a macrófago o célula dendrítica, la saturación de oxígeno varía con respecto a su localización en médula ósea, circulación o en el tejido inflamado (Modificado de Strehl, 2011).

Por ende, los monocitos provenientes del torrente sanguíneo, durante su proceso de maduración pueden estar expuestos a hipoxia estable o hipoxia crónica. Considerando que la prevalencia de la hipoxia en condiciones patológicas en los tejidos es un fenómeno frecuente, es posible que la diferenciación de monocitos a macrófagos en ambientes carentes de oxígeno sea un proceso que ocurra con alta frecuencia. Hasta ahora, se desconoce el efecto, sobre el fenotipo, de la hipoxia durante un proceso de siete días diferenciación *in vitro* de monocitos a macrófagos .

II. Justificación

El papel de los monocitos en la regulación del sistema inmune innato es necesario para un control correcto y eficaz de los patógenos. El proceso de diferenciación de los macrófagos derivados de monocitos es importante para regular la respuesta inflamatoria. La carencia de oxígeno en los tejidos, con lleva a procesos de diferenciación y activación distintos. Por lo que, se considera necesario conocer el papel de la hipoxia en el proceso de diferenciación y activación de los monocitos y macrófagos en condiciones hipóxicas.

III. Hipótesis

H0: La exposición de los monocitos durante su proceso de diferenciación a macrófagos en condiciones de hipoxia modifica la expresión de marcadores de diferenciación.

H1: La exposición de los monocitos durante su proceso de diferenciación a macrófagos en condiciones de hipoxia no modifica la expresión de marcadores de diferenciación.

IV. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el papel de la hipoxia en el perfil de expresión de marcadores de maduración y función durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos.

Objetivos particulares

- Evaluar el perfil de expresión de los marcadores de maduración como CD14, CD80, CD86, TLR2, TLR4, HLADR, CXCR4 y TIM-3 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos expuestos a hipoxia constante (0-2% O₂) mediante citometría de flujo.
- Evaluar la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 y HIF-1 α durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos expuestos a hipoxia constante (0-2% O₂) mediante citometría de flujo.
- Evaluar la expresión de ARN mensajero de TIM-3, GLUT-1 y HIF-1 α durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos expuestos a hipoxia constante (0-2% O₂).
- Evaluar la secreción de IFN γ durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago expuestos macrófagos expuestos a hipoxia constante (0-2% O₂).

V. Materiales y métodos

V.I Obtención de células mononucleares totales.

Las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron a partir de concentrados leucocitarios de donadores sanos que acudieron al banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. A partir de 25 ml de sangre se realizó una dilución en una relación 1:1 con buffer salino-fosfato (PBS) pH 7.2-7.4. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 800 x g por 30 minutos y 18°C en un gradiente de Lymphoprep densidad 1.07. A continuación se colectó la interface de CMN (Células mononucleares totales) y se descartó el plasma, se realizaron 3 lavados con PBS a una velocidad de 250 x g por 10 minutos con la finalidad de retirar el exceso de plaquetas. Finalmente, se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Biowest). Se contó y analizó la viabilidad celular en el contador digital TC20 (Bio-Rad).

V.II Separación de monocitos y diferenciación de macrófagos.

El modelo de diferenciación se realizó con respecto a los métodos establecidos en el laboratorio. Se prepararon dos placas de cultivo de 6 pozos se sembraron 13×10^6 CMN en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB las cuales se dejaron adherir por 2 horas a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂. Pasado el tiempo de adherencia, se retiraron las células no adherentes y se adicionó nuevo medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y GM-CSF a una concentración de 5ng/ml. Una placa de cultivo con CMN se colocó en la incubadora a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂ y otra placa se colocó dentro de la cámara de hipoxia (BioSpherix) a una concentración de O₂ que fluctuaban entre el 0-2%. Las células permanecieron en cultivo durante 7 días en las condiciones de normoxia o hipoxia. El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada 2 días (RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y GM-CSF 5ng/ml).

V.III Cámara de hipoxia

Con la finalidad de inducir un ambiente carente de oxígeno se utilizó la cámara de hipoxia de ProOx C21 de la marca BioSpherix. El modelo ProOX C21 permite la medición y regulación simultánea de la concentración de O_2 y CO_2 . Las concentraciones de oxígeno fluctuaron entre los valores de 0-2% O_2 . El ambiente hipóxico, se generó mediante la introducción de una cámara a la incubadora. En la parte posterior de la cámara se localiza un regulador, que mide las concentraciones de O_2 y CO_2 , el cual está conectado al controlador ProOX C21. Dicho controlador está conectado a un tanque de nitrógeno, y es por éste medio que el gas es introducido a la cámara para desplazar el O_2 que se localiza dentro de la cámara y generar así un ambiente hipóxico (Figura 4).

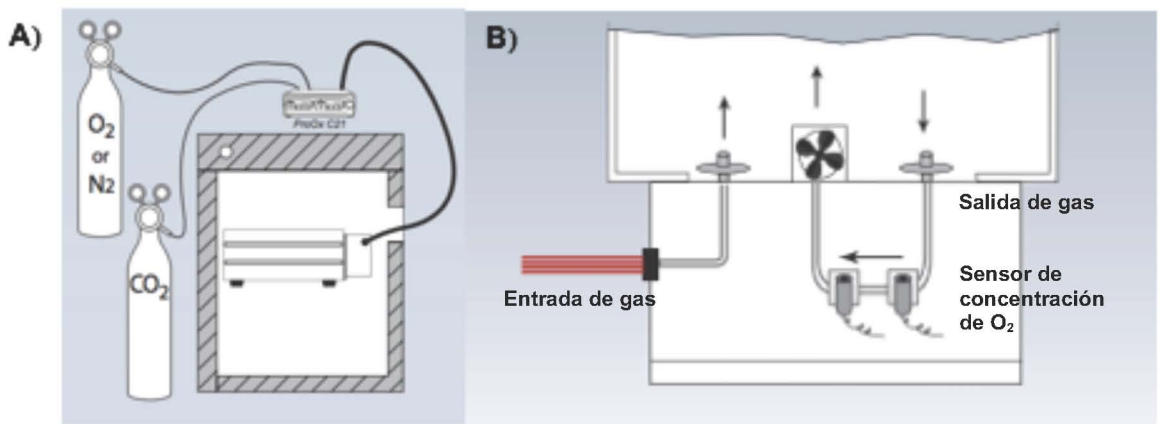


Figura 4. Instalación de cámara de hipoxia y controlador ProOX C21. A) La cámara de hipoxia se colocó dentro dentro de la incubadora, conectada a un regulador (inciso B) el cual mide los niveles de O_2 y manda la señal a ProOx C21 para infundir N_2 y controlar continuamente los niveles de O_2 . B) Regulador de la concentración de O_2 dentro de la cámara de hipoxia. En el lado izquierdo del regulador, se localiza la entrada de gas dentro de la cámara mientras que al lado derecha una salida de que gas toma muestras para medir la concentración de O_2 . El ventilador permite regresar el gas que fue censado previamente, a la cámara de hipoxia.

V.IV Recuperación de células adherentes

Las células adherentes se recuperaron en los tiempos 1, 3, 5 y 7 días posterior al día de adherencia. Para despegar las células de la placa de cultivo se retiró el medio de cultivo y se guardó para el análisis posterior de citocinas. Las células se recuperaron mediante una incubación con 3 ml de PBS-EDTA 2mM durante 30 minutos en las condiciones de normoxia o hipoxia. Se dejó incubar por 30 minutos, en normoxia o hipoxia dependiendo la condición experimental. Al termino de la incubación se recuperó el PBS-EDTA y se dieron dos lavados con PBS-EDTA 2mM para recuperar las células que pudieran quedar adheridas. Para corroborar que se despegaron completamente se observó la placa en microscopio de óptico para determinar adherencia celular. Las células se centrifugaron por 10 minutos a 300g), posteriormente se determinó el número de células y la viabilidad de las mismas a través del contador digital TC20 (Bio-Rad).

V.V Inmunofenotipificación

Durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos se evaluaron marcadores de superficie y proteínas intracelulares a través de la técnica de citometría de flujo. Las células se marcaron con distintos anticuerpos de acuerdo al panel de citometría de flujo (Tabla 3). Se analizaron moléculas de superficie como: CD14 (FITC BioLegend Clone: HCD14; PeCy7 BioLegend Clone: HCD14), CD68 (PE BioLegend Clone: Y1/82A; FITC BioLegend Clone: Y1/82A), CD86 (PE/Cy7 BioLegend Clone: IT2.2), TLR2 (Alexa Fluor 647 Biolegend Clone: TL2.1), TLR4 (PE BioLegend Clone: HTA125, Brilliant Violet 412 BioLegend Clone: HTA125), HLA-DR (APC/Cy7 BioLegend Clone:L243), TIM-3 (Brilliant Violet 421 BioLegend Clone: F38-2E2), GLUT-1 (Fluoresceina R&D Systems Catalog Number: FAB1418F) y CXCR4 (PE BioLegend Clone: 12G5); así como el factor transcripcional HIF-1 α (PE R&D Systems Catalog Number: ICI935P) .

		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
Lasers	Fluorocromo primario	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
488 nm	FITC		CD14	CD14	CD68	GLUT1		CD14	CD68
	PE		CD68	CD68	HIF-1 α	CXCR4			TRL4
	PeCy5		CD80						
	PE-Cy7		CD86		CD14	CD14	CD14		CD14
633 nm	APC		TLR2						
	APC-Cy7		HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR			
405 nm	AF-405		TLR4			TIM-3			

Tabla 3. Panel de anticuerpos para la detección de proteínas intracelulares y marcadores de superficie.

Las células se separaron en tubos que contenían una concentración de 1.5×10^5 células. Las células se resuspendieron en buffer de tinción, y posteriormente se adicionó el coctel de anticuerpo correspondiente a cada tubo. La muestra se dejó incubar durante 30 minutos a 4 °C. Al término del tiempo de incubación, la muestra fue sometida a un proceso de lavado con 500 μ L de buffer de tinción para retirar exceso de anticuerpos y se centrifugo 5 minutos a 300g. El sobrenadante se descartó, y las células se resuspendieron en 200 μ L de buffer de tinción. Para la tinción intracelular (Tubo 4) Se utilizó el kit de fijación y permeabilización de BD Cytofix/Cyoperm™. Brevemente, después del lavado con buffer de tinción se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 250 μ L de la solución BD Cytofix/Cytoperm por 20 minutos a 4°C. Pasado los 20 minutos, se realizaron dos lavados de 500 μ L de solución de lavado BD Perm/Wash™ se centrifugó 5 minutos a 1500rpm. Al término de los lavados el botón celular se resuspendió en 50 μ L de solución de lavado BD Perm/Wash™ y se adicionó 3 μ L de anti-HIF-1 α . La muestra se dejó incubar durante 30 minutos a 4 °C, al término de la incubación se adicionó 500 μ L de buffer de tinción para retirar exceso de anticuerpos y se centrifugo 5 minutos a 300g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 μ L de buffer de tinción. Los datos se obtuvieron en un citómetro de flujo FACSAria™IIIu a través del software FACSDiva (BD Biosciences). La compensación se realizó marcando 1.5×10^5 células adherentes con 3 μ L de CD14 (FITC), CD14 (PE), CD14 (PerCP), CD14 (PeCy7), TLR2 (APC), CD14 (APC Cy7) y TIM3 (BV421).

V.VI Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó el kit de extracción de QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN). A partir de 1×10^6 células adherentes y con la finalidad de lisar las células se adicionaron 350 μ L de buffer de lisis RLT (1% Betamercaptoethanol) y 40 μ L de proteinasa K. La muestra se incubó por 10 minutos a 56° C homogenizando constantemente . Al término de la incubación se adicionaron 390 μ L de etanol al 70%, y la muestra se pasó a una columna de extracción. La muestra se centrifugó a ≥ 8000 x g por 30 segundos, se desechó el líquido del tubo colector, y se lavó la columna con 350 μ L de buffer RW1. Posteriormente, la muestra se trató con DNasa I (10 μ L de Rnase-Free Dnase Set, Qiagen y 70 μ L de solución RDD) y se incubó 25 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación se adicionó 350 μ L de solución RW1 a la columna, y se centrifugó ≥ 8000 x g por 15 segundos para descartar el lavado. Se realizaron dos lavados con 500 μ L de solución RPE , centrifugando a ≥ 8000 x g por 15 segundos y 2 minutos, respectivamente. La columna se transfirió a un tubo colector nuevo y se centrifugó a $\geq 10,000$ x g por 1 minuto. Posteriormente se transfirió la columna a un tubo nuevo para la elución del RNA con 40 μ L de agua libre de endonucleasas centrifugando a 10,000 x g por 1 minuto. Al finalizar se almacenó la muestra a -70° C.

V.VII Cuantificación de RNA

Para determinar la pureza y la cantidad de RNA se utilizó el kit de cuantificación Quibit RNA Applied Biosystem.

V.VIII Obtención de cDNA.

Para la obtención del cDNA se utilizó el Kit "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits" de Applied Biosystems. Para cada tiempo y condición experimental se prepararon dos reacciones de Retro Transcripción con un volumen final de 20 μ L por reacción. 50 ng de RNA total fueron convertidos a cDNA, mediante reacción de Retro transcriptasa reversa.. Brevemente, para cada muestra se calculó el volumen necesario para que la concentración de RNA por reacción fuera de 50ng por reacción, posteriormente se diluyó

la muestra de RNA a un volumen de 20 μL y por otro lado se preparo una master mix para cada reacción que contenía: 4 μL de 10X buffer, 21.6 μL de 25 dNTP, 4 μL de 10x random y 6.4 μL de agua libre de RNAsas; siendo el volumen final de 20 μL . Finalmente se combino la solución de RNA y de Master mix para llegar a un volumen final de 40 μL .

Posteriormente se procedió a colocar las muestras en el termociclador StemOnePlus™

V.IX Selección de genes endógenos.

V.IX .I Validación de genes endógenos y genes blanco.

El estudio la expresión génica bajo condiciones hipóxicas y normóxicas de los genes HIF-1 α , TIM-3 y GLUT-1 se realizó mediante cuantificación relativa utilizando el método $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Para realizar la cuantificación relativa de los genes de interés es necesario la normalización con genes endógenos, en este caso se utilizaron los genes de expresión constitutiva β -Actina y RPLO los cuales no cambian su expresión en las diferentes condiciones estudiadas. .

Para el empleo del el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ se requiere la validación de los genes endógenos y los genes problema, lo cual consiste en realizar un curva de calibración estándar o el método ΔC_T , donde la eficiencia de amplificación de los genes endógenos y problema debe de ser de $100\% \pm 10$.

Para esta validación se construyó una curva de seis puntos con una dilución seriada (relación 1:3) del cDNA . (Figura 5).

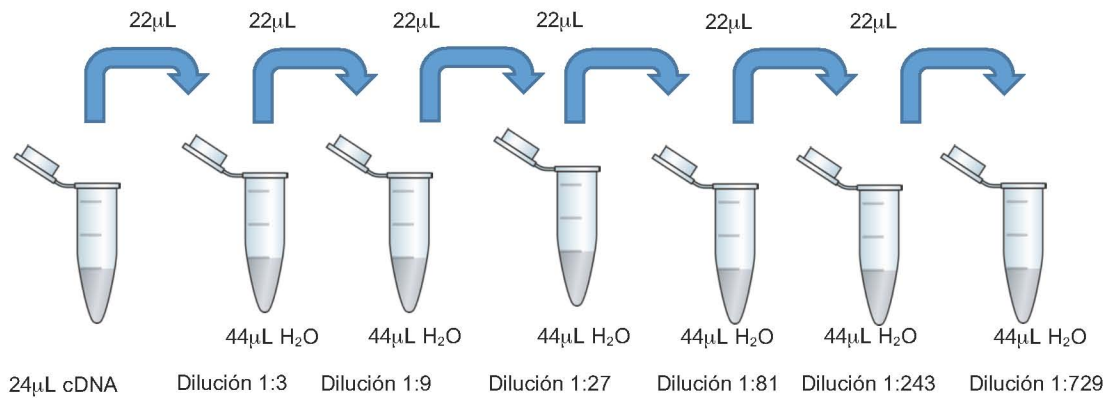


Figura 5 . Esquema de dilución seriada 1:3 para realización de curva estándar y validación de gen endógeno.

Para evaluar la eficiencia de amplificación de cada gene y la validación del gene endógeno cada punto de la curva se realizó por triplicado. A partir de la muestra de cDNA diluido se realizó PCR en tiempo real (qPCR) por triplicado para evaluar la eficiencia de amplificación de cada gene y la validación del gene endógeno. Se utilizó el kit de PCR Thermo Scientific Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) el cual contiene: Maxima Hot Start *Taq DNA Polymerase*, Maxima Probe qPCR Buffer, colorante de referencia pasiva ROX y dUTP. Se utilizaron sondas Taqman para detección de los genes : HIF-1 α , GLUT-1, TIM-3, RPLO y Actina (Tabla 5).

Cada reacción de PCR contenía: 5 µL de 2X Master Mix, 0.5 de sonda, 2 µL de H₂O y 2.5 µL de cDNA; siendo el volumen final de la reacción de 10 µL. Se colocaron las muestras en placas de 96 para Step OnePlus™ y se corrió la PCR.

Gene	Secuencia
GLUT-1 (FAM)	GCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGA
HIF1 (FAM)	GCACTGCTGGAGCAGCTACCCTGGA
TIM-3 (FAM)	CTACTTACAAGGTCCTCAGAAGTGG
RPLO (VIC)	TGTTTCATTGTGGGAGCAGACAATG
Actina (VIC)	TGTTTCATTGTGGGAGCAGACAATG

Tabla 5 Secuencia de sondas Secuencias de las distintas sondas utilizadas en este estudio: GLUT-1, HIF-1, TIM-3, RPLO y Actina.

V.X Detección de IFN γ en sobrenadantes de cultivo

La cuantificación de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivos en distintas condición y a diferentes tiempos se realizó mediante un ensayo de inmunodetección usando el kit de ELISA: Human IFN- γ Standard ABTS ELISA Development Kit. Para su realización se siguieron las instrucciones del proveedor. Las placas se sensibilizaron con anticuerpo de captura anti-IFN γ (1:200), incubándose toda la noche a temperatura ambiente. Para retirar el exceso de anticuerpo se realizaron lavados, y se bloqueo la placa con 100 μ L de buffer de bloqueo durante una hora. Posteriormente, la citocina IFN- γ se reconstituyó a partir de la cual se realizó la curva estándar para el cálculo de la concentración de citocina. En los pozos correspondientes se agregó 100 μ L de cada estándar así como 100 μ L de cada sobrenadante incubándose 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron lavados y se agregó 100 μ L de anticuerpo de detección biotinilado; y la placa se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de incubación se agregó 100 μ L de enzima peroxidasa con avidina incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente añadir buffer de sustrato e incubar por 15 minutos. Al termino del tiempo de incubación se leyó la absorbancia de las placas en un espectrofotómetro para ELISA iMark™ Microplate Reader (BioRad) a 450 nm. A partir de los valores de la curva estándar se extrapolaron los valores para determinar la concentración de la citocina en los sobrenadantes de cultivo.

V.XI Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el ensayo de ANOVA no paramétrica con Kruskal Wallis usando el programa GraphPad Prism.

VI) Resultados

VI.I) Validación de genes endógenos

Se realizó una curva estándar construida a partir de los valores de C_T de diluciones seriadas (Figura 6). Y se evaluó la eficiencia de amplificación cuyo valor debe ser de 100% +/- 10 con un valor de pendiente cercano a -3.32 (Figura 7). En la tabla se muestran los valores obtenidos, donde se observó que la curva de todos los genes entraban dentro del rango (Tabla 6).

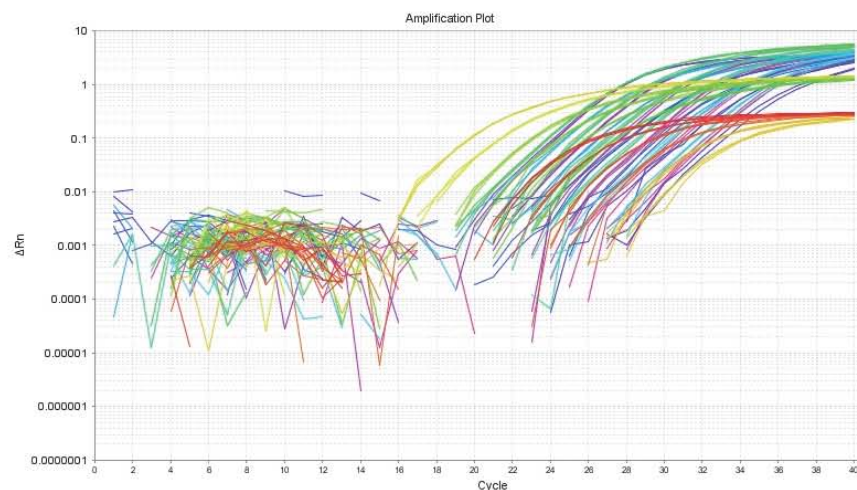


Figura 6. Gráfica de amplificación de curva estándar de la dilución seriada. Gráfica de amplificación de genes obtenido en el Step OnePlus™,

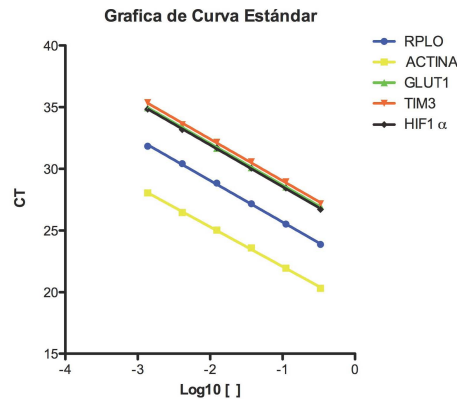


Figura 7. Gráfica de las curvas estándar de los distintos genes evaluados en donde se obtiene el valor de la pendiente, a partir de la cual se calculó la eficiencia de amplificación ($E = (10^{-1/m} - 1) \times 100$).

	Eficiencia de amplificación	R²	m=
RPLO	98.3%	0.99921	-3.3632
ACTINA	104.82%	0.99928	-3.2115
GLUT1	98.11%	0.9996	-3.368
TIM3	97.7%	0.9903	-3.3781
HIF-1 α	97.54%	0.9954	-3.3823

Tabla 6. Tabla de valores de eficiencia de amplificación, el índice de correlación (R^2) y el valor de la pendiente.

Se realizó la validación de los genes endógenos Actina y RPLO utilizando los valores de ΔCT ($\Delta CT = C_T \text{ blanco} - C_T \text{ endógeno}$), y se graficaron los valores de ΔCT contra el Log10 de la concentración inicial de DNA (Figura 8) (Tabla 7). Dado que los valores de la pendiente de la recta deben de ser entre - 0.1 a 0.1 se decidió utilizar RPLO como gene endógeno

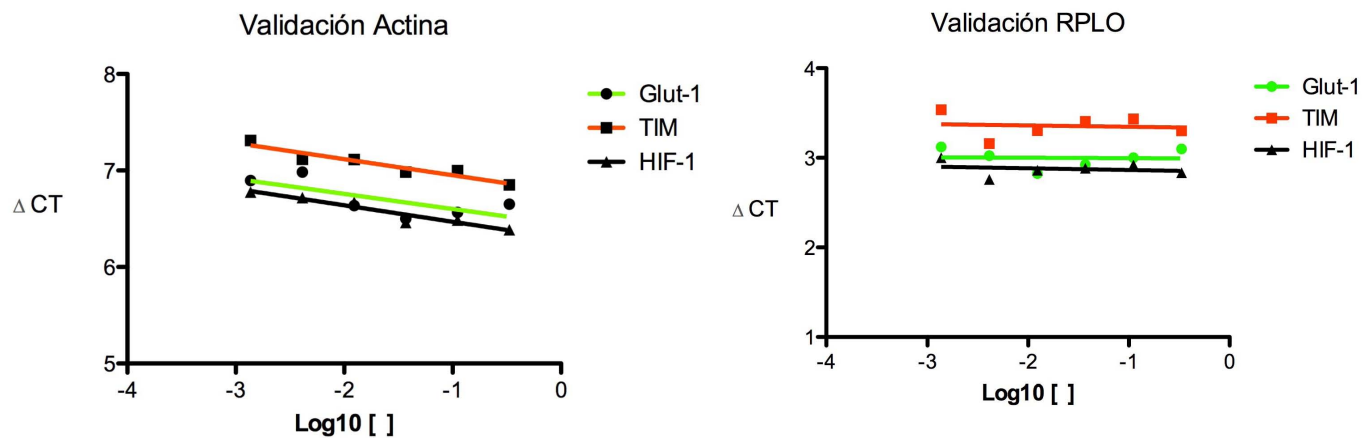


Figura 8. Gráficas de validación Actina y RPL0 Se graficó en eje de las X los valores de ΔCT y en el eje de las Y logaritmo de la concentración inicial de RNA.

	m=blanco-actina	m=blanco-RPLO
GLUT-1	-0.1143	-0.0047
TIM3	-0.1666	-0.0149
HIF-1 α	-0.1708	-0.0191

Tabla 7. Valores de pendiente (m) de Glut-1, TIM-3 y HIF-1 α validados contra actina y RPL0. Los valores de pendiente (m) de cada gene con respecto a la actina no entra dentro del rango permitido -0.1 a 0.1; sin embargo, los genes validados con RPL0 entran dentro del rango -0.1 a 0.1 por lo que se decidió utilizar el gene RPL0 como endógeno.

VI.II) Cinética de expresión de HLA-DR, CD80, CD86, TLR-2, TLR-4 y CXCR4 en condiciones normóxicas e hipóxicas.

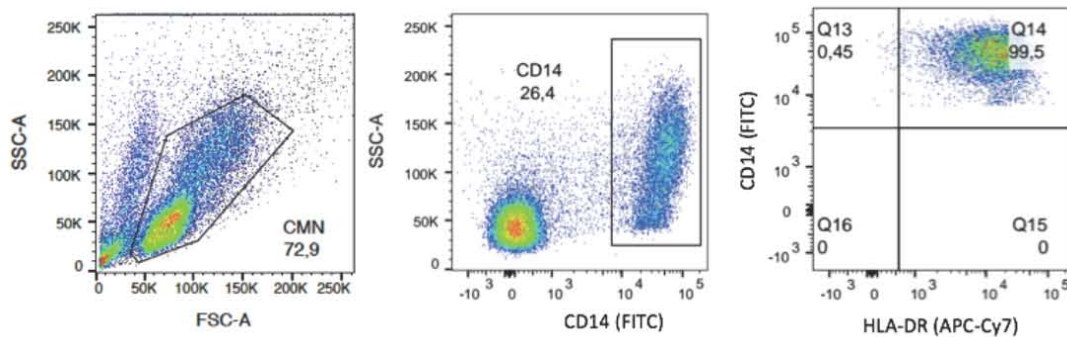


Figura 9 Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos HLA-DR. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para HLA-DR.

Uno de los marcadores a evaluar fue el receptor membranal HLA-DR (Figura 9 y 10). Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones hipóxicas y normóxicas la frecuencia de células HLA-DR positivas alcanza el 100%, en ambas condiciones (Figura 10A). Con respecto a la intensidad media de fluorescencia (IMF) del mismo HLA-DR durante el proceso de diferenciación, incrementó durante este proceso siendo el día 3 y el 5 la expresión mas alta en ambas condiciones experimentales. Al comparar la intensidad de expresión de HLA-DR en condiciones de hipoxia se identificaron diferencias en los día 3 y 5 cuando se compara con el día 1 (* $p < 0.05$). En el día 7 la expresión de este marcador fue semejante en ambas condiciones experimentales (Figura 10B).

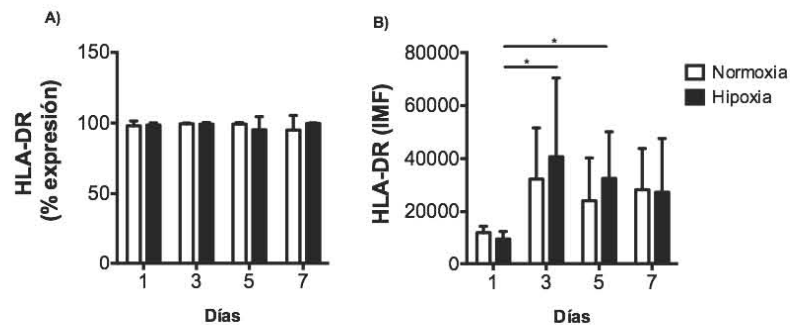


Figura 10. Cinética de expresión de HLA-DR durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos HLA-DR durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). B) IMF de monocitos-macrófagos HLA-DR durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). ($n = 5$) * $p < 0.05$

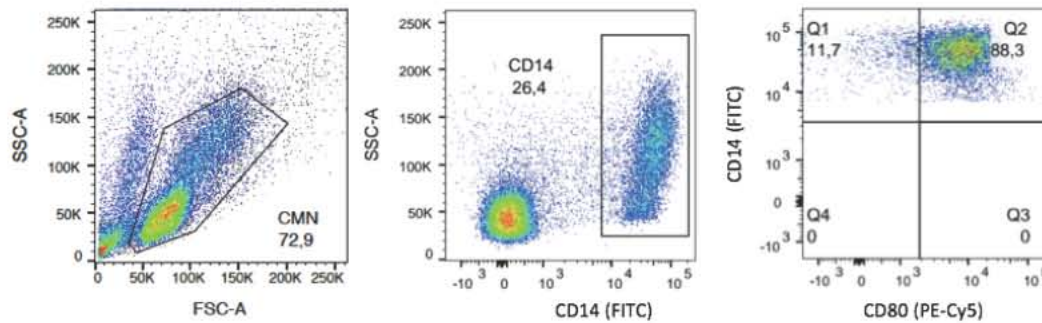


Figura 11. Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos CD80. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para CD80.

Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago (Figura 11 y 12A) en condiciones normóxicas la expresión de CD80 aumenta con respecto al día inicial de la diferenciación. Las células diferenciadas en condiciones de hipoxia mantienen una expresión constante, que se ve disminuida para el día quinto y posteriormente incrementa para el día final de la diferenciación. Se evaluó la IMF de CD8- (Figura 12B) y se observó que los monocitos en diferenciación en condiciones normóxicas incrementaron la expresión de CD80 al día 3 y que se mantuvo constante hasta el día 7 de diferenciación. Sin embargo, cuando se observó la IMF en macrófagos en proceso de diferenciación en condiciones hipóxicas, se pudo observar que la expresión incrementó de manera más importante con respecto al día 5 y 7, sin embargo este cambio no se considera estadísticamente significativo ($p= 0.05$).

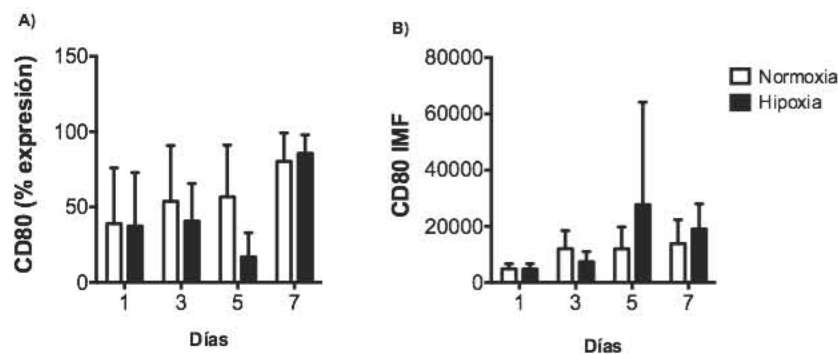
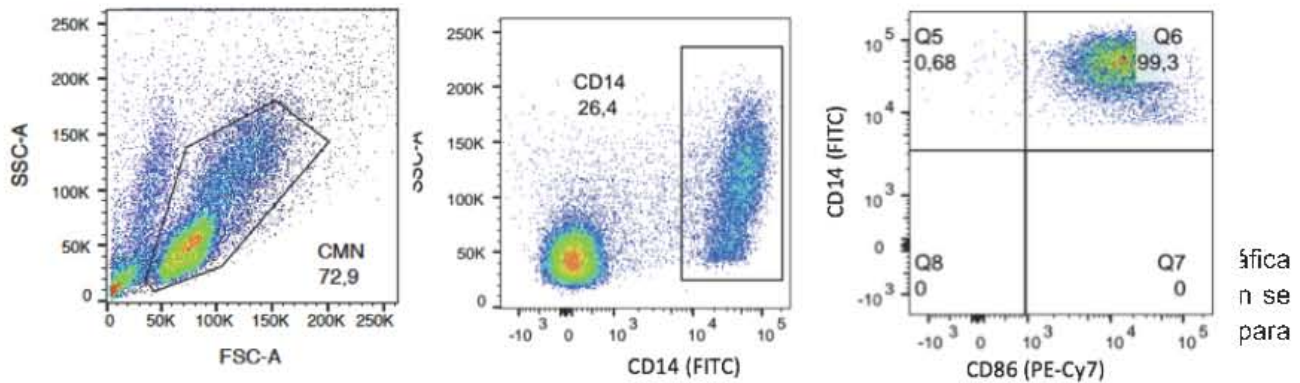


Figura 12. Cinética de expresión de CD80 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos CD80 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7) Mann-Whitney test. B) IMF de monocitos-macrófagos CD80 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). ($n= 5$)



Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago la expresión de CD86 tanto en condiciones normóxicas como en hipóxicas se mantuvo incrementada durante todo el proceso de diferenciación (Figura 13 y 14A). Al comparar la IMF de CD86 en condiciones normóxicas se puede observar que incrementó de manera directa con respecto al tiempo (Figura 14B). Al evaluar la IMF de CD86 durante el proceso de diferenciación en condiciones hipóxicas, podemos observar que los valores aumentaron conforme pasa el tiempo de diferenciación. Es importante mencionar que para el día 5 de diferenciación en condiciones de hipoxia la expresión de CD86 tiende a incrementar de manera importante con respecto a los demás días, sin embargo estadísticamente no se ve un cambio en la expresión.

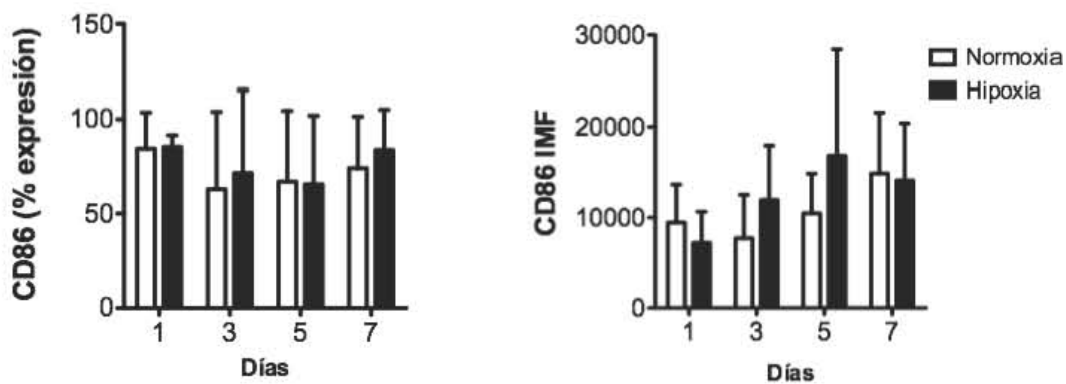


Figura 14. Cinética de expresión de CD86 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos CD86 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). B) IMF de monocitos-macrófagos CD86 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). (n= 5)

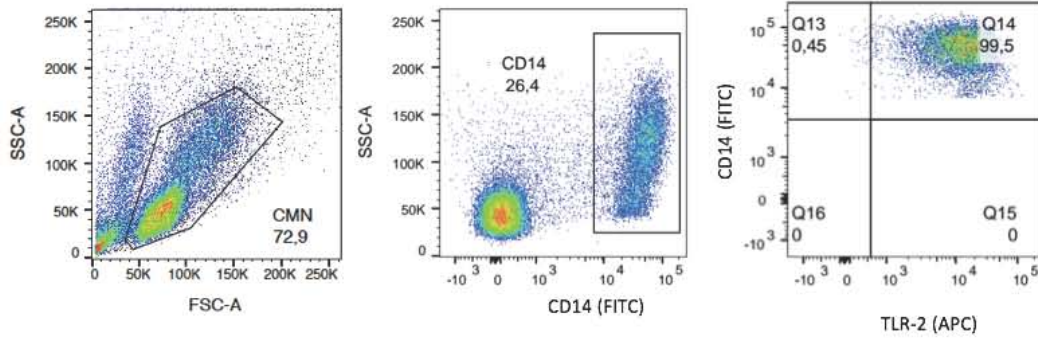


Figura 15 Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos TLR-2. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para TLR-2.

Durante el proceso de maduración de monocito a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas la frecuencia de células TLR2+; en condiciones de hipoxia la frecuencia de células positivas disminuye en el día 5 con respecto al día 1 ($p < 0.05$), y posteriormente aumentó para el día 7 (Figura 15 y 16A). Con respecto a la IMF del TLR-2 durante el proceso de diferenciación se puede denotar que en condiciones normóxicas la expresión de dicho receptor se mantuvo constante. En contraste, la IMF de TLR-2 condiciones hipóxicas se vio modificada, presentando en el 5 y el día 7 los valores mas altos de IMF. (Figura 16B) sin embargo debido a la gran dispersión de los datos los resultados no se observa significancia estadística.

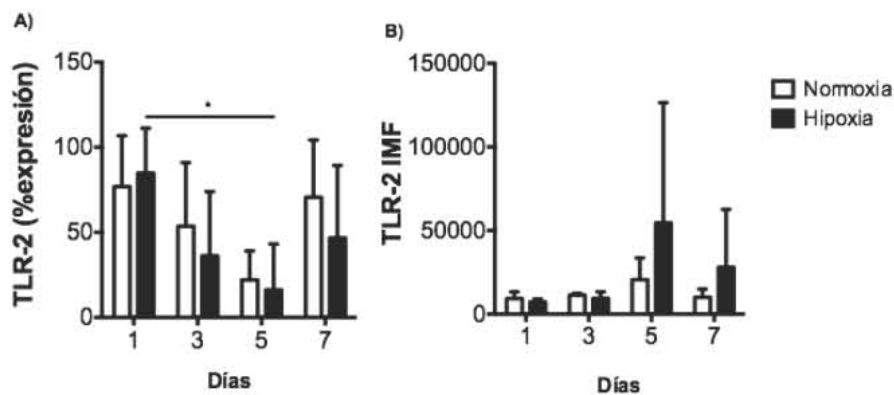


Figura 16. Cinética de expresión de TLR-2 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos CD86 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). B) IMF de monocitos-macrófagos TLR-2 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). ($n = 5$) * $p < 0.05$

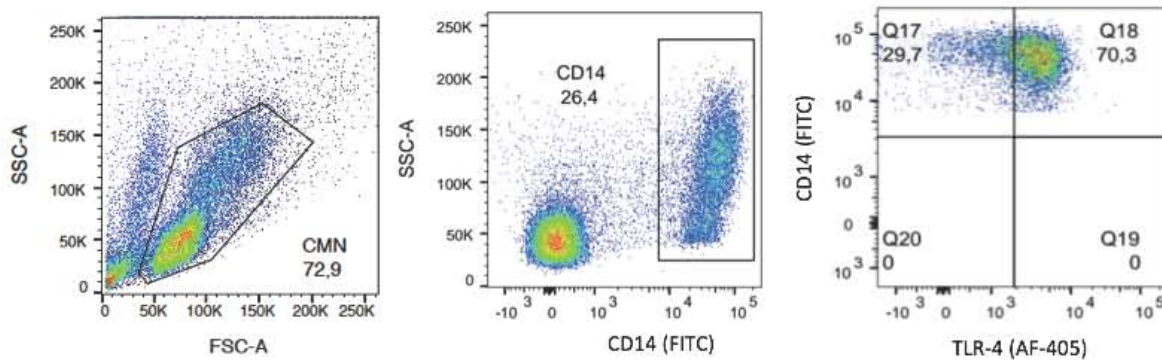


Figura 17. Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos TLR-4. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para TLR-4.

Al analizar la cinética de expresión de TLR-4 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas, se observó que la expresión de TLR-4 aumentó con respecto al tiempo siendo los valores equiparables en ambas condiciones (Figura 17y 18A). Al evaluar el nivel de expresión de TLR-4 (IMF) durante el proceso de diferenciación, se puede observar que en condiciones normóxicas, los niveles de IMF incrementaron, siendo el día 5 el de valor más alto. De manera interesante, los valores de IMF en los monocitos expuestos a condiciones de se encuentran disminuidos con respecto a los valores encontrados en condiciones de normoxia. Estos resultados sugieren que la hipoxia regula negativamente la expresión de TLR-4 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos (Figura 18B)

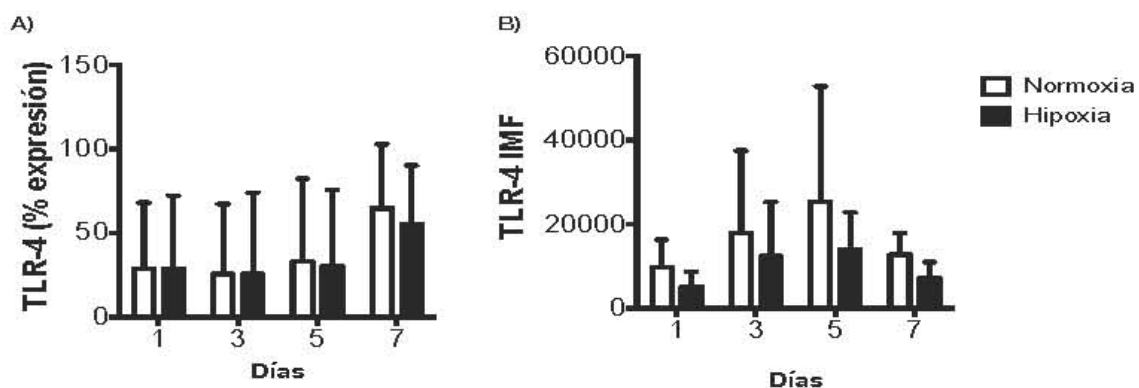


Figura 18. Cinética de expresión de TLR-4 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos CD86 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). B) IMF de monocitos-macrófagos TLR-4 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). (n= 5)

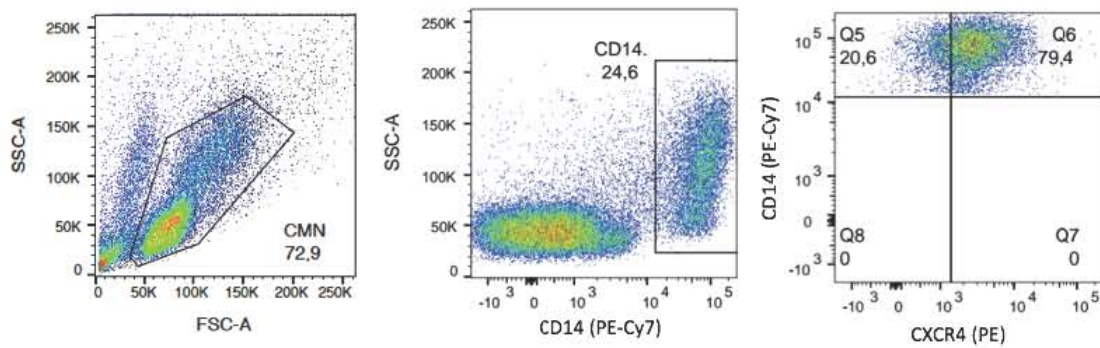
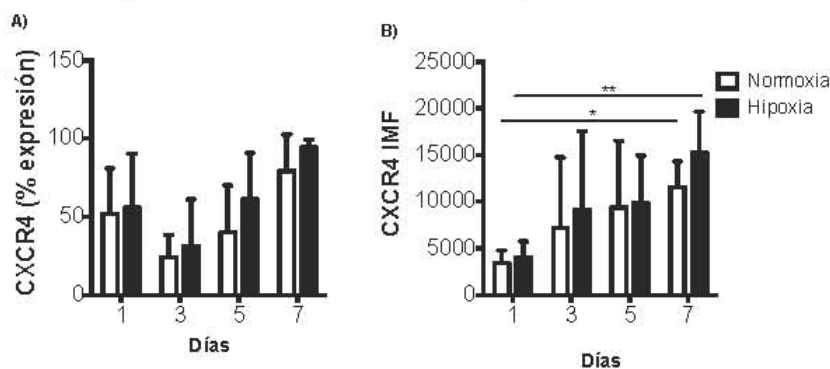


Figura 19 Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos CXCR4. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para CXCR4.

Reportes anteriores indican que la hipoxia induce la expresión de CXCR4 en monocitos y en macrófagos (Schioppa et al., 2003). Sin embargo, se desconoce la expresión de este receptor de quimiocinas durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones hipóxicas. Al evaluar la expresión de CXCR4 durante el proceso de diferenciación se puede observar que incrementó con respecto a los días de diferenciación tanto en condiciones normóxicas como hipóxicas (Figura 19 y 20A). La IMF de CXCR4 (Figura 20B) mostró el mismo comportamiento, siendo el valor mas alto de fluorescencia el día 7 comparando con el día 1 en condiciones hipóxicas ($p < 0.05$).

Figura 20. Cinética de expresión de CXCR4 durante el proceso de diferenciación de monocitos a



macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos CXCR4 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). B) IMF de monocitos-macrófagos CXCR4 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). ($n = 5$) ($p < 0.05$).

VI.III) Cinética de expresión de HIF-1 α , GLUT-1 y TIM-3 en condiciones normóxicas e hipóxicas.

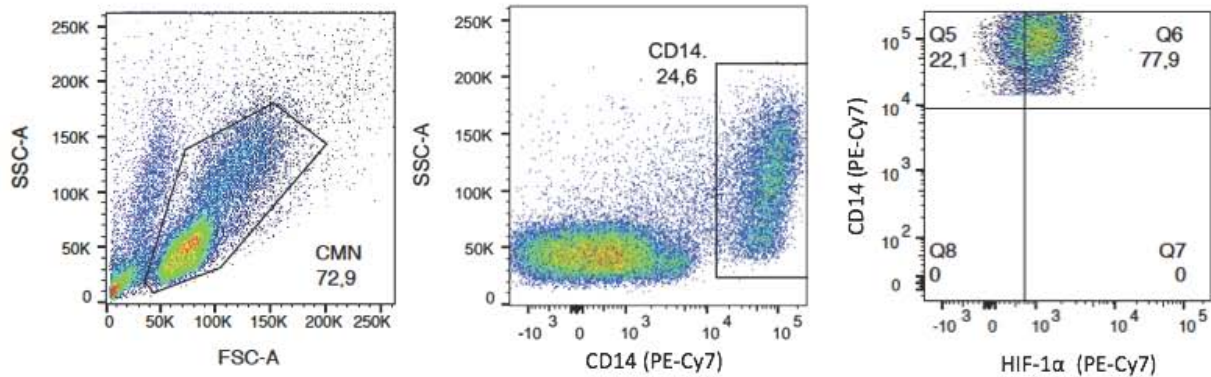


Figura 21 Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos HIF-1 α . A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para HIF-1 α .

Se evaluó la expresión de HIF-1 α , durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones de hipoxia o normoxia. A nivel de RNAm, la expresión de HIF-1 α en condiciones de hipoxia tiende a incrementar en el día 5 cuando se tomó como referencia la expresión basal en el día 1, sin embargo debido a la alta dispersión de los datos no se observa significancia estadística. Por otra parte la expresión de HIF-1 α en condiciones de normoxia tiende a disminuir en relación al tiempo de diferenciación (Figura 21 y 22A).

Se evaluó por citometría de flujo, la expresión de HIF-1 α intracelular y observó que la frecuencia de células positivas fue similar en ambas condiciones experimentales (Figura 22B). Cuando se evaluó la IMF observamos que conforme pasan los días de diferenciación en condiciones hipóxicas, el valor de IMF aumentó a partir del día 3 y se mantuvo constante. Este resultado en el perfil de expresión no alcanza diferencia estadística ($p= 0.05$). En condiciones de normoxia la expresión de HIF-1 α (IMF) alcanzó su nivel máximo en el día 5 sin embargo no se alcanza diferencia estadística ($p= 0.05$) (Figura 22C).

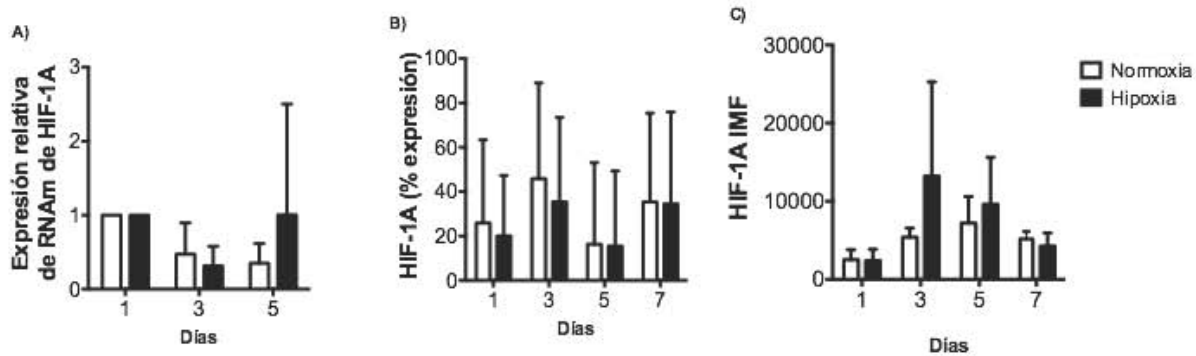


Figura 22. Cinética de expresión de HIF-1 α durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de expresión relativa de RNAm de HIF-1 α ($n=3$) B) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos HIF-1 α durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). C) IMF de monocitos-macrófagos HIF-1 α durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). ($n=5$)

Estos resultados sugieren que en nuestro modelo experimental el nivel de mensajero de HIF-1 α comenzó a expresarse a etapas tardías de diferenciación, día 5 y en condiciones normóxicas la expresión fue disminuida. Debido a que HIF-1 α es una molécula constitutiva, la frecuencia de células positivas para este factor transcripcional fue similar en ambas condiciones experimentales. Sin embargo, como la proteína HIF-1 α es rápidamente degradada en condiciones de normoxia el valor de IMF se encontró disminuido al compararse con el valor obtenido en condiciones hipóxicas en la cual la proteína se acumula y no es degradada. El incremento en la expresión de HIF-1 α en condiciones hipóxicas en el día 3 se pudo asociar a un mayor requerimiento energético del macrófago durante el proceso de diferenciación, y su disminución en el día 5 pudo asociarse a la participación de otras isoformas de HIF como HIF-2 α o HIF-3 α .

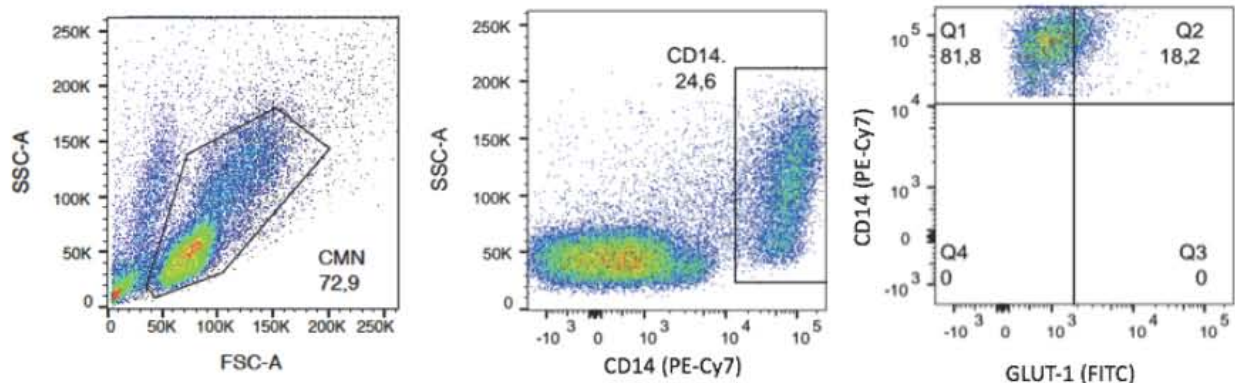


Figura 23 Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos GLUT-1. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para GLUT-1.

Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago observamos que la expresión de GLUT-1 a nivel de mensajero incremento en macrófagos diferenciados en condiciones hipóxicas comparado con los niveles de los macrófagos diferenciados en condiciones normóxicas (Figura 23 y 24A). Con respecto a la frecuencia de células positivas para GLUT-1 (Figura 17B) se observó que los macrófagos completamente diferenciados expresaron GLUT-1, tanto en condiciones normóxicas como hipóxicas. La IMF de GLUT-1 aumentó con respecto al tiempo de diferenciación siendo el día 5 el de mayor intensidad cuando los macrófagos fueron expuestos a hipoxia constante. Los macrófagos diferenciados en condiciones normóxicas aumentaron los valores de IMF con respecto al tiempo, siendo el día 7 el de mayor expresión (Figura 24C).

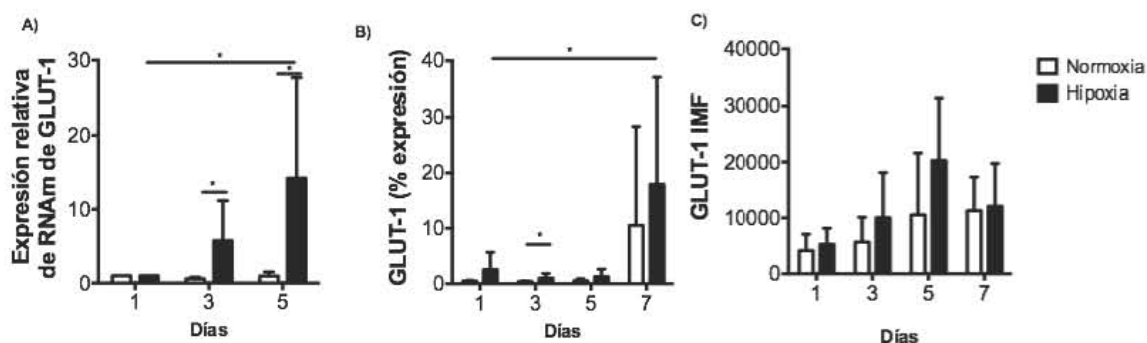


Figura 24. Cinética de expresión de GLUT-1 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de expresión relativa de RNAm de GLUT-1 ($n=3$) ($p<0.05$) B) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos GLUT-1 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). C) IMF de monocitos-macrófagos GLUT-1 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). ($n=5$) ($p<0.05$).

Esto sugiere que durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago no hay una demanda de glucosa , sin embargo, cuando el macrófago está completamente diferenciado sus requerimientos energéticos aumenta independientemente de si el macrófago se diferenció en condiciones normóxicas o hipóxicas.

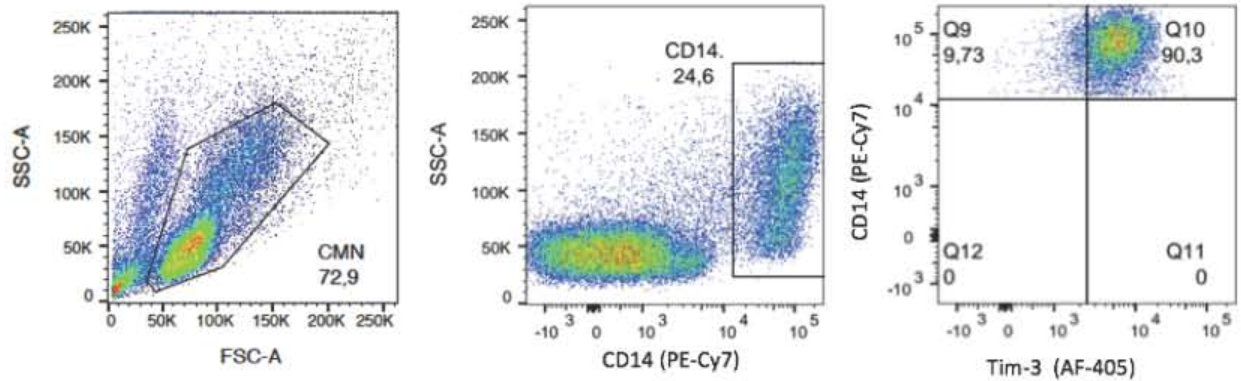


Figura 25 Estrategia de análisis para detección de monocitos/macrófagos Tim-3. A partir de una gráfica de tamaño contra granularidad se seleccionaron las células mononucleares (CMN), de esta región se seleccionaron las células positivas para CD14. A partir de esta selección distinguieron las positivas para Tim-3.

El análisis de la expresión a nivel de RNA mensajero de Tim-3 (Figura 25 y 26A) durante el proceso de diferenciación en condiciones normóxicas e hipóxicas mostró que la expresión de Tim-3 aumentó con respecto a los días de diferenciación ($p < 0.05$) en condiciones de hipoxia. La frecuencia de células Tim-3 positivas analizadas por citometría de flujo (Figura 26B) en condiciones normóxicas e hipóxicas mostró una cinética de expresión similar, siendo el día 7 el de mayor expresión. La IMF de Tim-3 en condiciones tiende a aumentar durante el proceso de diferenciación; sin embargo no se observaron cambios estadísticamente significativos (Figura 26C).

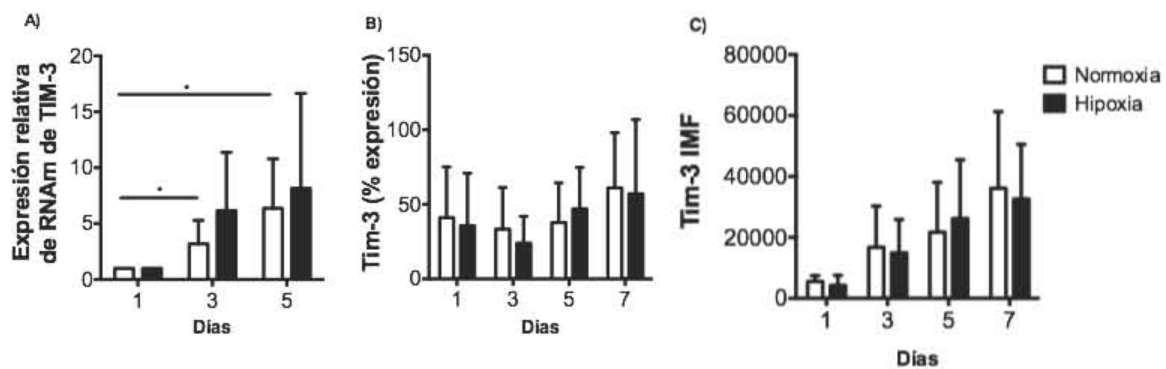


Figura 18. Cinética de expresión de Tim-3 durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones normóxicas e hipóxicas. A) Gráfica de expresión relativa de RNAm de TIM-3 ($n = 3$) * ($p < 0.05$). B) Gráfica de frecuencia de monocitos-macrófagos Tim-3 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). C) IMF de monocitos-macrófagos Tim-3 durante el proceso de diferenciación (días 1, 3, 5 y 7). ($n = 5$)

VI.IV Secreción de IFN γ durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones normóxicas e hipóxicas.

Se evaluó la secreción de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago, interesantemente observamos que en el día 7 de diferenciación en los sobrenadantes de medio de cultivo de macrófagos diferenciados en condiciones de hipoxia, la concentración de IFN γ disminuye con respecto a la concentración encontrada en sobrenadante de cultivos de macrófagos diferenciados en normoxia (Figura 19). También se observó que durante el proceso de diferenciación en condiciones de hipoxia la concentración de IFN γ en sobrenadantes de cultivo disminuyó conforme los días de diferenciación.

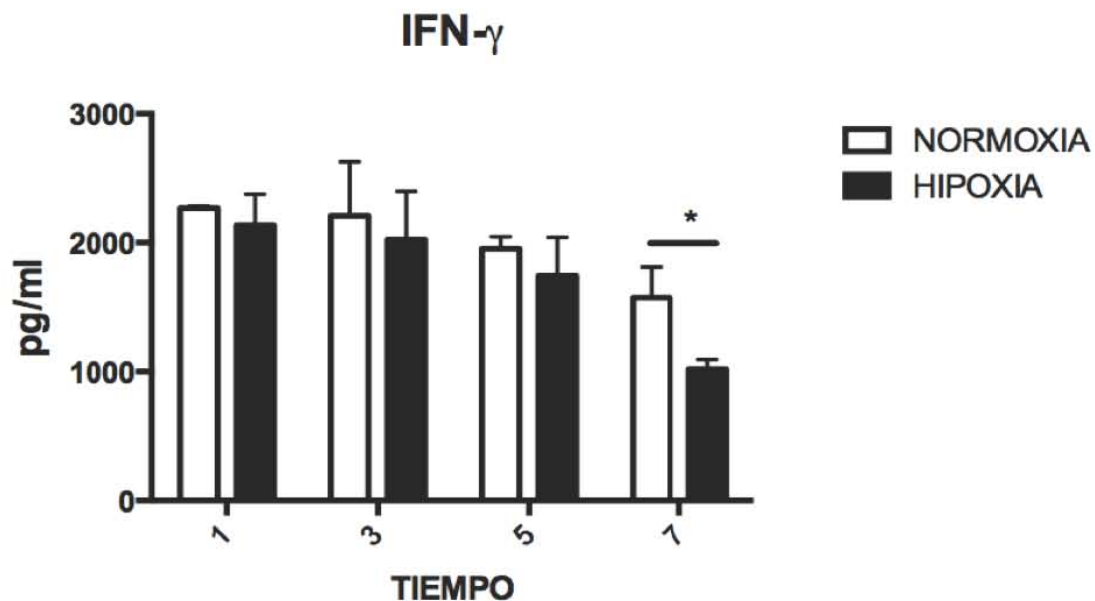


Figura 19. Secreción de IFN γ durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones normóxicas e hipóxicas. El sobrenadante de cultivo se colectó y se detectó IFN γ por ensayo de ELISA. ($n= 5$) *($p<0.05$).

VII. Discusión

Este estudio nos permitió analizar el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en dos condiciones experimentales, normoxia e hipoxia constante. Es importante mencionar que la condición de hipoxia es frecuentemente observada en diversas patologías de etiología pulmonar. La hipoxia en la mayor parte de los pacientes tiene un comportamiento intermitente y se asocia con un estado de inflamación sistémica crónica. La hipoxia crónica aunque menos frecuente la podemos observar en patologías como la obesidad mórbida y el cáncer pulmonar avanzado.

Los monocitos son células mieloides que tienen funciones fundamentales para el adecuado desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa. A nivel del aparato respiratorio se diferencian en macrófagos alveolares, los cuales, junto con las DCs y las células epiteliales se encargan de eliminar la mayor parte de los patógenos y estímulos del medioambiente que son potencialmente dañinos.

La presentación antigénica mediada por moléculas HLA es esencial para la activación de los linfocitos T CD4+. Las células presentadoras de antígeno como los macrófagos y DCs, procesan y presentan antígenos por medio de la molécula HLA-DR (Roche et al., 2015). Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones hipóxicas la expresión de HLA-DR no se vio modificada. Nuestros resultados son semejantes a lo que otros autores han identificado previamente en relación a que la expresión de HLA-DR no se modifica en condiciones de hipoxia (Lahat et al., La excepción la observamos en un artículo que demuestra que en células endoteliales la hipoxia si aumenta la expresión membranar de HLA-DR (Lahat et al., 2003). Una de las moléculas que sabemos que participa en la expresión de HLA-DR es HIF-1 α la cual al estar disminuida o ausente modifica la expresión de HLA-DR (Bhandari et al., 2013). En nuestro modelo observamos que el nivel de expresión de HIF-1 α incrementó en condiciones de hipoxia (días 3 y 5); sin embargo, este cambio no se reflejo en modificaciones en la expresión de HLA-DR.

CD80 y CD86 son moléculas co-estimuladoras que se expresan en células presentadoras de antígeno y se unen al receptor CD28 expresado en las células T para proporcionar la señalización necesaria durante la sinapsis inmunológica. Se ha demostrado que posterior a la diferenciación de monocito a célula dendrítica en condiciones de hipoxia vs. normoxia el estímulo con LPS solamente induce aumento en la expresión de CD80 y CD86 en las células diferenciadas en normoxia. (Mancino et al., 2008). Otros grupos han descrito que al estabilizar farmacológicamente la molécula HIF-1 α los macrófagos incrementan la expresión de CD80 y CD86 (Bhandari et al., 2013), de manera opuesta la exposición de monocitos en cultivo a 2 horas de hipoxia continua disminuye la expresión de CD80 (Lahat et al., 2003). Por lo que en células de linaje mieloide existen resultados contradictorios de la participación de la hipoxia en la regulación de la expresión de CD80 y CD86.

Nuestros resultados indican que la frecuencia de células CD80 positivas tiende a disminuir en el día 5 de diferenciación en condiciones de hipoxia, sin embargo debido a la alta dispersión de nuestros datos no se observa diferencia estadística. De manera interesante, observamos que las células que permanecieron CD80 positivas incrementaron el nivel de expresión de dicha molécula (día 5). En el caso de CD86 la frecuencia de células positivas para este marcador se mantuvo constante en ambas condiciones, aunque la IMF incrementó conforme se diferenciaron las células en condiciones de hipoxia. Estos resultados concuerdan con datos previamente publicados (Shalova et al., 2015) que sugieren que la exposición a tiempos largos y constantes de hipoxia modifica la expresión de CD80 y CD86 tanto en frecuencia como en valores de IMF.

La frecuencia de células TLR-2 positivas disminuyó en los días 3 y 5 para posteriormente incrementar al día 7. Este fenómeno fue similar en condiciones de hipoxia vs. normoxia. Podemos identificar que en el día 5 de diferenciación en condiciones de hipoxia la frecuencia disminuye con respecto al día 1, de manera interesante al evaluar la IMF pudimos observar que para el día 5 la IMF incrementó solo en las células cultivadas en condiciones de hipoxia. Este resultado ha sido previamente observado por otros autores

(Kuhlicke et al., 2007). Al evaluar la frecuencia e IMF de TLR-4 no observamos cambios en ninguna de las condiciones. Una probable explicación a este fenómeno es que contamos con un tamaño de muestra reducido. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que los cambios en la expresión de TLR-4 en células expuestas a hipoxia solo se observa en macrófagos maduros y no durante el proceso de diferenciación (Young Kim et al., 2010)..

Una de las moléculas que participa en el reclutamiento de monocitos al sitio de inflamación es CXCR4. Nosotros observamos que bajo condiciones hipóxicas el nivel de expresión de este receptor incremento en el día 7 de diferenciación, sugiriendo que los macrófagos maduros son mas propensos a ser reclutados en respuesta a su ligando CXCL12. Previamente se describió que los monocitos y macrófagos expuestos a tiempos cortos de hipoxia incrementa la expresión de CXCR4 a nivel de mensajero (Fang et al., 2009; Schioppa et al., 2003; Spinello et al., 2015).

Bajo condiciones de hipoxia el metabolismo cambia hacia glicolisis anaerobia, en la cual una molécula de glucosa se convierte pirúvico y finalmente a ácido láctico generando dos moléculas de ATP. Dado los requerimientos energéticos se requiere mayor ingreso de glucosa en la célula, y por ende en condiciones de hipoxia HIF-1 α induce la expresión de transportadores de glucosa con alta afinidad como lo es GLUT-1 (Castrejón et al., 2007; Chen et al., 2001; Mobasheri et al., 2005). En nuestras condiciones experimentales observamos que en ambientes hipéricos el RNA mensajero aumenta después del día 1, así como en frecuencia de células positivas para este transportador. Lo que implica que los monocitos cambiaron su metabolismo de fosforilación oxidativa a un mayor catabolismo de glucosa, el cual es dependiente de la señalización de AKT-mTOR-HIF-1 α (Biswas, 2015). Las necesidades energéticas de un macrófago maduro son distintas a las de un monocitos, nosotros observamos que en condiciones normóxicas los macrófagos comienzan a expresar más GLUT-1 sólo en el día 7 de diferenciación.

El requerimiento energético puede ser compensado por la expresión de otros transportadores de glucosa, fructuosa o galactosa. La lactosa producto final de la glicolisis puede ser utilizado como fuente de carbono, por lo que es posible que los macrófagos durante su proceso de diferenciación expresen en mayor cantidad el transportador de lactato MCT1 (Hahn et al., 2000; Merezhinskaya et al., 2004; Samuvel et al., 2009) pudiendo ser el lactato utilizado como fuente de carbono para el metabolismo celular.

El factor transcripcional de respuesta a hipoxia HIF-1 α regula la expresión génica cuando la células se encuentra en ambientes hipóxicos. La estabilización en condiciones hipóxicas permite la interacción con HIF-1 β y este dímero puede ahora translocarse al núcleo y unirse con complejos reguladores de la cromatina como es p300/CBP induciendo la expresión de genes de respuesta a la hipoxia. Bajo nuestras condiciones experimentales, la expresión a nivel de mensajero de HIF-1 α aumenta a partir del día 5 de diferenciación y a nivel de IMF aumenta a partir del día 3 lo que indicaría que la hipoxia esta estabilizando a HIF-1 α y no se esta degradando por vía del proteosoma, sin embargo debido a la dispersión de nuestros datos no encontramos diferencia estadística mas sí una tendendencia a aumentar. Ésta estabilización se ve reflejada en el aumento en la expresión de GLUT-1 a nivel de mensajero y de proteína. Es posible que que otras isoformas de HIF como HIF-2 α y HIF-3 α estén participando en la diferenciación de monocitos a macrófagos en condiciones de normoxia o hipoxia (Palazon et al., 2014).

Dada la participación de HIF-1 α en regular y promover la inflamación y la secreción de citocinas pro inflamatorias es posible que éstos macrófagos sean más propensos a polarizarse a un fenotipo M1 (Cramer et al., 2003; Kuhlicke et al., 2007; Takeda et al., 2010; Walmsley et al., 2014), teniendo mayor capacidad pro-inflamatoria a nivel de secreción de citocinas, presentación antigénica y activación de linfocitos T.

Tim-3 es uno de los receptores que participa en la inhibición de la activación de linfocitos T, aunque recientemente se describió como activador de la respuesta contra *M. tuberculosis* en macrófagos infectados con el bacilo (Sada-Ovalle et al., 2012). En nuestro modelo experimental, la expresión de Tim-3 en los monocitos diferenciados a macrófagos en condiciones hipóxicas se mantiene constante y aumenta con respecto al tiempo de diferenciación, sin alcanzar diferencia estadística. Se sabe que durante la isquemia cerebral, la expresión de Tim-3 aumenta en células de la microglia y es mediada por la unión de HIF-1 α al promotor de Tim-3. (Koh et al., 2015). Estudios indican que en células mononucleares totales y monocitos inmortalizados la señalización de Tim-3 y su ligando Gal-9 activan, en condiciones normóxicas, a HIF-1 α mediando su translocación al núcleo e induciendo la transcripción de TNF- α y VEGF. (Prokhorov et al., 2015; Silva et al., 2015). En nuestras condiciones experimentales la expresión de Tim-3 a nivel de mensajero aumenta en condiciones de hipoxia existiendo la posibilidad de que ésta inducción este mediada por la unión HIF-1 α al promotor de Tim-3. Sin embargo, éste aumento no se vio reflejado en la producción a nivel de proteína (IMF) de Tim-3, esto puede implicar que la traducción de la proteína se vea afectada. Estudios indican que la hipoxia afecte la traducción o el correcto plegamiento de las proteínas (Koumenis et al., 2002; Schönenberger et al., 2015). Nuestros datos indican que en condiciones de hipoxia la expresión de Tim-3 tiende a aumentar durante el proceso de diferenciación, sin embargo se desconoce la funcionalidad de Tim-3 en macrófagos diferenciados en condiciones de hipoxia.

Con respecto a los resultados de las concentraciones de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo se pudo observar que hay disminución en el grupo de hipoxia con respecto a los días de diferenciación. Reportes anteriores indican que monocitos de sangre periférica de donadores expuestos a 2 horas hipoxia estable, no disminuye la capacidad de secreción de IFN γ (Fritzenwanger et al., 2011). Sin embargo otros reportes en modelos murinos y en macrófagos inmortalizados de ratón indican que la exposición a tiempos cortos de hipoxia (6 horas), induce la expresión de IFN γ a nivel de mensajero y de proteína. (Acosta-Iborra et al., 2009). En nuestro modelo de diferenciación los monocitos son expuestos a hipoxia constante y diferenciados durante 7 días, los resultados indican

que en último día de diferenciación los macrófagos diferenciados en condiciones de hipoxia secretan menos IFN γ . Es posible que si en otro modelo experimental los macrófagos son diferenciados en condiciones de normoxia, y luego expuestos a hipoxia el macrófago secreta IFN γ en mayor cantidad. Por lo que la exposición de una célula a hipoxia crónica estuviera induciendo un estado de inmunosupresión.

Bajo condiciones hipóxicas, la concentración de adenosina extracelular incrementa, la adenosina es capaz de unirse a los receptores de adenosina A₂AR y A₂BR presentes en monocitos y en macrófagos e inhibir la producción de citocinas y quimiocinas pro inflamatorias. Se ha reportado que la señal de los receptores de adenosina inhibe la producción de IFN γ en macrófagos e induce expresión de IL-10 (Nemeth et al., 2005; Riboldi et al., 2013; St Hilaire et al., 2009). Pese a que no tenemos datos sobre la concentración de adenosina en nuestros medios de cultivo, es posible especular que la adenosina este incrementada y este favoreciendo la disminución de la expresión de IFN γ . Cabe mencionar que en nuestras condiciones de diferenciación de monocitos a macrófagos no se partió de una población pura, es decir no se purificaron monocitos, por lo que puede que en nuestros cultivos existieran otras poblaciones de células productoras de IFN γ .

En las descripciones clásicas de mecanismos de defensa a patógenos, la respuesta innata es rápida, no específica, y carece de memoria. Sin embargo, evidencia reciente propone que existe un tipo de memoria en las células del sistema inmune innato denominada “Trained immunity” o inmunidad entrenada (Cheng et al., 2014; Saeed et al., 2014; Yoshida et al., 2015; Yoshida & Ishii, 2016). Cuando los monocitos son expuestos a LPS o a β -glucanos, componentes de la membrana externa de bacterias Gram negativas y de la pared celular de *Candida albicans*, respectivamente, por 24 horas y luego se induce diferenciación a macrófagos; aquellos macrófagos que estuvieron expuestos a LPS o a β -glucanos tienen mejor respuesta a largo plazo comparado con aquellos macrófagos que no fueron expuestos a estos previo a la diferenciación. Se ha propuesto que la inmunidad entrenada es medida por la reprogramación epigenética a nivel de metilación de la histona 3 y cambio en los patrones

de metilación en los genes de inmunidad innata. Recientemente se describió que al exponer a monocitos a β -glucanos el metabolismo de glucólisis aerobia aumenta y es dependiente de la activación de HIF-1 α mediada por mTOR. En este modelo la activación de HIF-1 α es necesaria para el proceso de inmunidad entrenada en macrófagos (Cheng et al., 2014). Por lo que es probable que durante la diferenciación de monocitos a macrófagos, en condiciones hipóxicas, la activación de HIF-1 α señalice río abajo provocando un cambio en los patrones de metilación de histonas en los genes asociados a inmunidad; siendo éstos macrófagos más eficientes en producir citocinas pro inflamatorias.

Por lo que es posible que la hipoxia no solo modifique los patrones de expresión de moléculas de superficie en los macrófagos, sino que también induzca un estado en el cual los macrófagos tengan una tendencia hacia polarizarse a un fenotipo inflamatorio.

VIII. Conclusiones

La exposición a hipoxia constante durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago modifica el patrón de expresión de moléculas de superficie en macrófagos e induce un fenotipo antiinflamatorio.

IX. Perspectivas

- Evaluar diferenciación de monocitos a macrófagos partiendo de células CD14+.
- Evaluar el potencial de polarización de macrófagos diferenciados en condiciones hipóxicas.
- Evaluar funcionalidad de macrófagos diferenciados en condiciones de hipoxia: mediante ensayos de fagocitosis, exposición a PAMPs y DAMPs.
- Evaluar la participación de HIF-1 α durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago en condiciones de hipoxia y normoxia, utilizando líneas celulares deficientes de HIF-1 α .
- Evaluar la unión de HIF-1 α a distintos factores de transcripción así como a distintas promotores durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago.

X. Bibliografía

- Achek, A., Yesudhas, D., and Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives of Pharmacal Research*, 39(8), 1032–1049. <http://doi.org/10.1007/s12272-016-0806-9>
- Acosta-Iborra, B., Elorza, A., Olazabal, I. M., Martin-Cofreces, N. B., Martin-Puig, S., Miro, and Landazuri, M. O. (2009). Macrophage oxygen sensing modulates antigen presentation and phagocytic functions involving IFN-gamma production through the HIF-1 alpha transcription factor. *J Immunol*, 182(5), 3155–3164. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0801710>
- Araoz Illanes, R., Virhuez Salguero, Y. K., and Guzmán Duchén, H. (2011). Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño como factor de riesgo para otras enfermedades. *Revista Científica Ciencia Médica*, 14(1), 25–30.
- Bain, C. C., Bravo-Blas, A., Scott, C. L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S. and Mowat, A. M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature Immunology*, 15(10), 929–937. <http://doi.org/10.1038/ni.2967>
- Bhandari, T., Olson, J., Johnson, R. S., and Nizet, V. (2013). HIF-1 α influences myeloid cell antigen presentation and response to subcutaneous OVA vaccination. *Journal of Molecular Medicine*, 91(10), 1199–1205. <http://doi.org/10.1007/s00109-013-1052-y>
- Biswas, S. K. (2015). Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity*, 43(3), 435–449. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.09.001>
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2014). *Macrophages: Biology and role in the pathology of diseases. Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases* (Vol. 9781493913). <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1311-4>
- Boehm, T. (2012). Review Evolution of Vertebrate Immunity. *Current Biology*, 22, R722–R732. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.003>
- Bosco, M. C., Puppo, M., Blengio, F., Fraone, T., Cappello, P., Giovarelli, M., and Varesio, L. (2008). Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology*, 213(9), 733–749.

<http://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.07.031>

- Bronte, V., and Pittet, M. J. (2013). The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*, 39, 806–818. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010>
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., and Kagan, J. C. (2015). Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 257–290. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Bruttger, J., Karram, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., and Waisman, A. (2015). Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*, 43(1), 92–106. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.012>
- Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. El, Matejuk, A., Grillon, C., and Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), 1239–1253. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>
- Castrejón, V., Carbó, R., and Martínez, M. (2007). MECANISMOS MOLECULARES QUE INTERVIENEN EN EL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA*. *REB*, 26(2), 49–57.
- Chatterjee, M., von Ungern-Sternberg, S. N. I., Seizer, P., Schlegel, F., Büttcher, M., Sindhu, N. A., and Gawaz, M. (2015). Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4–CXCR7. *Cell Death and Disease*, 6(11), e1989. <http://doi.org/10.1038/cddis.2015.233>
- Chávez-Galán, L., Ocaña-Guzmán, R., Torre-Bouscoulet, L., García-de-Alba, C., Sada-Ovalle, I., and Sada-Ovalle, I. (2015). Exposure of Monocytes to Lipoarabinomannan Promotes Their Differentiation into Functionally and Phenotypically Immature Macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–16. <http://doi.org/10.1155/2015/984973>
- Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., and Maity, A. (2001). Regulation of glut1 mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1: INTERACTION BETWEEN H-ras AND HYPOXIA. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9519–9525. <http://doi.org/10.1074/jbc.M010144200>

- Cheng, S.-C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., and Netea, M. G. (2014). mTOR- and HIF-1 -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, *345*(6204), 1250684–1250684.
<http://doi.org/10.1126/science.1250684>
- Cordeiro-Spinetti, E., Taichman, R. S., and Balduino, A. (2015). The bone marrow endosteal niche: how far from the surface? *Journal of Cellular Biochemistry*, *116*(1), 6–11. <http://doi.org/10.1002/jcb.24952>
- Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Ryan, R., Pucci, F., Sio, S. W., and Pittet, M. J. (2013). Angiotensin II Drives the Production of Tumor-Promoting Macrophages. *Immunity*, *38*(2), 296–308.
<http://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.015>
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., and Johnson, R. S. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, *112*(5), 645–57. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628185>
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., and Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, *14*(10), 986–995. <http://doi.org/10.1038/ni.2705>
- Denekamp, J., and Daşu, a. (1999). Inducible repair and the two forms of tumour hypoxia--time for a paradigm shift. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, *38*(7), 903–918. <http://doi.org/10.1080/028418699432590>
- Dutta, P., Courties, G., Wei, Y., Leuschner, F., Gorbатов, R., Robbins, C. S., and Nahrendorf, M. (2012). Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*, *487*(7407), 325–329. <http://doi.org/10.1038/nature11260>
- Epelman, S., Lavine, K. J., and Randolph, G. J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, *41*(1), 21–35. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Fang, H.-Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S. B., Biswas, S. K., Harris, A. L. and Lewis, C. E. (2009). Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood*, *114*(4).
<http://doi.org/10.1182/blood-2008>
- Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., and Ulmer, A. J. (2008). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand

- spectrum but does not lead to differential signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(3), 692–701. <http://doi.org/10.1189/jlb.0807586>
- Ferkowicz, M. J. (2005). Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Experimental Hematology*, 33(9), 1041–1047. <http://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.06.006>
- Freedman, M. H., and Saunders, E. F. (1981). Hematopoiesis in the human spleen. *American Journal of Hematology*, 11(3), 271–275. <http://doi.org/10.1002/ajh.2830110307>
- Fritzenwanger, M., Jung, C., Goebel, B., Lauten, A., Figulla, H. R., Fritzenwanger, M., and Figulla, H. R. (2011). Impact of short-term systemic hypoxia on phagocytosis, cytokine production, and transcription factor activation in peripheral blood cells. *Mediators of Inflammation*, 2011, 429501. <http://doi.org/10.1155/2011/429501>
- Furth, R. Van, and Colin, Z. A. (1968). The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 128(3), 415–432.
- Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*, 14(6), 392–404. <http://doi.org/10.1038/nri3671>
- Golub, R., and Cumano, A. (2013). Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 51(4), 226–231. <http://doi.org/10.1016/j.bcmed.2013.08.004>
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., and Rodewald, H.-R. (2014). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540), 547–551. <http://doi.org/10.1038/nature13989>
- Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, 38(12), 3257–3264. <http://doi.org/10.1002/eji.200838855>
- Hahn, E. L., Halestrap, A. P., and Gamelli, R. L. (2000). Expression of the lactate transporter MCT1 in macrophages. *Shock (Augusta, Ga.)*, 13(4), 253–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10774612>

- Hammond, E. M., Asselin, M. C., Forster, D., O'Connor, J. P. B., Senra, J. M., and Williams, K. J. (2014). The Meaning, Measurement and Modification of Hypoxia in the Laboratory and the Clinic. *Clinical Oncology*, 26(5), 277–288.
<http://doi.org/10.1016/j.clon.2014.02.002>
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., and Parwaresch, M. R. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity*, 38(4), 792–804. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>
- Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, 14(8), 821–830. <http://doi.org/10.1038/ni.2638>
- Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6(SEP). <http://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>
- Huang, Y.-H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A. C., Gandhi, A., Russell, A., and Blumberg, R. S. (2014). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*, 517(7534), 386–390. <http://doi.org/10.1038/nature13848>
- Inra, C. N., Zhou, B. O., Acar, M., Murphy, M. M., Richardson, J., Zhao, Z., and Morrison, S. J. (2015). A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature*, 527(7579), 466–471. <http://doi.org/10.1038/nature15530>
- Ismahil, M. A., Hamid, T., Bansal, S. S., Patel, B., Kingery, J. R., and Prabhu, S. D. (2014). Remodeling of the Mononuclear Phagocyte Network Underlies Chronic Inflammation and Disease Progression in Heart Failure Novelty and Significance. *Circulation Research*, 114(2).
- Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–22. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>
- Jakubzick, C., Gautier, E., Gibbings, S., Sojka, D., Schlitzer, A., Johnson, T., and Randolph, G. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, 39(3), 599–610. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.007>
- Jendro, M., Goronzy, J. J., and Weyand, C. M. (1991). Structural and functional

- characterization of HLA-DR molecules circulating in the serum. *Autoimmunity*, 8(4), 289–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1932513>
- Jin, L.-P., Fan, D.-X., and Li, D.-J. (2011). Regulation of Costimulatory Signal in Maternal-Fetal Immune Tolerance. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66(2), 76–83. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00982.x>
- Jung, H., Mithal, D., Park, J. E., and Miller, R. J. (2015). Localized CCR2 activation in the bone marrow niche mobilizes monocytes by desensitizing CXCR4. *PLoS ONE*, 10(6), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0128387>
- Kaushansky, K., Lichtman, M., Beutler, E., Kipps, T., Prchal, J., and Seligsohn, U. (2010). *Williams Hematology. McGraw-Hill Professional*.
- Koh, H. S., Chang, C. Y., Jeon, S.-B., Yoon, H. J., Ahn, Y.-H., Kim, H.-S., and Park, E. J. (2015). The HIF-1/gliatal TIM-3 axis controls inflammation-associated brain damage under hypoxia. *Nature Communications*, 6. <http://doi.org/10.1038/ncomms7340>
- Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., and Wouters, B. G. (2002). Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Molecular and Cellular Biology*, 22(21), 7405–16. <http://doi.org/10.1128/MCB.22.21.7405>
- Krohn, K. A., Link, J. M., and Mason, R. P. (2008). Molecular imaging of hypoxia. *The Journal of Nuclear Medicine*, 49, 129–148. <http://doi.org/10.2967/jnumed.107.045914>
- Kuhlicke, J., Frick, J. S., Morote-Garcia, J. C., Rosenberger, P., and Eltzschig, H. K. (2007). Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Coordinates Induction of Toll-Like Receptors TLR2 and TLR6 during Hypoxia. *PLoS ONE*, 2(12), e1364. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0001364>
- Lahat, N., Bitterman, H., Weiss-Cerem, L., and Rahat, M. A. (2011). Hypoxia increases membranal and secreted HLA-DR in endothelial cells, rendering them T-cell activators. *Transplant International*, 24(10), 1018–1026. <http://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01304.x>
- Lahat, N., Rahat, M. A., Ballan, M., Weiss-cerem, L., and Engelmayer, M. (2003).

- Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF- α secretion Abstract : Monocytes / macrophages in ischemic, 74(August), 197–205. <http://doi.org/10.1189/jlb.0303105>. *Journal*
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., and Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews. Immunology*, 15(12), 731–44. <http://doi.org/10.1038/nri3920>
- Li, J., and Ley, K. (2015). Lymphocyte Migration Into Atherosclerotic Plaque. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), 40–49. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303227>
- Lucólis, Y. L. A. G., Las, E. N., and Umorales, C. É. T. (2009). El factor HIF-1 y la glucólisis en las células tumorales. *Reb*, 28(1), 42–51.
- Mancino, A., Schioppa, T., Larghi, P., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Chen, I.-H., and Sica, A. (2008). Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions, 112, 3723–3734. <http://doi.org/10.1182/blood-2008-02-142091>
- Mckeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *Br J Radiol*, 87. <http://doi.org/10.1259/bjr.20130676>
- Merezhinskaya, N., Ogunwuyi, S. A., Mullick, F. G., and Fishbein, W. N. (2004). Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes, and monocytes. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 52(11), 1483–93. <http://doi.org/10.1369/jhc.4A6306.2004>
- Miwa, Y., Hayashi, T., Suzuki, S., Abe, S., Onishi, I., Kirimura, S., and Kurata, M. (2013). Up-regulated expression of CXCL12 in human spleens with extramedullary haematopoiesis. *Pathology*, 45(4), 408–416. <http://doi.org/10.1097/PAT.0b013e3283613dbf>
- Mobasheri, A., Richardson, S., Mobasheri, R., and Shakibaei, M. (2005). Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: Putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocyte. *Histol Histopathol*, 20, 1327–1338.
- Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., Burke, S., Thaler, H. T., Blasberg, R., and

- Serganova, I. (2009). Real-Time Imaging of HIF-1 α Stabilization and Degradation. *PLoS ONE*, 4(4), e5077. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005077>
- Newton, K., and Dixit, V. M. (2012). Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), a006049–a006049. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Nguyen, K. D., Fentress, S. J., Qiu, Y., Yun, K., Cox, J. S., and Chawla, A. (2013). Circadian Gene Bmal1 Regulates Diurnal Oscillations of Ly6Chi Inflammatory Monocytes. *Science*, 341(6153), 1483–1488.
- Ocaña-Guzman, R., Torre-Bouscoulet, L., and Sada-Ovalle, I. (2016). TIM-3 Regulates Distinct Functions in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 7, 229. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00229>
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S., and Jones, P. (2012). *Kuby Immunology*. *Kuby Immunology* (Vol. XXXIII). <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V., and Johnson, R. S. (2014). HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. *Immunity*, 41, 518–528. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.008>
- Perdiguerro, E. G., and Geissmann, F. (2015). The development and maintenance of resident macrophages. *Nature Immunology*, 17(1), 2–8. <http://doi.org/10.1038/ni.3341>
- Pittet, M. J., Nahrendorf, M., and Swirski, F. K. (2014). The journey from stem cell to macrophage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1319(1), 1–18. <http://doi.org/10.1111/nyas.12393>
- Prokhorov, A., Gibbs, B. F., Bardelli, M., Rüegg, L., Fasler-Kan, E., Varani, L., and Sumbayev, V. V. (2015). The immune receptor Tim-3 mediates activation of PI3 kinase/mTOR and HIF-1 pathways in human myeloid leukaemia cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 59, 11–20. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.11.017>
- Robinson, J., Halliwell, J. A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., and Marsh, S. G. E. (2013). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D1222-7. <http://doi.org/10.1093/nar/gks949>
- Roche, P. A., and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen

- processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 15(4), 203–216.
<http://doi.org/10.1038/nri3818>
- Sada-Ovalle, I., Chavez-Galan, L., Torre-Bouscoulet, L., Nava-Gamino, L., Barrera, L., Jayaraman, P., and Behar, S. M. (2012). The Tim3-Galectin 9 Pathway Induces Antibacterial Activity in Human Macrophages Infected with Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 189(12), 5896–5902.
<http://doi.org/10.4049/jimmunol.1200990>
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., and Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204), 1251086–1251086. <http://doi.org/10.1126/science.1251086>
- Samuvel, D. J., Sundararaj, K. P., Nareika, A., Lopes-Virella, M. F., and Huang, Y. (2009). Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(4), 2476–84.
<http://doi.org/10.4049/jimmunol.0802059>
- Santin, A. D., Hermonat, P. L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Cannon, M. J., Hiserodt, J. C., and Parham, G. P. (1999). Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology*, 200(2), 187–204. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10416127>
- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Sacconi, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., and Sica, A. (2003). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(9), 1391–402.
<http://doi.org/10.1084/jem.20030267>
- Schönenberger, M. J., and Kovacs, W. J. (2015). Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(July), 42. <http://doi.org/10.3389/fcell.2015.00042>
- Serbina, N. V, and Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, Published Online: 05 February 2006; | doi:10.1038/ni1309, 7(3), 311.

<http://doi.org/10.1038/N11309>

- Shalova, I. N., Lim, J. Y., Chittechath, M., Zinkernagel, A. S., Beasley, F., Hernández-Jiménez, E., and Biswas, S. K. (2015). Human Monocytes Undergo Functional Re-programming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Immunity*, 42(3), 484–498. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.001>
- Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*, 43(2), 382–393. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.016>
- Silva, I. G., Gibbs, B. F., Bardelli, M., Varani, L., and Sumbayev, V. V. (2015). Differential expression and biochemical activity of the immune receptor Tim-3 in healthy and malignant human myeloid cells. *Oncotarget*, 6(32). <http://doi.org/10.18632/oncotarget.5257>
- Singounas, E. G., Sakas, D. E., Hadley, D. M., Chalevelakis, G., Sfakianos, G., Raptis, S., and Karvounis, P. C. (1991). Paraplegia in a pregnant thalassemic woman due to extramedullary hematopoiesis: Successful management with transfusions. *Surgical Neurology*, 36(3), 210–215. [http://doi.org/10.1016/0090-3019\(91\)90115-P](http://doi.org/10.1016/0090-3019(91)90115-P)
- Spinello, I., Quaranta, M. T., Paolillo, R., Pelosi, E., Cerio, A. M., Saulle, E., and Labbaye, C. (2015). Differential hypoxic regulation of the microRNA-146a/CXCR4 pathway in normal and leukemic monocytic cells: impact on response to chemotherapy. *Haematologica*, 100(9), 1160–71. <http://doi.org/10.3324/haematol.2014.120295>
- Strehl, C., Fangradt, M., Fearon, U., Gaber, T., Buttgerit, F., and Veale, D. J. (2014). Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? *Journal of Leukocyte Biology*, 95(2), 233–41. <http://doi.org/10.1189/jlb.1212627>
- Takeda, N., O'Dea, E. L., Doedens, A., Kim, J. -w., Weidemann, A., Stockmann, C., and Johnson, R. S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF- isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes & Development*, 24(5), 491–501. <http://doi.org/10.1101/gad.1881410>
- Tunis, M. C., and Marshall, J. S. (2014). Review Article Toll-Like Receptor 2 as a Regulator of Oral Tolerance in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of*

- Inflammation*, 2014, 1–7. Retrieved from
papers3://publication/doi/10.1155/2014/606383
- Villarruel, S. M., Boehm, C. A., Pennington, M., Bryan, J. A., Powell, K. A., and Muschler, G. F. (2008). The effect of oxygen tension on the in vitro assay of human osteoblastic connective tissue progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 26(10), 1390–7. <http://doi.org/10.1002/jor.20666>
- Walmsley, S., Harris, A., Thompson, A. A. R., and Whyte, M. K. B. (2014). HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications. *Hypoxia, Volume 2*, 47. <http://doi.org/10.2147/HP.S50269>
- Wu, D., Potluri, N., Lu, J., Kim, Y., and Rastinejad, F. (2015). Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature*, 524(303–308). <http://doi.org/10.1038/nature14883>
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, 2(1), 1. <http://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
- Yoshida, K., and Ishii, S. (2016). Innate immune memory via ATF7-dependent epigenetic changes. *Cell Cycle*, 15(1), 3–4. <http://doi.org/10.1080/15384101.2015.1112687>
- Yoshida, K., Maekawa, T., Zhu, Y., Renard-Guillet, C., Chatton, B., Inoue, K., and Ishii, S. (2015). The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. *Nature Immunology*, 16(10), 1034–43. <http://doi.org/10.1038/ni.3257>
- Young Kim, S., Jun Choi, Y., Myung Joung, S., Ho Lee, B., Jung, Y.-S., and Young Lee, J. (2010). Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology*, 129(4), 516–24. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03203.x>
- Zamani, F., Zare Shahneh, F., Aghebati-Maleki, L., and Baradaran, B. (2013). Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2),

329–32. <http://doi.org/10.5681/apb.2013.053>

Zhang, Y., Ma, C. J., Wang, J. M., Ji, X. J., Wu, X. Y., Moorman, J. P., and Yao, Z. Q. (2012). Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14⁺ monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(2), 189–196.

<http://doi.org/10.1189/jlb.1010591>