

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

EFFECTO DEL 17- $\beta$  ESTRADIOL SOBRE LA FUNCION Y EXPRESION  
DE LOS RECEPTORES Fc $\gamma$ RI Y Fc $\gamma$ RII EN CELULAS MONOCITICAS  
HUMANAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**  
P R E S E N T A:  
**OLIVER CRESPO DIAZ**

MEXICO, D.F., A 26 DE JUNIO DE 2006



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.

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio y bajo la tutoría del Dr. Enrique Ortega Soto, con el apoyo técnico de la M. en IBB Claudia Garay Canales, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.. Para su realización se contó con donativos otorgados por CONACYT proyecto 45092. Así mismo, se llevó a cabo este trabajo gracias al apoyo económico de PAPIIT proyecto IN220705 de enero a junio de 2006.

Nuestro agradecimiento al Banco Central de Sangre del Centro Médico Siglo XXI y a la Dra. Aguirre, Dra. Esquivel y Dra. Hernández por proporcionar la sangre de donadores humanos y los resultados de los análisis sanguíneos de éstas.

## **JURADO ASIGNADO:**

### **PRESIDENTE:**

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

### **SECRETARIO:**

DRA. MARINA MACIAS SILVA

### **VOCAL:**

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

### **SUPLENTE**

DR. GUILLERMO MENDOZA HERNANDEZ

### **SUPLENTE**

DR. JORGE MORALES MONTOR

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

## **Agradecimientos**

A Dios por haber creado este mundo maravilloso para que nosotros lo exploremos y nos entretengamos estudiándolo y por habernos dado la capacidad para hacerlo.

A mis padres por sus cuidados y apoyo incondicional a pesar de escoger una carrera científica, por permitirme dedicarme a lo que me gusta e impulsarme para lograr mis metas. A mi hermano por su ejemplo de constancia y perseverancia. A mi Tito y Tita por su amor, su cariño, su apoyo y su buen ejemplo.

Al Dr. Enrique Ortega por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio, por su comprensión y su apoyo para realizar los trámites necesarios para alcanzar mis objetivos en EUA.

A Claudia Garay por su amistad, su compañía, su apoyo técnico, por los buenos ratos, las risas y la buena comida que compartimos junto con Ale y Andrea. Gracias por mantener mis pies en la tierra y por aguantarme todo este año.

A la Sra. Raquel por asegurarse que siempre hubiera material limpio para que pudiera trabajar y por su compañía. A Jonatan, representante de la nueva generación de biomédicos, por reírse de todo lo que digo.

Al Dr. Luis Vaca por su apoyo y a mis amigos del lab Vaca (a.k.a. “la granja”):

Julián, por su paciencia y por haberme enseñado a hacer biología molecular y por haberme impulsado a buscar oportunidades fuera de México. A Agustín, Poncho, Inés y Pichi por su amistad y compañía.

Al Dr. Barbarín Arreguín y al Dr. Roberto Arreguín, por todas sus atenciones para conmigo, su paciencia y su apoyo, por interesarse e involucrarse con sus alumnos. A mis amigos del Instituto de Química, Vane, Gaby, Lalo por haber estado siempre ahí para

apoyarme y ayudarme a distraerme y divertirme un rato cuando lo necesitaba y por su amistad que trasciende las distancias.

Al Dr. Rafael Camacho, por haberme tenido paciencia y por haberme enseñado las bases para poder hacer ciencia. A mi querida amiga Giovanna Salamanca, por ser una buena y muy querida amiga.

A mis amigos de IFC:

Bernardo Franco, por su apoyo técnico, pero mucho más importante, por su amistad sincera. A Fabiogochi, Gaby Peña, Ana Elisa Martínez, Yael Gutierrez y Vero, por estar ahí, por las risas y los buenos momentos juntos y las reuniones de “la comisión”.

A mis compañeros de biomédicas

Ana Elisa, Pittol, Laura, Leonora, Abi, Maru y Olivia, por haber compartido estos cuatro años de nuestras vidas juntos.

A Denisse, mi amiga en Cristo, por haber hecho de un simple esquema una imagen digna de una tesis, por su amistad (gracias a Dios por tu vida), por aguantarme, por estar ahí en las buenas y en las malas, y por toda su ayuda a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A la Unidad de citofluorimetría del Instituto de Investigaciones biomédicas y a Carlos Castellanos por su asistencia técnica.

Al Dr. Jorge Morales por su asistencia en probar la funcionalidad del estradiol utilizado en este estudio.

# Contenido

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<i>Inmunoglobulinas</i>	<b>2</b>
<i>Receptores para anticuerpos (FcRs)</i>	<b>3</b>
<i>Fc<math>\gamma</math>Rs</i>	<b>4</b>
<i>Monocitos y macrófagos</i>	<b>10</b>
<i>Estrógenos</i>	<b>12</b>
<i>Autoinmunidad</i>	<b>15</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>18</b>
<b>Planteamiento del Problema</b>	<b>19</b>
<b>Hipótesis y Objetivo</b>	<b>20</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>21</b>
<i>Cultivo de células</i>	<b>21</b>
<i>Aislamiento de monocitos humanos de sangre periférica</i>	<b>21</b>
<i>Tratamientos con 17-<math>\beta</math> estradiol</i>	<b>22</b>
<i>Expresión de receptores Fc<math>\gamma</math>RI y Fc<math>\gamma</math>RII</i>	<b>22</b>
<i>Sensibilización de eritrocitos de carnero</i>	<b>23</b>
<i>Hemaglutinación</i>	<b>24</b>
<i>Opsonización de eritrocitos</i>	<b>24</b>
<i>Ensayo de Fagocitosis</i>	<b>25</b>
<i>Determinación de la actividad fagocítica por microscopía</i>	<b>25</b>
<i>Determinación de la actividad fagocítica por ensayo colorimétrico</i>	<b>27</b>
<i>Análisis estadístico</i>	<b>27</b>

<b>Resultados</b>	<b>28</b>
<i>A) Células THP-1</i>	<b>28</b>
<i>Expresión de receptores Fc<math>\gamma</math>RI y Fc<math>\gamma</math>RII</i>	
<i>Fagocitosis mediada por Fc<math>\gamma</math>Rs</i>	
<i>Determinación de la actividad fagocítica por microscopia</i>	
<i>Determinación de la actividad fagocítica por ensayo colorimétrico</i>	
<i>B) Monocitos humanos aislados de sangre periférica</i>	<b>35</b>
<i>Expresión de receptores Fc<math>\gamma</math>RI y Fc<math>\gamma</math>RII</i>	
<i>Fagocitosis mediada por Fc<math>\gamma</math>Rs</i>	
<i>Determinación por microscopia</i>	
<i>Determinación por ensayo colorimétrico</i>	
<b>Discusión</b>	<b>46</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>Referencias</b>	<b>55</b>
<b>Apéndice</b>	<b>63</b>



## **Abreviaciones Utilizadas**

FcRs - Receptores para la fracción Fc

Fc $\gamma$ Rs - Receptores para la fracción Fc de Inmunoglobulinas G

Ig -Inmunoglobulina

LES - Lupus Eritematoso Sistémico

AR - Artritis Reumatoide

E2 - 17- $\beta$  estradiol

F(ab)<sub>2</sub> - Fracción de unión a antígeno

Fc - Fracción cristalizable

ITAM - Motivos de Activación basados en Tirosina de Inmunoreceptores

ITIM - Motivos de Inhibición basados en Tirosina de Inmunoreceptores

MHC – Complejo mayor de histocompatibilidad

pIgR – Receptor para Ig polimérica

ADCC- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

FACS – Fluorocitometria de Flujo

IF – Índice Fagocítico

MIF- Intensidad de Fluorescencia Media

## Resumen

Existen diferencias en la susceptibilidad a diferentes enfermedades autoinmunes relacionadas con el dimorfismo sexual. Las hormonas sexuales, como el 17- $\beta$  estradiol, son las encargadas de producir el dimorfismo sexual y sus unidades varían drásticamente entre hombres y mujeres. En enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos como Lupus eritematoso sistémico (LES) y aún en otras mediadas por células como la Artritis reumatoide (AR), gran parte del daño causado a los diferentes tejidos no es consecuencia directa del efecto de los anticuerpos, sino del proceso inflamatorio que pueden desencadenar al unirse en forma de complejos antígeno-anticuerpo a los receptores Fc $\gamma$ R en células como monocitos, macrófagos y neutrófilos. Ya que muchas de las enfermedades autoinmunes presentan deficiencias en la remoción de complejos inmunes y esta función es en gran parte mediada por los receptores Fc en células fagocíticas, nos propusimos estudiar si el 17- $\beta$  estradiol modula la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII y la fagocitosis mediada por estos receptores en monocitos humanos.

Se incubaron monocitos de la línea celular THP-1 así como monocitos humanos aislados de sangre periférica de varones con tres diferentes concentraciones de estradiol por 24, 48 y 72 horas. Se midió la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII por citometría de flujo y su capacidad de fagocitar eritrocitos de carnero opsonizados con IgG.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en células THP-1 así como en monocitos humanos aislados de sangre periférica después de los diferentes tratamientos con 17- $\beta$  estradiol. Tampoco se observaron cambios en la capacidad fagocítica de células THP-1 ni en monocitos aislados de sangre periférica después de los tratamientos con estradiol.

Concluimos que el estradiol no afecta la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en monocitos humanos ni la fagocitosis de éstas células. Sin embargo, es posible que la hormona modifique algunas otras funciones efectoras, como la producción de citocinas.

# Introducción

## *Inmunoglobulinas (Igs)*

Las inmunoglobulinas (Igs), también conocidas como anticuerpos, son proteínas producidas por los linfocitos B y células plasmáticas del sistema inmunológico. Estas proteínas reconocen y unen antígenos de forma específica para que puedan ser neutralizados o destruidos posteriormente. El proceso por el cual una partícula es recubierta por anticuerpos se conoce con el nombre de opsonización y junto con la fijación y activación de proteínas del complemento forman los mecanismos por los cuales las inmunoglobulinas pueden favorecer la destrucción de la partícula extraña. (Janeway, *et al*, 2001). Las inmunoglobulinas forman la respuesta humoral de la inmunidad adaptativa y están compuestas por cuatro cadenas peptídicas: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Estas cadenas peptídicas están unidas entre sí por enlaces disulfuro. Existen varias clases de inmunoglobulinas, que reciben el nombre IgM, IgA, IgD, IgG e IgE, cada una con su estructura, peso molecular y funciones particulares. Cuando el sistema inmunológico encuentra un antígeno por primera vez, se genera una respuesta primaria que consiste en la producción de IgM contra este antígeno específico. Si el sistema inmunológico vuelve a encontrar al mismo antígeno, se inducirá un rearreglo en los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en la célula plasmática que resultará en la producción de IgG contra el mismo antígeno, formando así la memoria inmunológica. Todas las inmunoglobulinas se dividen de acuerdo a su estructura en dos fragmentos: la fracción de reconocimiento y unión a antígeno, también conocido como F(ab) y la fracción cristalizable también conocida como Fc. (Figura 1) Las inmunoglobulinas de clase G o IgG son las más abundantes en suero, por lo que juegan un papel muy importante en la activación de células del sistema inmunológico a través de receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas G, además de su papel neutralizante y de fijación del complemento.

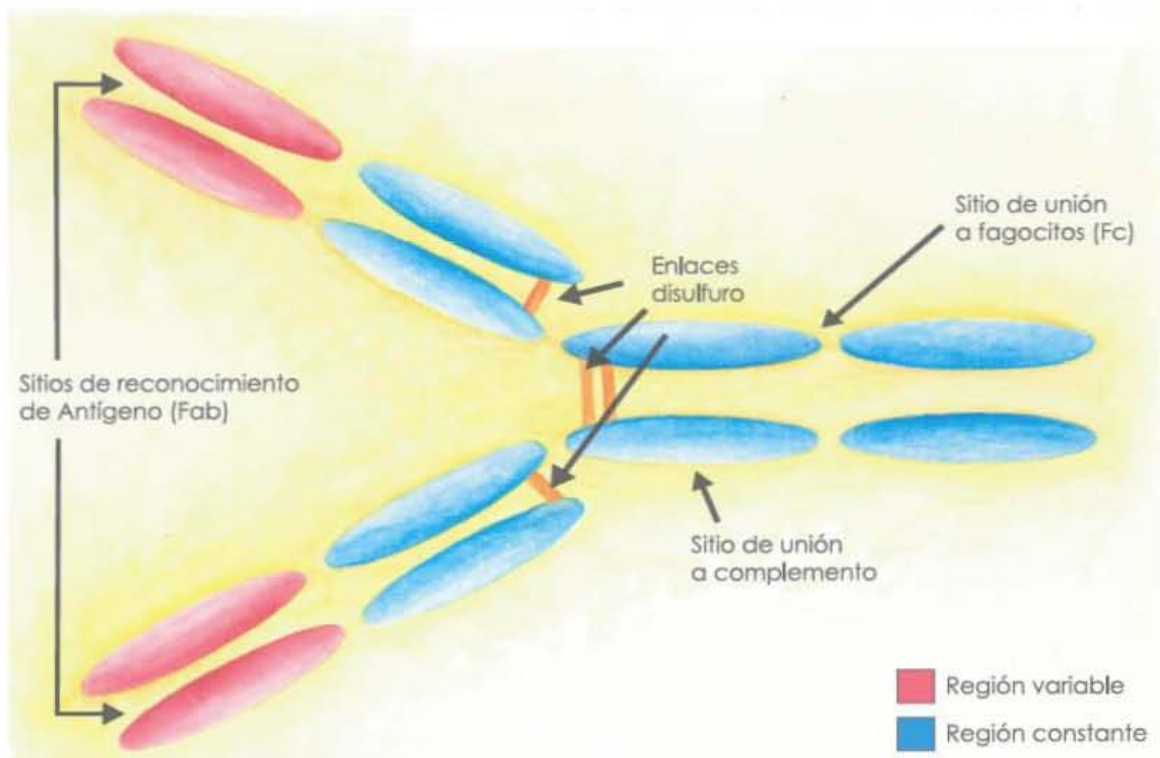


Figura 1. Estructura general de las Inmunoglobulinas

### ***Receptores para anticuerpos (FcRs)***

Los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas (FcR) conforman una familia de glicoproteínas transmembranales que reconocen y unen inmunoglobulinas (Igs) por su fracción cristalizable ó Fc. Existen varias clases de receptores Fc, cada una con especificidad para uno de los diferentes tipos existentes de Igs, es decir, IgA, IgG e IgE. Cada miembro de esta familia de receptores recibe su nombre del tipo de inmunoglobulina que reconoce: Fc $\alpha$ , Fc $\gamma$  y Fc $\epsilon$ . Cuando hay más de un tipo de receptor para un isotipo, se designan con números romanos e.g. Fc $\epsilon$ RI, Fc $\epsilon$ RII, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, etc. Estos receptores se expresan en diferentes células del sistema inmune, como monocitos, macrófagos, linfocitos B, células NK, neutrófilos y eosinófilos, y su expresión en dichas células cambia durante los diferentes estados de activación y diferenciación de cada una (Daëron M. 1997).

Los anticuerpos pueden desencadenar respuestas biológicas a través de estos receptores, ligando así el reconocimiento específico de las inmunoglobulinas de la respuesta inmune adaptativa con la activación de células efectoras de la respuesta inmune innata.

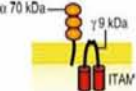
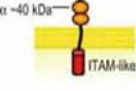
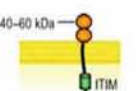
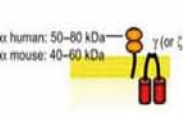
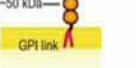
## ***FcγRs***

Dentro de los receptores Fcγ se reconocen hasta el momento cuatro tipos principales: FcγRI, FcγRII, FcγRIII (*Ravetch, et al, 2001*) y el recientemente descrito FcγRIV (*Bolland, et al. 2005, Nimmerjahn, et al, 2005*). En total, ocho genes han sido identificados para los FcγRs humanos: tres genes para los receptores de alta afinidad o FcγRI (FcγRIA, FcγRIB y FcγRIC) y cinco genes para los receptores de baja afinidad FcγRII (FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC) y FcγRIII (FcγRIIIA y FcγRIIIB). (*Takai T. 2005*) Los genes para los receptores de baja afinidad y para la cadena FcγRIα y la cadena γ común se localizan en el cromosoma 1q23, mientras que los tres genes para el receptor de alta afinidad se han relacionado al cromosoma 1q21. El gen para el receptor FcγRIV en ratón se localiza en el cromosoma 1, pero en humano aún no se conoce su localización exacta en el genoma. Las isoformas que se conocen para algunos tipos de receptores Fcγ, por ejemplo, FcγRIIB1 y FcγRIIB2, son producidas por splicing alternativo.

Aunque estos receptores no reconocen IgGs monoméricas, sino que solamente interactúan con complejos de IgGs agregadas, es posible que el FcγRI por su alta afinidad pueda unir IgGs monoméricas en suero si éstas se encuentran en altas concentraciones (*Takai T, 2005*), ver *Tabla 1*. Todos los receptores de la familia Fcγ desencadenan cascadas de señalización que regulan procesos celulares, como la liberación de citocinas, producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y fagocitosis, entre otras. La señalización desencadenada por estos receptores depende de los motivos ITAM (Motivos de Activación basados en Tirosina de Inmunoreceptores) e ITIM (Motivos de Inhibición basados en Tirosina de Inmunoreceptores) presentes en los segmentos intracelulares de las cadenas que componen a cada uno. El receptor FcγRI está compuesto por tres dominios tipo inmunoglobulina en su porción extracelular mientras que los demás receptores sólo están formados por dos. Los receptores I, IIIa y IV no contienen motivos ITAM propios en su segmento intracelular, sino que se asocian a cadenas polipeptídicas accesorias como la cadena γ (o ζ en NK y otros tipos celulares) las cuales poseen ITAMs (*Kimura, et al, 1996*). El receptor FcγRIIIB está compuesto por dos dominios extracelulares y no contiene segmentos transmembranal ni citoplásmico sino que se une a la membrana a través de fosfatidil inositol por un anclaje

GPI. En cuanto a los receptores tipo II, se conoce que el FcγRIIIa posee un ITAM en su parte citoplásmica, mientras que el FcγRIIb contiene un ITIM en su segmento intracelular (Isnardi, et al, 2004, Burshtyn, et al, 1997, Vély F, et al, 1997), por lo que generalmente al receptor FcγRIIb se le conoce como receptor inhibidor (Tridandapani, et al, 2002). (Figura 2) Hasta hace poco se creía que la señalización a través de motivos ITAM conducía a una regulación positiva o activación de las células, pero recientemente se ha descrito que algunos receptores y moléculas adaptadoras con motivos ITAM pueden también llevar a la inhibición de ciertas funciones celulares (Hamerman, et al, 2006).

Tabla 1. Estructura General y Perfiles de Expresión Celular de los receptores FcγR

Recepto	Estructura	Afinidad por IgG		Expresión
		rató	human	
FcγRIa (CD64)		$10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ para IgG2a >> 3,1,2b	$10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1}$ para IgG1 >= 3 > 4 >> 2	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, dendríticas
FcγRIIa (CD32A)		No	$< 10^7 \text{ M}^{-1}$ para IgG3 >= 1,2 >> 4	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, dendríticas
FcγRIIb (CD32B)		$10^7 \text{ M}^{-1}$ para IgG1, 2a, 2b >> 3 $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para IgE	$10^7 \text{ M}^{-1}$ para IgG3 >= 1 > 4 > 2	IIB1: linf B, IIB2: céls. cebadas, basófilos, dendríticas, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos
FcγRIIIa (CD16A)		$10^7 \text{ M}^{-1}$ para IgG1, 2a, 2b >> 3 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para IgE	$2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ para IgG1, 3 >> 2, 4	Macrófagos, monocitos, NK, céls cebadas, eosinófilos, dendríticas
FcγRIIIb (CD16B)		No	$< 10^7 \text{ M}^{-1}$ para IgG1, >> 2, 4	Neutrófilos,

Modificada de Takai T. *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 25, No. 1, January

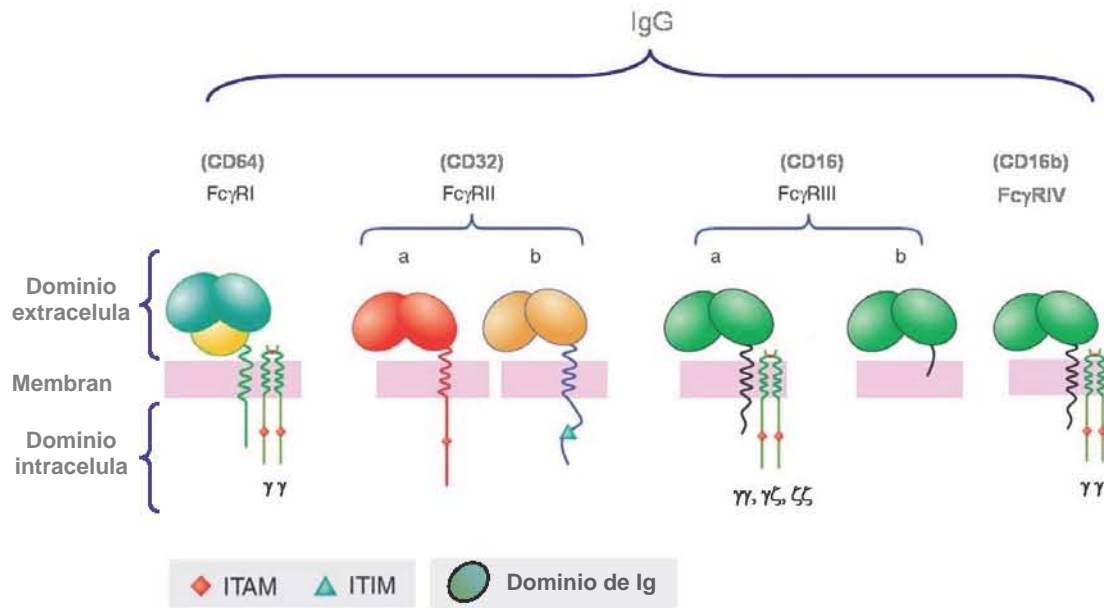


Figura 2. Miembros conocidos hasta el momento de la familia de receptores Fcγ

Modificado de *Current Opinion in Immunology* 2002, 14:798–802

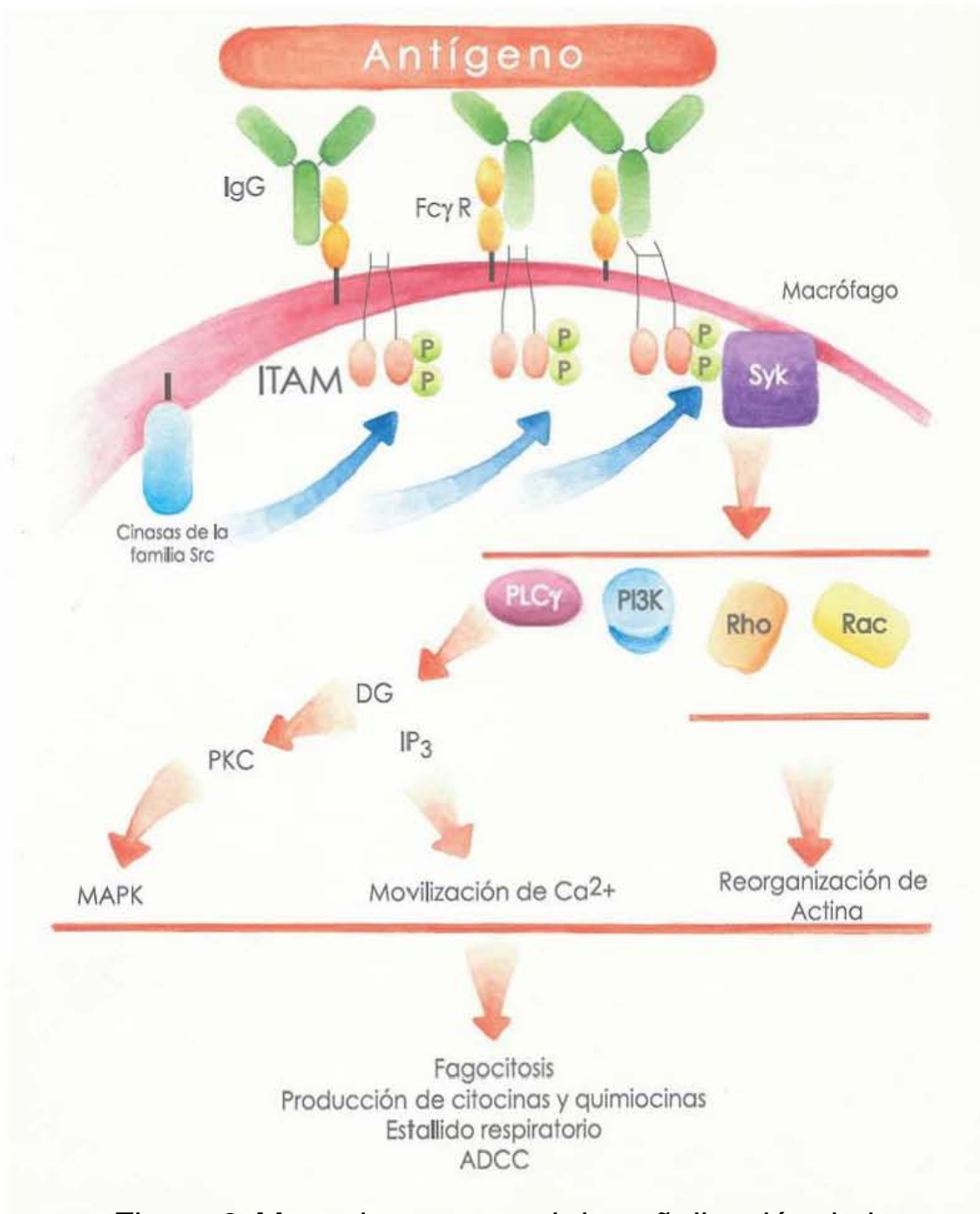
El mecanismo general de señalización de los FcγRs que contienen motivos ITAM, que es iniciado por su entrecruzamiento, consiste en el reclutamiento de una cinasa de la familia Src, que fosforila las tirosinas de los motivos ITAM (Figura 3). Una vez fosforilados, los fosfoITAM sirven de punto de anclaje para el reclutamiento de otra cinasa, Syk, que a su vez fosforila otras proteínas y cinasas que llevan a la amplificación de la señal y a la activación de proteínas como PLCγ y PI3K que participan en la activación de la MAPK y a la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Syk también activa a las proteínas Rho y Rac, involucradas en la reorganización de los filamentos de actina. Por otro lado, el receptor FcγRIIb a través de su motivo ITIM recluta a la fosfatasa SHIP cuya actividad de fosfatasa de lípidos de inositol antagoniza la señalización positiva iniciada por los ITAM, interviniendo con las fosforilaciones desencadenadas por Syk, inhibiendo así la activación celular. (Pan, et al, 2003, Isnardi, et al, 2004).

Los FcγR participan en varias funciones que se pueden agrupar en tres categorías: La primera y más común función de los FcγR es la modulación positiva y negativa de funciones celulares efectoras, como la fagocitosis, citólisis, degranulación y la

activación transcripcional de genes de citocinas proinflamatorias. La regulación positiva de estas funciones está dada por los receptores Fc $\gamma$ RI, IIa y III, mientras que la regulación negativa corre por parte del Fc $\gamma$ RIIb.

La segunda función es la remoción de complejos inmunes. Los Fc $\gamma$ Rs tienen la capacidad de capturar complejos inmunes para conducirlos a su degradación. Esta función mantiene la homeostasis y además participa en la vía de degradación de péptidos para su presentación en moléculas de MHC. Defectos en la remoción de complejos inmunes ya han sido relacionados a la presencia de enfermedades autoinmunes como LES. Además, se ha descubierto que la presentación de antígenos es más eficiente si el antígeno es internalizado vía Fc $\gamma$ Rs (*Amigorena, et al, 1999*).





*Figura 3. Mecanismo general de señalización de los receptores Fcγ a través de los motivos ITAM*

La tercera función es el transporte de Ig a través de epitelios. Los receptores FcRn y el receptor para Ig polimérica (pIgR) pueden transportar inmunoglobulinas a través de la célula de una cara de la célula a la otra. Se cree que además de transportar a las inmunoglobulinas, también son encargados de proteger a éstas de ser degradadas.

Además de expresarse en membrana, algunos de los FcγRs se han encontrado también en forma soluble. Las funciones de estas formas solubles de FcγR no se han caracterizado detalladamente, aunque se ha observado que algunas formas solubles de estos receptores pueden inhibir respuestas biológicas *in vitro* (Wines, *et al*, 2003).

### ***Monocitos y macrófagos***

Los monocitos son células hematopoyéticas del linaje mieloide, precursoras de macrófagos, que componen entre el 1 y el 6 % de los leucocitos circulantes totales en el humano adulto. Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de una unidad formadora de colonias de granulocitos y monocitos (CFU-GM), la cual también da origen a neutrófilos. Esta unidad formadora de colonias da origen a un monoblasto, que aunque tiene receptores para IgGs y es capaz de fagocitar partículas opsonizadas con inmunoglobulina G, no puede internalizar moléculas opsonizadas con C3b. La división de un monoblasto da origen a dos promonocitos, los cuales difieren del monoblasto por su producción de lisozima, su alta capacidad pinocítica y su capacidad de fagocitar partículas opsonizadas con C3b. La división de un promonocito da origen a dos monocitos. Estos permanecen en la médula ósea menos de 24 horas antes de entrar a circulación sanguínea. En circulación, cuando un monocito es activado, migra hasta el sitio donde es requerido, se adhiere al endotelio, lo atraviesa y llega al tejido donde se convierte ya en un macrófago maduro (Lewis, *et al*, 1992).

Además de los monocitos y macrófagos que se encuentran en un exudado inflamatorio, existen en diferentes tejidos poblaciones de macrófagos residentes, que actúan como centinelas recorriendo el tejido para detectar cualquier patógeno. Los macrófagos reciben diferentes nombres dependiendo de su localización en los distintos tejidos del

cuerpo, mientras que los monocitos circulantes son conocidos como monocitos mononucleares.

Para llevar a cabo su papel en la eliminación de patógenos, los monocitos y macrófagos cuentan con varias funciones efectoras entre las cuales se encuentran: reconocimiento, fagocitosis y destrucción de microorganismos, producción de moléculas quimiotácticas, procesamiento y presentación de antígeno en contexto de moléculas MHC clase I y clase II, endocitosis, activación de linfocitos T, producción y liberación de citocinas, secreción de enzimas (lisozimas, proteasas, colagenasas, elastasas, cisteína proteasas, etc), secreción de inhibidores de enzimas y proteínas componentes del complemento, producción de intermediarios derivados del ácido araquidónico, de factores de coagulación, así como de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y también del estallido respiratorio, la inhibición del crecimiento de células tumorales, y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), entre otras (*Lewis, et al, 1992*).

Los monocitos y macrófagos son las células fagocíticas por excelencia y junto con los neutrófilos se conocen como fagocitos profesionales por su gran capacidad fagocítica. Estas células tienen como función principal la remoción de complejos inmunes, células muertas y fagocitosis de partículas extrañas. También juegan un papel muy importante en los procesos inflamatorios a través de la producción de citocinas proinflamatorias.

Mientras que los neutrófilos componen la primera línea de defensa contra patógenos y son los primeros en responder desencadenando procesos inflamatorios agudos, los monocitos y macrófagos se han correlacionado estrechamente con procesos inflamatorios crónicos por su gran capacidad fagocítica y la producción de citocinas proinflamatorias como resultado de la fagocitosis.

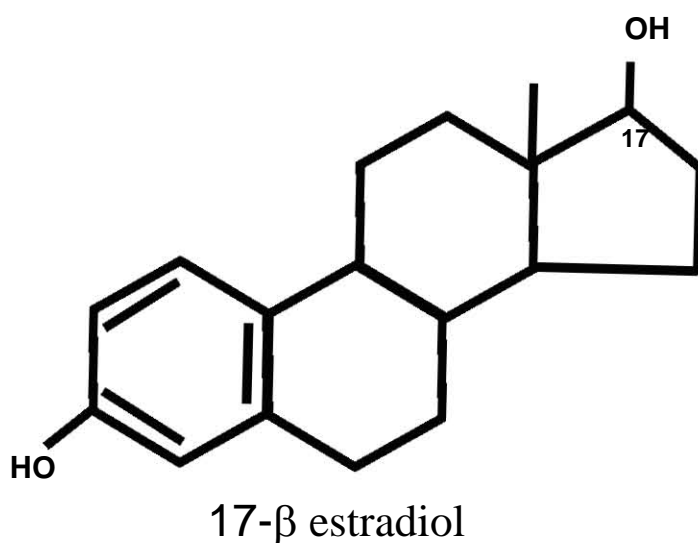
Los fagocitos pueden llevar a cabo dos tipos de fagocitosis: la opsónica y la no opsónica.

La fagocitosis opsónica se refiere a la fagocitosis mediada por receptores que reconocen partículas que han sido opsonizadas, es decir, cubiertas con moléculas que facilitan su internalización, como proteínas del complemento e inmunoglobulinas. En este tipo de fagocitosis participan receptores como los receptores Fc $\gamma$  además de receptores para

otras opsoninas como proteínas del complemento. Como resultado de la fagocitosis opsonica se liberan citocinas proinflamatorias que pueden llevar a una inflamación crónica característica de muchas enfermedades autoinmunes (*Dijstelbloem, et al, 2001*).

## ***Estrógenos***

Los estrógenos son hormonas sexuales derivadas del colesterol que tienen una gran variedad de efectos en diferentes tejidos del cuerpo humano (*Figura 4*). Existen tres hormonas diferentes que componen el grupo de los estrógenos: estriol, 17- $\beta$  estradiol y estrona. Entre un 60 y 80% de los estrógenos circulantes en la mujer está compuesto por estriol, mientras que el estradiol y la estrona componen cada uno entre un 10 y 20% del estrógeno circulante. El estradiol es producido principalmente en el ovario en las mujeres, mientras que el estradiol que se produce en los hombres es producto de las glándulas adrenales, tejido adiposo, hígado, riñón y testículo. A pesar de no ser el estrógeno predominante en circulación, el estradiol sí es el más potente y es responsable de la maduración folicular en las hembras. El 17- $\beta$  estradiol en particular participa principalmente en el ciclo menstrual, en la maduración del folículo y liberación del óvulo. Los niveles de estradiol en los hombres son menores que en la mujer ya que puede ser convertido en testosterona. A lo largo de la vida de una mujer, los niveles de estradiol varían considerablemente durante el ciclo menstrual, el embarazo y la menopausia.



*Figura 4.* Estructura del 17- $\beta$  estradiol, hormona lipídica derivada del colesterol

El estradiol por su naturaleza lipídica e hidrofóbica puede atravesar la membrana plasmática y llegar al citoplasma, donde se encuentra su receptor. Al unirse a su receptor, este complejo es translocado al núcleo donde puede reconocer secuencias en el DNA llamadas elementos de respuesta a estradiol (ERE) y activar la transcripción de genes (Kian, et al, 2004). (Figura 5). Además de sus efectos sobre la transcripción, el estradiol puede activar cinasas como Erk1/2 y Src y activar canales de calcio para llevar a un aumento en la concentración de calcio intracelular por mecanismos no genómicos en varios tejidos, por ejemplo en el músculo (Szemraj, et al, 2003, Thomas, et al, 2005).

La mayoría de las células del sistema inmune expresan alguno de los receptores para estradiol (Tornwall, et al, 1999). Cada vez toma más importancia la idea de una red neuroendocrino-inmunológica, y la presencia de receptores para hormonas sexuales en células del sistema inmune puede sugerir algún tipo de función moduladora de las hormonas sexuales sobre las funciones efectoras de éstas.

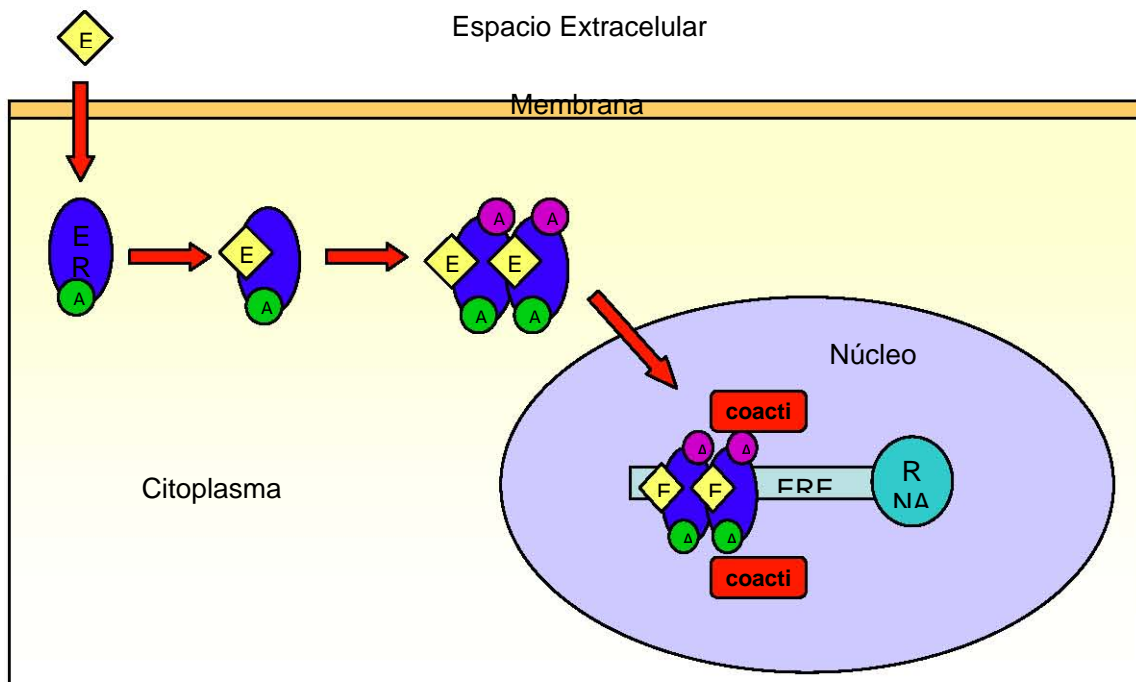


Figura 5. Mecanismo general de acción del estradiol. El estradiol por su naturaleza lipídica, atraviesa la membrana plasmática para encontrar a su receptor en citoplasma. Al unirse a éste, es translocado al núcleo donde actúa como factor de transcripción.

## ***Autoinmunidad***

La autoinmunidad se define como una patología en la cual el sistema inmune de un organismo por razones aún desconocidas reconoce un tejido o incluso una molécula propia como extraña, pasando por alto los mecanismos de tolerancia a lo propio. Este reconocimiento anómalo lleva a la activación de una respuesta inmune específica para esta molécula que puede provocar desde inflamación crónica hasta la destrucción del tejido u órgano que expresa dicha molécula, causando daño al propio organismo. Existen varios tipos de padecimientos autoinmunes que afectan diferentes órganos produciendo patologías diversas dependiendo del blanco que reconozca el sistema inmunológico, pero fundamentalmente se pueden clasificar según el mecanismo de acción principal responsable de la patología: mediado por anticuerpos o mediado por células.

Las enfermedades autoinmunes son muy complejas, ya que existen muchos factores que contribuyen al padecimiento y no siempre son los mismos factores los que están involucrados en el desarrollo de una misma enfermedad en dos diferentes pacientes. La existencia de factores genéticos que predisponen a un individuo a desarrollar alguna autoinmunidad, aunado a los factores ambientales y a los diferentes tipos de estrés a los cuales puede estar sometido un individuo, hacen que el estudio de estas patologías sea muy complejo. Por ejemplo, en el caso del Lupus eritematoso sistémico (LES), existen desde polimorfismos (*Aitman, et al, 2006, Gonzalez-Escriban, et al, 2002*) hasta mutaciones en proteínas como lectinas (*Villareal, et al, 2001*) y receptores Fc $\gamma$  (*Yap, et al, 1999*) y otros factores aún desconocidos (*Matsumoto, et al, 2003*) que pueden favorecer el establecimiento de la enfermedad. La multifactorialidad de esta enfermedad hace difícil el desarrollo de tratamientos efectivos y aún más complejo el encontrar el origen de la misma.

Ha sido establecido que muchas de las enfermedades autoinmunes son mucho más frecuentes y con síntomas más graves en mujeres que en hombres. Además, observaciones clínicas han sugerido una relación directa entre los niveles de estradiol en sangre y la severidad de los síntomas en pacientes con algunas enfermedades autoinmunes (*Peeva, et al, 2005*). Por ejemplo, en el caso de mujeres con LES, los

síntomas se exacerban durante el embarazo, cuando los niveles de estradiol son más altos, pero disminuyen durante la menopausia, cuando los niveles de estradiol circulante empiezan a disminuir drásticamente. En el caso de la artritis reumatoide sucede lo contrario, es decir, durante el embarazo, los síntomas disminuyen, mientras que durante la menopausia los mismos síntomas aumentan de manera considerable. A pesar de que ambas enfermedades son de origen autoinmune, el efecto del estradiol parece ser opuesto en ambos casos. Esto probablemente es producto de distintas vías de activación de los monocitos y macrófagos y el efecto de las hormonas en la activación de otros tipos celulares, polarizando la respuesta inmune hacia un tipo Th1 en un caso o Th2 en el otro (*De León-Nava , Morales-Montor, 2006*).

Se ha reportado que los niveles de algunas hormonas pueden alterar la producción y liberación de citocinas proinflamatorias tanto en ratón, como en cobayo (*Kramer, et al, 2004*) y también en células humanas, aunque los estudios realizados en estas últimas no han sido muy claros e incluso se han reportado resultados contradictorios (*Carruba, et al, 2003, Bouman, et al, 2004*). Además, recientemente se demostró que el estradiol puede inducir la proliferación de linfocitos T reguladores (*Prieto, et al, 2006*).

Si bien se sabe que algunas enfermedades autoinmunes como el LES y la Artritis reumatoide (AR) son enfermedades dependientes de anticuerpos, gran parte del efecto dañino de los autoanticuerpos producidos en estas enfermedades no es causado directamente por la unión del anticuerpo a su antígeno específico, sino por las funciones desencadenadas en células efectoras a través del reconocimiento de la fracción Fc del anticuerpo por los receptores Fc (*Hogarth P. Mark, 2002, Dijkstra, et al, 2001*). Estos receptores son expresados por monocitos y macrófagos y otras células como linfocitos B, neutrófilos y eosinófilos. La acumulación de complejos inmunes en capilares del riñón puede dar como consecuencia una severa reacción inflamatoria que lleve a glomerulonefritis, síntoma característico en personas con LES. Por otro lado, la destrucción de tejido conectivo por reconocimiento de la porción Fc de las inmunoglobulinas anti-factor reumatoide por parte de los monocitos y la inflamación resultante es un síntoma característico de artritis reumatoide.

Existe evidencia en ratones que apunta claramente a una correlación directa entre el balance en los receptores Fc activadores e inhibidores y el desarrollo de enfermedades

autoinmunes (*McGaha, et al, 2005*). Por ejemplo, ratones deficientes en Fc $\gamma$ RIIb desarrollan autoinmunidad espontáneamente además de ser mucho más sensibles a la inducción de enfermedades autoinmunes (*Petkova, et al, 2006*). Por otra parte, ratones transgénicos para Fc $\gamma$ RIIa desarrollan hipersensibilidad y autoinmunidad en varios órganos (*Tan Sardjono , et al 2005*).

En humano, existen también estudios recientes que demuestran un papel importante de los receptores Fc $\gamma$  en procesos autoinmunes (*Stefanescu, et al, 2004, Radstake, 2004*). Inclusive, se han realizado estudios poblacionales en los cuales se ha determinado una susceptibilidad mayor a enfermedades autoinmunes relacionada con polimorfismos en el receptor Fc $\gamma$ RIIb (*Tsuchiya, et al, 2005*)



## Antecedentes

Se sabe que existen diferencias en la frecuencia y en la susceptibilidad a muchas de las enfermedades autoinmunes, diferencias relacionadas con el dimorfismo sexual. Por lo general, para la mayoría de los padecimientos autoinmunes los síntomas son más severos en mujeres que en hombres (*Merrill, et al, 1996*). Además, observaciones clínicas han sugerido cambios en la severidad de los síntomas de algunas enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y Artritis reumatoide (AR) durante el embarazo y la menopausia (*Sarvetnick, et al, 1990, Homo-Delarche, et al, 1992*), períodos en los que hay grandes variaciones en la concentración de estradiol circulante. Estos datos sugieren que las hormonas sexuales pueden afectar o modular funciones celulares involucradas con los síntomas de algunos padecimientos autoinmunes (*Cutolo, et al, 2004*).

Algunas enfermedades mediadas por anticuerpos, como lupus, así como por células, en el caso de la artritis, en las cuales hay una deficiente remoción de complejos inmunes (*Salmon, et al, 1984*), son afectadas de diferente manera por el estradiol (*Lang, 2004, Clynes, et al, 2005*). Las principales células encargadas de la remoción de complejos inmunes son los neutrófilos, monocitos y macrófagos (*Lewis, et al, 1992*). Estas son células fagocíticas por excelencia y ambas expresan los receptores para inmunoglobulina G, Fc $\gamma$ RI y RII (*Sanders, et al, 1987*). Por lo tanto, estudiar el efecto de algunas hormonas sexuales sobre monocitos es pertinente ya que dichos efectos podrían estar relacionados con las diferencias sexuales en la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes.

Además, algunos estudios han mostrado que el estradiol puede afectar la producción y liberación de citocinas en monocitos (*Kramer, et al, 2004, Bouman, et al, 2004, Carruba, et al, 2003*). En este trabajo estudiamos los efectos del estradiol sobre la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII en monocitos humanos así como sobre una de las principales funciones desencadenadas por el entrecruzamiento de estos receptores, la fagocitosis.

## Planteamiento del problema

Si bien se sabe que en algunas enfermedades autoinmunes existen diferencias en susceptibilidad entre hombres y mujeres, no se ha explicado claramente la causa de estas diferencias. Debido a que las hormonas sexuales son las responsables del dimorfismo sexual y marcan muchas diferencias entre hombres y mujeres, es posible que éstas tengan un papel importante en la susceptibilidad a desarrollar una enfermedad autoinmune y en la diferencia que existe entre hombres y mujeres.

Por otro lado, ya que los Fc $\gamma$ Rs pueden participar en los procesos autoinmunes desencadenando funciones efectoras como fagocitosis y liberación de citocinas inflamatorias que pueden llevar a signos característicos de varios padecimientos autoinmunes, es posible que la expresión o función de estos receptores pueda ser modulada por hormonas sexuales. Ya que las células fagocíticas como neutrófilos, monocitos y macrófagos expresan tanto Fc $\gamma$ Rs como receptores para estradiol, es factible que la expresión o la función de los receptores Fc $\gamma$  pueda ser modulada por el estradiol.

Además, existe evidencia que en pacientes con enfermedades autoinmunes como Lupus eritematoso sistémico, los niveles de algunos receptores Fc $\gamma$  son menores en hombres que en mujeres en células fagocíticas.

El estudiar los efectos del 17- $\beta$  estradiol sobre la expresión y función de los receptores Fc $\gamma$  nos permitiría establecer si entre los procesos que dan origen a las distintas susceptibilidades entre hombres y mujeres a las enfermedades autoinmunes se encuentra algún tipo de modulación del sistema inmunológico a nivel de monocitos y macrófagos por parte de una de las hormonas sexuales más importantes.

## **Hipótesis**

El estradiol puede modificar la expresión o afectar algunas de las funciones de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII, como la fagocitosis mediada por receptores Fc en células monocíticas, dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición.

## **Objetivo**

Estudiar el efecto del 17- $\beta$  estradiol sobre la expresión de los receptores Fc $\gamma$  RI y Fc $\gamma$ RII y la fagocitosis dependiente de éstos receptores en monocitos humanos.

## Materiales y Métodos

### Cultivo de células

Tanto la línea celular monomiocítica humana, THP-1, obtenida del ATCC (por sus siglas en inglés: American Type Culture Collection), como las células monocíticas extraídas de sangre periférica de donadores sanos fueron cultivadas en cajas de 6 pozos con medio RPMI -1640 sin rojo de fenol (Gibco), ya que está reportado que el rojo de fenol puede mimetizar a algunas hormonas e interferir con el efecto esperado del estradiol (*Kramer, et al, 2004*). El medio fue complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con carbón dextrán (Hyclone) para disminuir tanto como fuera posible la cantidad de hormonas presentes en el suero. Además, el medio fue adicionado con 1mM de piruvato de sodio (Gibco), 100µM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 2mM de glutamina (Sigma) y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina, Sigma Chemical Company). Todas las células fueron cultivadas en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### Aislamiento de monocitos de sangre periférica humana

Los concentrados leucocitarios (buffy coat) fueron amablemente proporcionados por el banco de sangre del Centro Médico Siglo XXI, IMSS. Todo el material con el que se trabajó la sangre humana era de plástico y desechable. Tanto el material utilizado como el remanente del concentrado leucocitario fue esterilizado antes de ser desechado. Para aislar monocitos de sangre periférica se agregaron 30 ml de una solución 1:2 de buffy coat en PBS estéril y frío a 15 ml de Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences) y se centrifugó durante 30 minutos a 1000g a temperatura ambiente sin freno. Los anillos de leucocitos mononucleares obtenidos fueron recolectados con una pipeta Pasteur estéril y colocados en tubos nuevos. Las células fueron lavadas dos veces con 50 ml de PBS frío estéril por centrifugación a 400g durante 10 minutos. Para eliminar los eritrocitos contaminantes se agregaron 3 ml de solución de lisis por cada dos anillos recolectados y se incubaron los tubos en hielo por 3 minutos. Se volvieron a lavar con PBS hasta obtener un sobrenadante limpio. Por último, las células se centrifugaron a 400g por 5 minutos a 4°C, se contaron y se resuspendieron en 60 ml de medio complementado sin

suero. Para purificar los monocitos por adherencia, las células lavadas se dejaron adhiriendo durante 60 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en cajas de Petri de 140x20 mm previamente incubadas por 60 minutos con suero autólogo (suero obtenido del mismo donador inactivado a 56°C por 30 minutos). Después de la incubación, se lavaron las cajas de Petri suavemente 3 veces con PBS tibio para remover las células no adheridas. Finalmente, las células adherentes se dejaron incubando en medio RPMI-1640 sin rojo de fenol complementado con 10% de suero autólogo.

## Tratamientos con 17-β estradiol

Se probó la funcionalidad del 17-β estradiol (β- estradiol soluble en agua, Sigma) midiendo la viabilidad de la línea celular MCF-7, adenocarcinoma de mama humano dependiente de estradiol, obtenida del ATCC. Se preparó una solución stock 1x10<sup>-2</sup>M de 17-β estradiol (E2) a partir de la cual se prepararon soluciones de trabajo frescas de 1x10<sup>-5</sup>M, 1x10<sup>-6</sup>M y 1x10<sup>-7</sup>M de estradiol para cada experimento. De estas soluciones se agregó la cantidad necesaria para alcanzar las concentraciones de 1x10<sup>-7</sup>M, 1x10<sup>-8</sup>M y 1x10<sup>-9</sup>M de E2 (concentraciones representativas del embarazo, ciclo menstrual y menopausia respectivamente) en el medio en el que se cultivaron las células. La incubación de las células con estas tres diferentes concentraciones de E2 se realizó por 24, 48 y 72 horas. Al término de estos lapsos, las células se colectaron por centrifugación, se contaron y se utilizaron para la determinación de la expresión de receptores y la actividad fagocítica.

## Expresión de receptores FcγRI y FcγRII

Para determinar la expresión de los FcγRI y FcγRII se utilizó la técnica de tinción por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo (FACS). Aproximadamente 300,000 células fueron colectadas por muestra. Las células se centrifugaron a 1000 RPM a 4°C durante 3 minutos y se lavaron con 300 µl de buffer de lavados (ver Apéndice). La tinción se llevó a cabo en hielo para impedir la internalización y el reciclaje de receptores.

Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de  $1\mu\text{g}/300,000$  células en  $300\ \mu\text{l}$ . Los anticuerpos anti Fc $\gamma$ RI (32.2, IgG1) y anti Fc $\gamma$ RII (IV.3, IgG2b) fueron purificados en nuestro laboratorio a partir de sobrenadantes obtenidos de hibridomas que fueron adquiridos de ATCC, mientras que el 2° Anticuerpo acoplado a FITC fue obtenido comercialmente (Rabbit anti-goat Ig, Zymed). En todos los experimentos se incluyó un control de isotipo para cada tipo de anticuerpo usado, al igual que un control de pegado inespecífico del segundo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales murinos utilizados como control de isotipo fueron purificados y preparados en el laboratorio.

Se reporta la intensidad media de fluorescencia (MF). Para poder comparar entre ensayos, se normalizó dividiendo la MF de las células tratadas sobre la MF del control de las mismas células aisladas e incubadas bajo las mismas condiciones pero sin tratamiento con estradiol.

### Sensibilización de eritrocitos de carnero

Los eritrocitos de sangre desfibrinada de carnero se obtuvieron de la compañía ERIKAR y se mantuvieron en esterilidad en solución de Alsevers (ver Apéndice) 1:2 v/v a  $4\ ^\circ\text{C}$  hasta su uso. Para poder opsonizarlos, es necesario sensibilizarlos primero, es decir, incubarlos con TNBS. El TNBS se une a la membrana de los eritrocitos y posteriormente se pueden opsonizar utilizando un anticuerpo anti-DNP, producto del TNBS. Antes de sensibilizarlos, los eritrocitos se centrifugaron a 2200 RPM durante 12 minutos a  $4\ ^\circ\text{C}$  y se lavaron dos veces con DGVB<sup>2+</sup> (ver Apéndice) . Para sensibilizar los eritrocitos de carnero, se utilizó una solución de 6.22 mg de ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS) (Eastman KODAK Co.) en 7 ml de buffer de boratos por mililitro de eritrocitos. Esta mezcla se dejó agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente en un tubo cubierto de la luz. Inmediatamente después se lavaron los eritrocitos con 15 ml de buffer de boratos, se centrifugaron como se describe anteriormente y se lavaron al menos dos veces más con 30 ml de DGVB<sup>2+</sup> hasta que el sobrenadante estuviera libre de hemoglobina y TNBS.

### Hemaglutinación

Para determinar el título de hemaglutinación de la solución de anticuerpo utilizada para opsonizar a los eritrocitos, se preparó una solución al 2% de eritrocitos sensibilizados en medio de cultivo sin complementar. Se hicieron diluciones seriales 1:2 del anticuerpo partiendo de una concentración inicial de 50  $\mu\text{g}$ /pozo en 100  $\mu\text{l}$  de medio sin complementar en placas de 96 pozos con fondo en "V" y se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de glóbulos rojos para alcanzar una concentración final del 1%. La placa se dejó incubando por dos horas en una cámara húmeda hasta lograr ver la red de aglutinación en el fondo de los pozos. El título de hemaglutinación se consideró como la concentración mínima necesaria de anticuerpo para empezar a formar una red de aglutinación visible como una mancha roja, a diferencia de un botón en el fondo del pozo.

### Opsonización de eritrocitos

Una solución de eritrocitos al 1% en medio sin complementar se opsonizó mediante la incubación a temperatura ambiente por 30 minutos con la mínima concentración aglutinante de anticuerpos policlonales de conejo determinada por el ensayo de hemaglutinación. Después de la opsonización, los eritrocitos se centrifugaron con un pulso en la picofuga y se lavaron con medio sin complementar para deshacerse de la hemoglobina producto de lisis de los eritrocitos durante el tratamiento y de los anticuerpos libres que no se unieron a los eritrocitos.

### Ensayo de Fagocitosis

Las células se despegaron de la placa de cultivo resuspendiendo suavemente con una pipeta en frío. Se colectaron las células de cada tratamiento y se contaron utilizando un contador de células en suspensión (Coulter Counter T series). Aproximadamente 300,000 monocitos de cada tratamiento se colectaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron con un pulso de 10 segundos en una picofuga. Los monocitos se

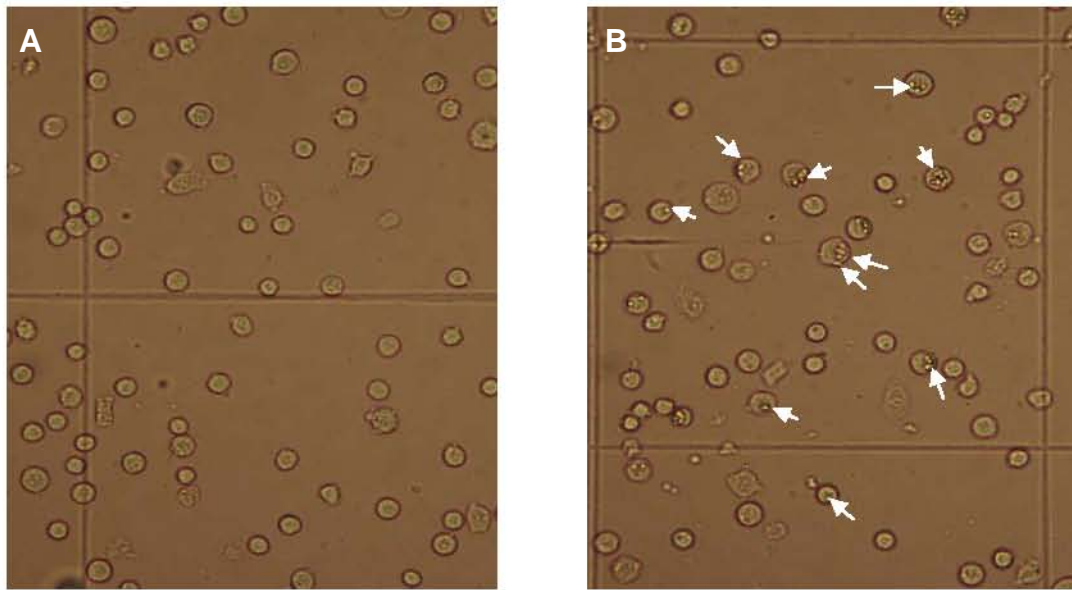
resuspendieron en 300  $\mu$ l de medio RPMI sin rojo de fenol, complementado con 10% SFB. Posteriormente se le agregó a cada tubo 75  $\mu$ l de la solución de eritrocitos opsonizados al 1% (25  $\mu$ l/100,000 monocitos). Se mezcló bien el contenido de cada tubo y después de un corto pulso de 5 segundos en la picofuga, se dejaron incubando los tubos destapados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 2 horas para las células THP-1 y 50 minutos para los monocitos de sangre periférica. En cada experimento se incluyó un control negativo con eritrocitos sensibilizados sin opsonizar. (*Figura 6*).

### Determinación de la actividad fagocítica por microscopía

Después de incubar los monocitos con los eritrocitos opsonizados se centrifugaron los tubos en una picofuga con un pulso de 10 segundos. Se descartó el sobrenadante y los eritrocitos que no fueron fagocitados se lisaron por un shock osmótico agregando 500  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada. Después de agitar rápida, pero suavemente los tubos, se centrifugaron con un pulso de 6 segundos e inmediatamente después se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500  $\mu$ l de PBS. Los monocitos se lavaron 2 veces con PBS, centrifugando con un pulso de 10 segundos entre cada lavado. Después del último lavado, se recolectó todo el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 50  $\mu$ l de PBS. Después de resuspender muy bien el pellet, se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l y se observó al microscopio. Se contaron 100 monocitos y se contó el número de eritrocitos fagocitados por cada uno con la ayuda de un hemocitómetro. Con estos datos se calculó el índice fagocítico (IF) definido como:

$$\text{Índice Fagocítico} = \frac{\text{Número de eritrocitos totales fagocitados}}{100 \text{ monocitos}}$$





*Figura 6. La fagocitosis observada es mediada por receptores Fc. A) Control de células THP-1 incubadas con eritrocitos de carnero sin opsonizar B) Células THP-1 incubadas con eritrocitos de carnero opsonizados con IgG de conejo. Los glóbulos rojos son claramente distinguibles (flechas)*

Las imágenes corresponden a células THP-1 tratadas por 48 horas con  $1 \times 10^{-7}$  M de estradiol.

### Determinación de la actividad fagocítica por ensayo colorimétrico

La determinación de fagocitosis por ensayo colorimétrico se basa en una técnica descrita por Jungi, (*Jungi TW., 1985*), en la cual se utiliza la propiedad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina de reaccionar con la 3,3 diaminobenzidina en presencia de peróxido de hidrógeno para producir un compuesto colorido que puede ser determinado a 492 nm en un lector de ELISA.

Brevemente, después de realizar los ensayos de fagocitosis y lisar los eritrocitos no ingeridos por las células fagocíticas, se resuspenden éstas en 20  $\mu$ l de PBS y se colocan en una placa de ELISA. A cada pozo se le agregan 50  $\mu$ l de una solución de SDS al 0.6% en PBS para lisar a los monocitos y liberar la hemoglobina contenida en los eritrocitos internalizados por los monocitos. Después, a cada pozo se le agregan 200  $\mu$ l de solución de revelado, compuesta por 4 mg de 3,3 diaminobenzidina (Sigma) y 20  $\mu$ l

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 10 ml de PBS. La placa se deja agitando por 30 segundos y se determina la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA (Multiscan ASCENT, Labsystems) cuando se haya producido el compuesto colorido (aproximadamente 10 minutos de incubación).

### Análisis Estadístico

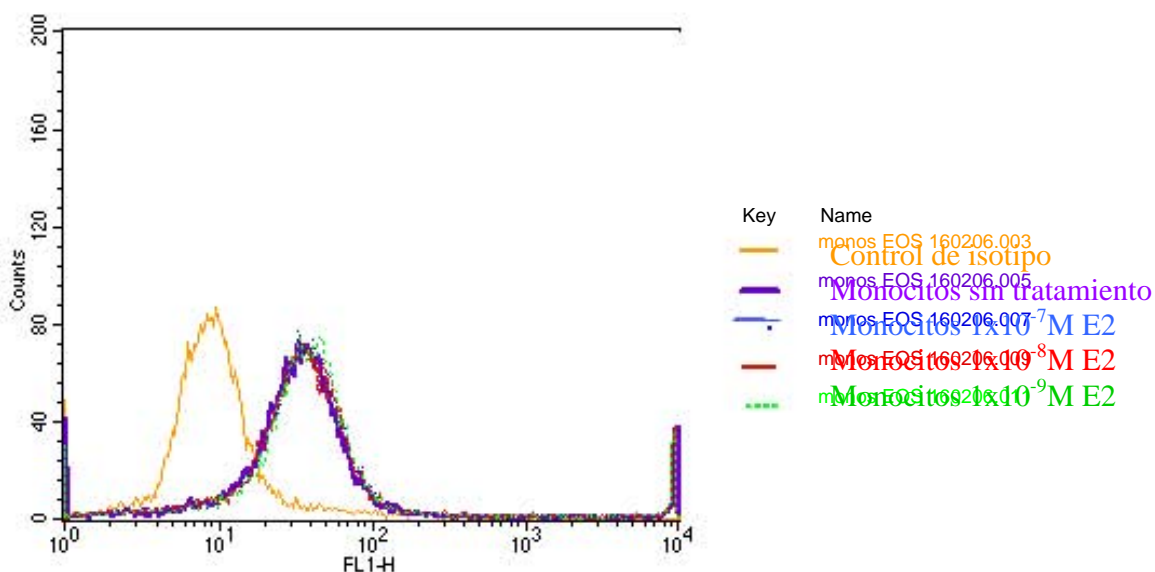
Por tratarse de un número de muestras pequeñas, se utilizó la prueba de t de Student de dos colas con una  $\alpha = 0.05$  para comparar los promedios de cada experimento al realizar el análisis estadístico. Se utilizó el programa SigmaStat 2.03 para estos fines.

# Resultados

## A) Células THP-1

### Expresión de Receptores $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RII$

Después de cultivar las células con las tres diferentes concentraciones de 17- $\beta$  estradiol durante tres distintos tiempos, se colectaron las células y se determinó la expresión de receptores  $Fc\gamma RI$  y  $RII$  a través de una tinción por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo. En la *Figura 7* se muestra un ejemplo de los histogramas de fluorescencia obtenidos mientras que en las *Figuras 8* y *9* se muestran los promedios de la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) de 5 experimentos independientes.

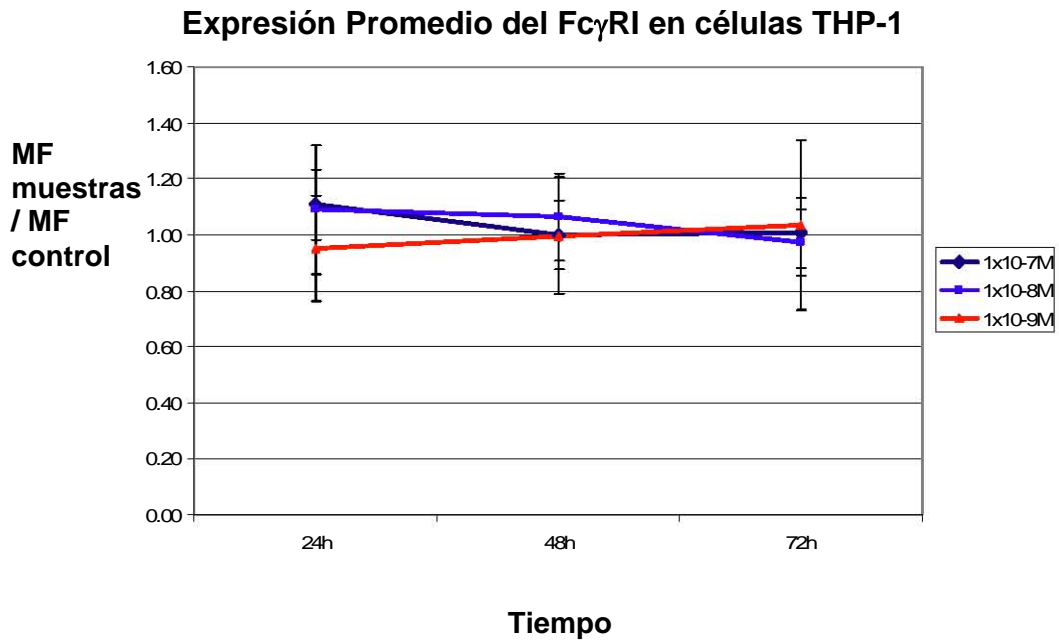


*Figura 7.* Histograma representativo de la expresión del receptor  $Fc\gamma RI$  en monocitos humanos después de 72 horas con el tratamiento con diferentes concentraciones de estradiol. No hay cambios en la expresión del receptor  $Fc\gamma RI$ . Se obtuvieron resultados similares para el receptor  $Fc\gamma RII$  en todos los tiempos probados.

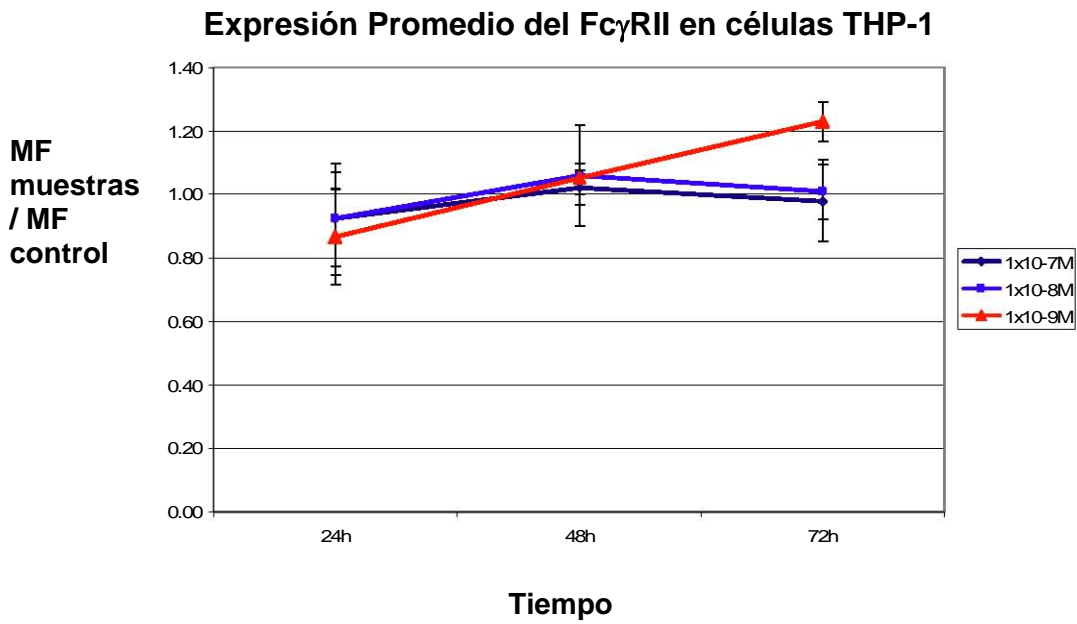
Como se puede observar en las *Figuras 8 y 9*, el estradiol no afectó de manera significativa la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI ni Fc $\gamma$ RII a ninguna de las concentraciones utilizadas. Aunque a primera vista parecería haber un aumento significativo en la expresión del receptor Fc $\gamma$ RII (*Figura 9*) después del tratamiento por 72 horas con  $1 \times 10^{-9}$ M de estradiol, este aumento es de tan sólo del 20%, lo cual probablemente es de poca significancia biológica.

#### *Fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ Rs*

Por experiencia previa en el laboratorio, se ha observado que un aumento del doble en la expresión de los receptores puede resultar en un aumento de la función de éstos hasta de 10 veces en células monocíticas, por lo cual, a pesar de no haber observado un aumento considerable en la expresión de los receptores después del tratamiento con E2, nos dimos a la tarea de estudiar si la hormona podría afectar la función de los receptores más que su expresión. Para determinar si el tratamiento con estradiol afecta una de las funciones principales de los receptores Fc $\gamma$ , la fagocitosis, se llevaron a cabo ensayos de fagocitosis como se describe en los Materiales y Métodos. Para cuantificar la fagocitosis se utilizaron dos técnicas: Determinación por microscopía, contando la cantidad de eritrocitos fagocitados por cada 100 monocitos, y determinación por ensayo colorimétrico, midiendo la actividad de pseudoperoxidasa de la hemoglobina mediante su reacción con peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina. Aunque el primer método puede ser poco sensible y algo subjetivo, ya que depende de la capacidad del ojo humano para diferenciar los eritrocitos fagocitados dentro del monocito, es un método muy confiable si además se utiliza una cámara de Neubauer para contar las células, eliminando así la subjetividad de seleccionar un campo al azar para contar. Por otro lado, el ensayo colorimétrico tiene una muy alta sensibilidad, por lo que puede haber grandes variaciones producto de las cantidades tan pequeñas necesarias para preparar la solución de diaminobenzidina en fresco cada vez que se hacía el experimento, diferencias en el número de células fagocíticas que se lisan en el tubo, etc.



*Figura 8.* Expresión del receptor Fc $\gamma$ RI en células THP-1 tratadas con diferentes concentraciones de 17- $\beta$  estradiol ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ M). La expresión de Fc $\gamma$ RI fue determinada por FACS. Se reporta la fluorescencia media (MF) normalizada contra la MF de células control no tratadas con estradiol ( $\bar{x} \pm 1$  desviación estándar).



*Figura 9.* Expresión del receptor Fc $\gamma$ RII en células THP-1 tratadas con diferentes concentraciones de 17- $\beta$  estradiol ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ M). La expresión de Fc $\gamma$ RI fue determinada por FACS. Se reporta la fluorescencia media (MF) normalizada contra la MF de células control no tratadas con estradiol ( $\bar{x} \pm 1$  desviación estándar).

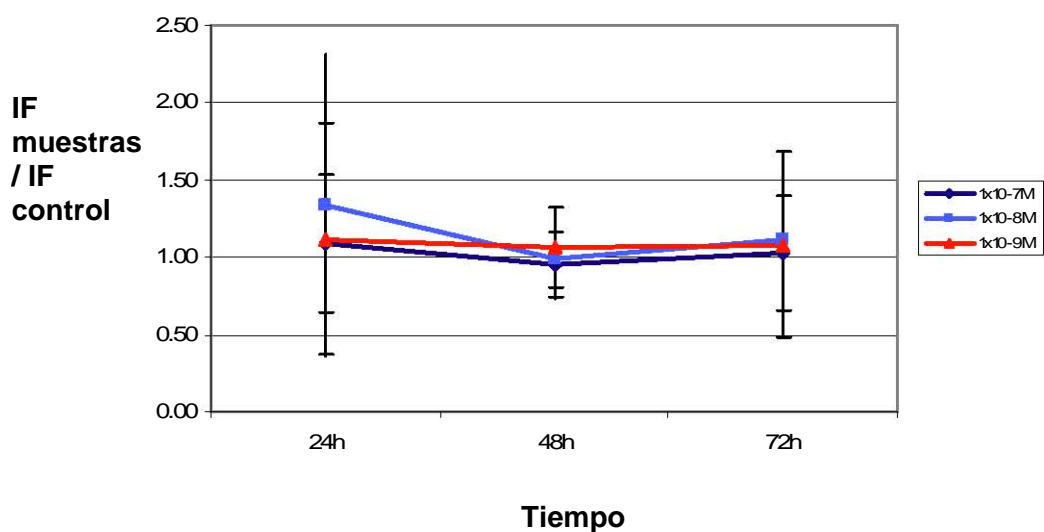
- Determinación de la actividad fagocítica por microscopía

La *Figura 10* muestra el promedio de cinco experimentos independientes realizados con células de la línea THP-1. En esta se muestra el índice fagocítico normalizado contra un control de células sin tratamiento con estradiol. Como se puede observar, no hay una diferencia significativa en la fagocitosis con ninguno de los tres diferentes tratamientos con estradiol en ninguno de los tres tiempos probados. El ligero aumento que se puede percibir a las 24 horas de tratamiento es opacado por la desviación estándar obtenida al promediar los 5 experimentos. En cada uno de los experimentos independientes se obtuvieron resultados variables, lo cual no permitió sustentar un efecto directo del estradiol sobre la fagocitosis ni establecer una tendencia clara.

- Determinación de la actividad fagocítica por ensayo colorimétrico

Al hacer la determinación de fagocitosis por el ensayo colorimétrico se observó una gran variabilidad entre los cinco experimentos independientes realizados. Esto se ve reflejado en las grandes desviaciones estándar obtenidas al hacer el promedio de los experimentos. Además, pese a haber usado las mismas muestras celulares, los resultados no necesariamente coincidían con lo observado por microscopía para cada muestra. Los resultados se muestran en la *Figura 11*. A pesar de que en el ensayo colorimétrico se aprecia un aumento hasta del 80% en la fagocitosis después de 24 horas de tratamiento, las variaciones obtenidas entre cada experimento hacen que la desviación estándar sea demasiado grande, por lo que las diferencias no son estadísticamente significativas. El hecho de que haya habido tanta variabilidad a pesar de ser las mismas células en cultivo las que se usaron para los experimentos sugieren que los resultados observados son más bien variaciones aleatorias y que el estradiol no tiene un efecto directo sobre la fagocitosis mediada por receptores Fcγ.

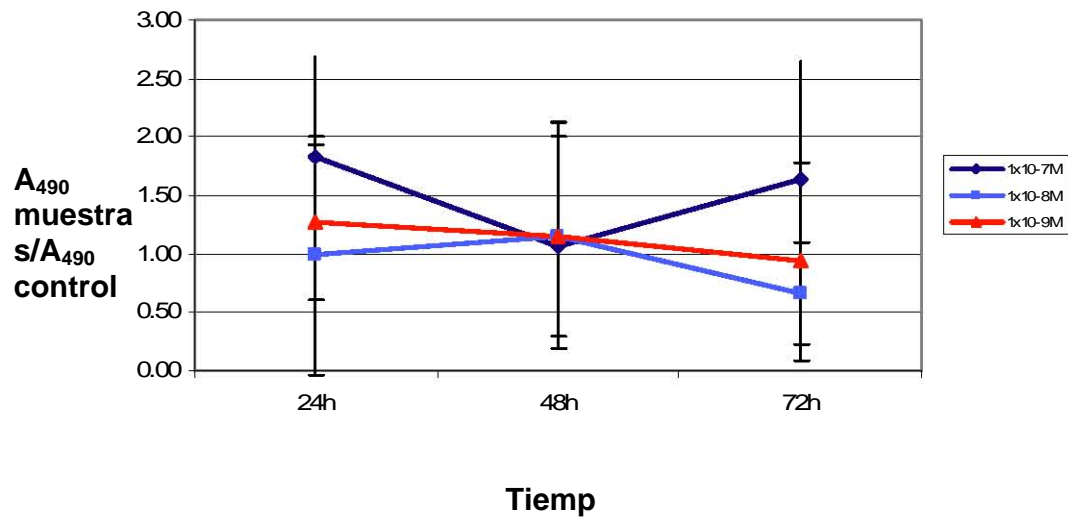
### Fagocitosis Promedio en células THP-1 por Microscopía



*Figura 10.* Determinación del índice fagocítico (IF) en células THP-1 tratadas con diferentes concentraciones de 17- $\beta$  estradiol ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ M). El IF fue determinado por microscopía contando el número de eritrocitos fagocitados por 100 monocitos. Se reporta el IF normalizado contra el IF de células control sin tratar con estradiol ( $\bar{x} \pm 1$  desviación estándar).



## Fagocitosis Promedio en células THP-1 por



*Figura 11.* Determinación del índice fagocítico en células THP-1 por ensayo colorimétrico. Los valores de absorbancia de las muestras se normalizaron comparando la absorbancia de las muestras contra la absorbancia de células control (sin tratamiento con estradiol) medidas en el mismo ensayo ( $\bar{x} \pm 1$  desviación estándar).

## ***B) Monocitos humanos aislados de sangre periférica***

Para explorar la posibilidad de que las células THP-1, al ser una línea celular mantenida en cultivo por muchos años, no fuera representativa de células normales en cuanto a su respuesta al estradiol, se realizaron experimentos en monocitos aislados de sangre periférica de 6 donadores varones sanos. Estas células fueron sometidas a los mismos tratamientos con las tres diferentes concentraciones de estradiol por los mismos períodos. Después de los tratamientos, se midió de igual manera la expresión de los receptores por FACS y la fagocitosis utilizando los dos diferentes ensayos.

### *Expresión de Receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII*

Los datos del efecto del 17- $\beta$  estradiol sobre la expresión de receptores Fc $\gamma$ Rs obtenidos de los monocitos de sangre periférica de los 6 distintos donadores se muestran en la *Figura 12*. Se puede observar que a pesar de que a las 24 horas de tratamiento hay un ligero aumento en la expresión del receptor Fc $\gamma$ RI que alcanza casi el doble de receptores en la superficie, a las 48 horas esta expresión se ve disminuida a los niveles originales y no vuelve a aumentar a las 72 horas de incubación con ninguna de las concentraciones de estradiol probada. Además la diferencia observada cae dentro de una desviación estándar, careciendo así de significancia estadística.

En cuanto a la expresión del receptor Fc $\gamma$ RII, no se aprecia ninguna diferencia entre los tres tratamientos a ninguno de los tiempos probados, como se muestra en la *Figura 13*. Estos datos sugieren que, al igual que con las células THP-1, el estradiol a los tiempos y a las concentraciones utilizadas no produjo ninguna diferencia significativa en la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI ni RII en monocitos de sangre periférica de varones humanos.

### Expresión Promedio del Fc $\gamma$ RI en Monocitos

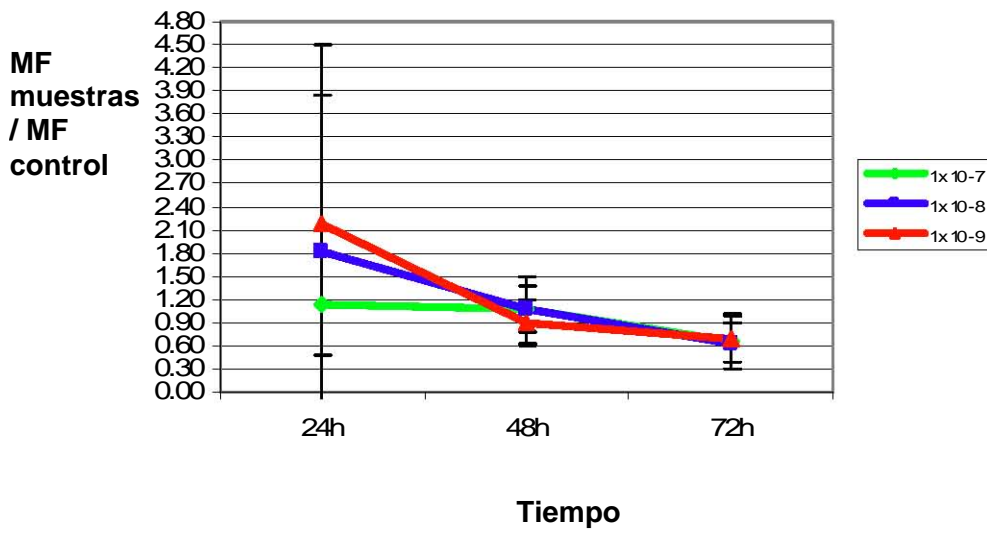
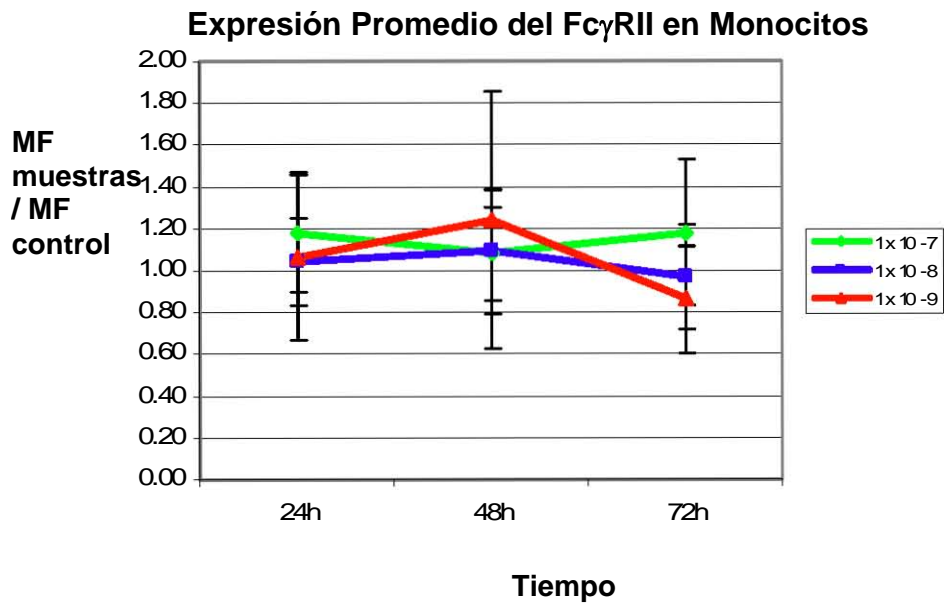


Figura 12. Expresión del receptor Fc $\gamma$ RI en monocitos de sangre periférica tratados con diferentes concentraciones de 17- $\beta$  estradiol ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ M). La expresión de Fc $\gamma$ RI fue determinada por FACS. Se reporta la fluorescencia media (MF) normalizada contra la MF de células control no tratadas con estradiol ( $\bar{x} \pm 1$  desviación estándar).



*Figura 13.* Expresión del receptor Fc $\gamma$ RII en monocitos de sangre periférica tratados con diferentes concentraciones de 17- $\beta$  estradiol ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ M). La expresión de Fc $\gamma$ RI fue determinada por FACS. Se reporta la fluorescencia media (ME) normalizada contra la MF de células control no tratadas con estradiol ( $\bar{x} \pm 1$  desviación estándar).

Se hizo un experimento independiente con monocitos humanos de sangre periférica de un donador varón sano en el cual se les dio a los monocitos un pulso de estradiol usando tres concentraciones diferentes. La expresión de los receptores se midió 7 días después para ver si había algún cambio en la expresión a largo plazo. No se encontró ninguna diferencia en la expresión de ninguno de los dos receptores como se puede observar en la *Figura 14.*

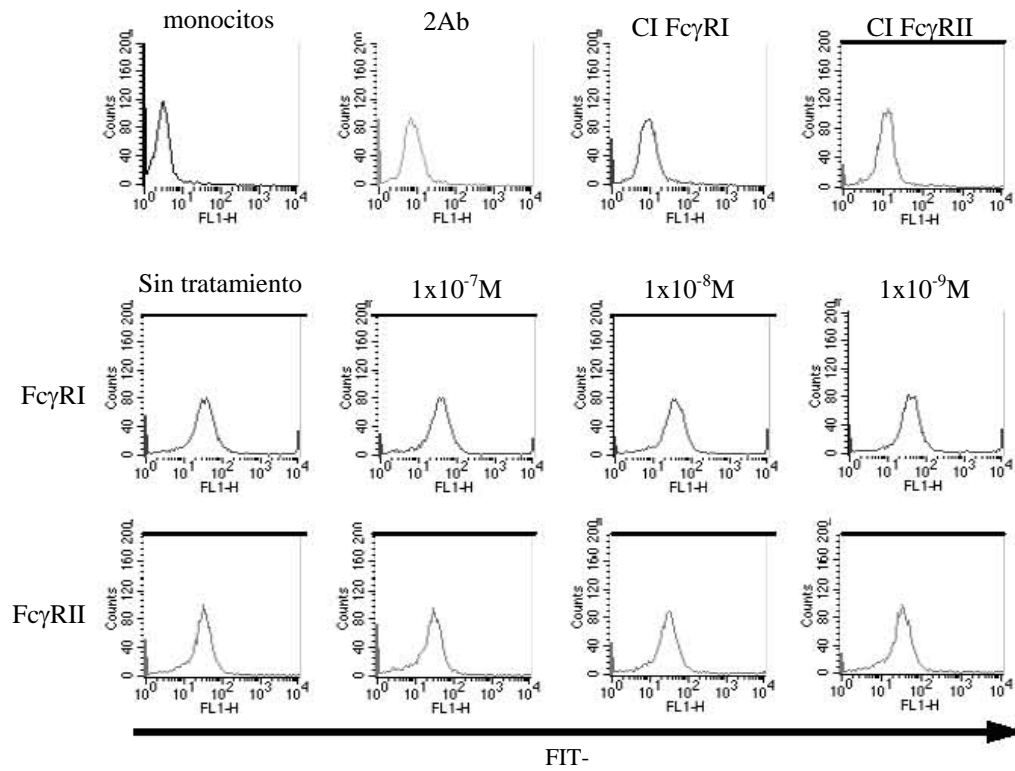
#### *Fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ Rs*

A pesar de que la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y RII no se vio afectada por los tratamientos con estradiol, se decidió hacer también ensayos de fagocitosis para tratar de elucidar si la función fagocítica estaba alterada de alguna manera en los monocitos aislados de sangre periférica.

Al igual que para las células THP-1, se llevaron a cabo dos diferentes metodologías para evaluar la capacidad fagocítica. A diferencia de las células THP-1, los monocitos humanos de sangre periférica ya han estado en contacto con citocinas, quimiocinas, hormonas y otras moléculas que están en circulación, pudiendo esto afectar su morfología y estado de activación. Los monocitos de sangre periférica tienen una capacidad fagocítica mucho mayor que las células THP-1. Es por esto que los ensayos de fagocitosis para los monocitos de sangre periférica se incubaron a 37°C por 60 minutos, a diferencia de las células THP-1 cuya incubación con los eritrocitos fue de 120 minutos. (*Figura 15*).

#### - Determinación de la actividad fagocítica por microscopía

Al contar los eritrocitos fagocitados por cada 100 monocitos, no se observó diferencia significativa entre las células control y las células tratadas con ninguna de las concentraciones de estradiol utilizadas, a ninguno de los tiempos medidos, como se puede observar en la *Figura 16*.



*Figura 14.* Expresión de receptores Fc $\gamma$ RI y RII en monocitos aislados de sangre periférica 7 días después del tratamiento con 3 diferentes concentraciones de estradiol. No hay diferencias significativas en la expresión de los receptores.



*Figura 15 . Diferencias en la función fagocítica de células THP-1 y monocitos aislados de sangre periférica tratadas con la misma concentración de E2 (24h  $1 \times 10^{-9}$  M E2).*

A) eritrocitos fagocitados (flecha) por una célula THP-1 (63X). B) eritrocitos fagocitados por un monocito aislado de sangre periférica (40X)

### Fagocitosis Promedio en Monocitos por Microscopía

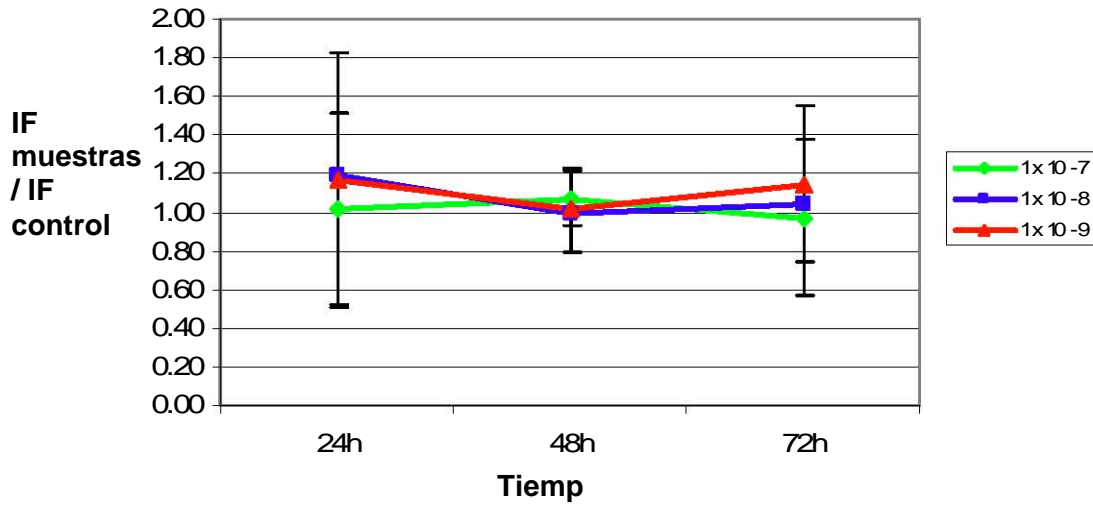


Figura 16. Determinación del índice fagocítico (IF) en monocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de 17-β estradiol ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$ M). El IF fue determinado por microscopía contando el número de eritrocitos fagocitados por 100 monocitos. Se reporta el IF normalizado contra el IF de células control sin tratar con estradiol ( ± 1 desviación estándar).



Esto concuerda con los resultados obtenidos por microscopia en las células THP-1, sugiriendo que los resultados observados reflejan que en las condiciones usadas, el 17- $\beta$  estradiol no afecta la función fagocítica mediada por los receptores Fc $\gamma$ RI y RII

- Determinación de la actividad fagocítica por ensayo colorimétrico

En la *Figura 17* se muestra el promedio de los datos obtenidos en los ensayos colorimétricos con monocitos de los 6 diferentes donadores. Aunque a las 24 horas parece haber un incremento significativo en la capacidad fagocítica de los monocitos tratados con  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-8}$  M de 17- $\beta$  estradiol, mientras que con  $1 \times 10^{-9}$  M se ve una disminución en la capacidad fagocítica, estos cambios son menores al 50%. Estos datos corroboran que el 17- $\beta$  estradiol no tiene efecto sobre la fagocitosis mediada por receptores Fc en monocitos humanos.

Al promediar y graficar los resultados obtenidos de la fagocitosis por monocitos humanos de sangre periférica, tanto los obtenidos por la determinación por microscopía como por ensayo colorimétrico, pudieron haberse enmascarado efectos del estradiol sobre las células de cada individuo. Por lo tanto, se muestran los mismos datos graficados de manera individual. *Figuras 18 y 19*. Aunque no hay diferencias significativas al promediar los datos, si existen diferencias interindividuales las cuales pueden ser producto de diferencias en la susceptibilidad al estradiol de cada donador.

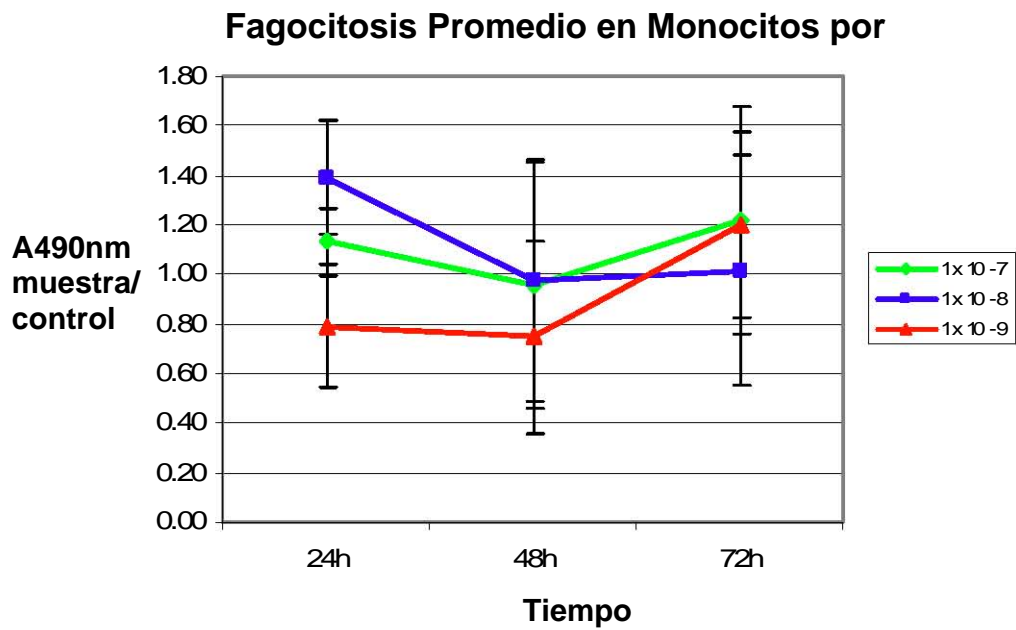
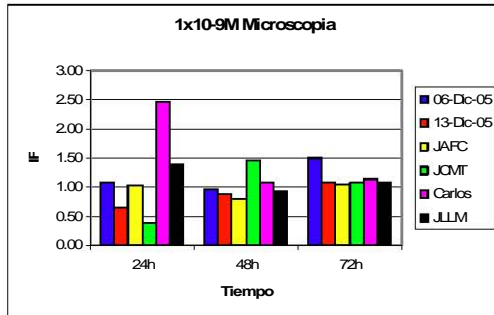
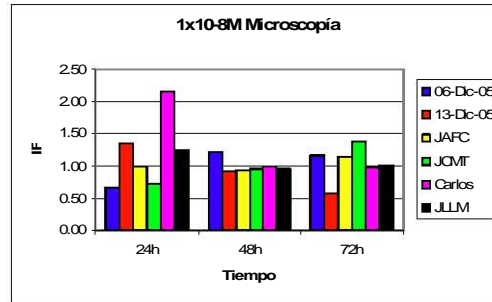
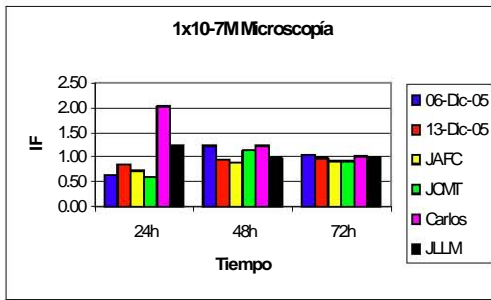


Figura 17. Determinación del índice fagocítico en monocitos humanos por ensayo colorimétrico. Los valores de absorbancia de las muestras se normalizaron comparando la absorbancia de las muestras contra la absorbancia de células control (sin tratamiento con estradiol) medidas en el mismo ensayo (1 desviación estándar).



*Figura 18 . Diferencias interindividuales reflejadas en la fagocitosis observada por microscopía.*

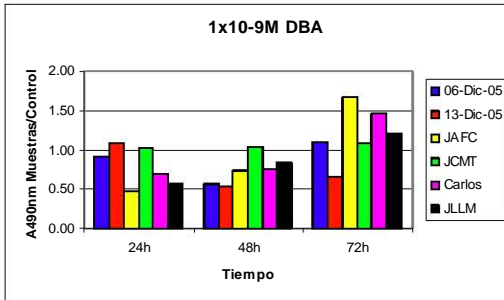
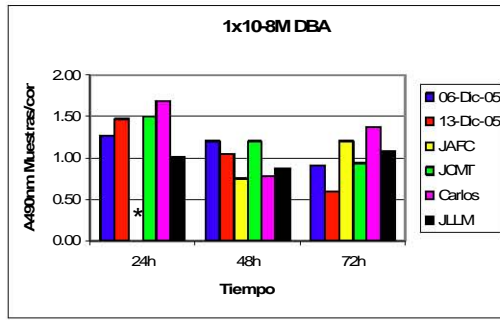
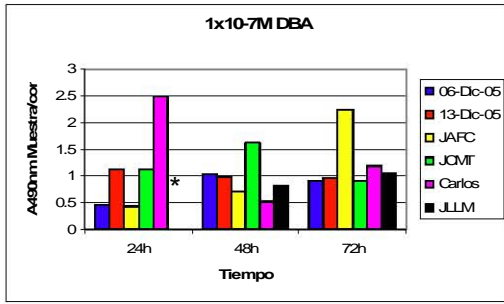


Figura 19. Diferencias interindividuales reflejadas en la fagocitosis observada por ensayo colorimétrico por diaminobenzidina.

\* No se obtuvieron suficientes células para obtener un resultado observable por ensayo colorimétrico

## Discusión

La hipótesis de este trabajo consistía en que el 17- $\beta$  estradiol podía modular la expresión o la función, medida como fagocitosis, de los Fc $\gamma$ Rs en células monocíticas humanas. Los resultados muestran que en las condiciones experimentales utilizadas, el tratamiento de células THP-1 y monocitos humanos de sangre periférica con las diferentes concentraciones de E2 no tuvo efecto estadísticamente significativo sobre la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII ni sobre la fagocitosis mediada por éstos.

A pesar de que en un modelo de cobayo se probó que el tratamiento con estradiol y otros estrógenos logró aumentar la expresión de los receptores Fc $\gamma$ , (*Gomez, et al, 2001*), y que en un modelo de ratón, los estrógenos pueden modular la expresión del receptor Fc $\gamma$ RI los resultados de nuestros experimentos muestran que no hubo ningún incremento aún después de la incubación prolongada con tres diferentes concentraciones de E2. Hubiera sido muy útil tener un control positivo de células tratadas con IFN- $\gamma$  para comparar con la expresión de los receptores después de los tratamientos con estradiol, ya que se ha demostrado que el interferón aumenta la expresión de los Fc $\gamma$ Rs en monocitos y macrófagos (*Hulett, et al, 1994*).

Una de las dificultades encontradas a lo largo de este trabajo, fue la alta variabilidad de los resultados entre experimentos. Por ejemplo, para los ensayos de fagocitosis se utilizaron dos técnicas distintas para medir la función fagocítica tanto de las células THP-1 como de los monocitos aislados de sangre periférica. Los resultados del ensayo colorimétrico por diaminobenzidina no siempre concordaron con lo observado por microscopía. Quizá puede considerarse que el ensayo por microscopía contiene un elemento de subjetividad, ya que depende de que una persona cuente el número de eritrocitos fagocitados por cada 100 monocitos y esta es una tarea tediosa que además requiere mucho tiempo, y depende del campo seleccionado en el microscopio. Dicha subjetividad fue reducida al utilizar una cámara de Neubauer y contar por cuadrantes hasta alcanzar los 100 monocitos. El hacer esto eliminó el error producido al seleccionar un campo particular por parte del observador.

Asimismo, la determinación de la fagocitosis por ensayo colorimétrico, aunque es una técnica muy sensible, brindó resultados altamente variables, ya que requiere de muchos pasos que dan lugar a varios errores humanos potenciales. Por ejemplo, la preparación en fresco de la solución de diaminobenzidina y las diminutas cantidades del reactivo que se deben pesar dan pie a un error humano considerable que lleva a variaciones en la preparación de la solución cada vez que se lleva a cabo el experimento. Además, después de incubar a los monocitos con los eritrocitos por determinado tiempo, el lavado de las células y el número de células perdido en cada lavado no siempre es igual para cada muestra y aunque se resuspenden en el mismo volumen final para hacer el experimento, el número de células por muestra es aproximado y no necesariamente igual para cada uno de los experimentos.

Además de la variabilidad inherente de los ensayos, en el caso de los monocitos aislados de sangre periférica, se introduce otra fuente de variabilidad. En los ensayos de fagocitosis por monocitos aislados de sangre periférica, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, ya que la variabilidad interindividual en cuanto a la sensibilidad a estradiol fue muy grande. Otro factor que pudo afectar los resultados es el número de donadores de los cuales se extrajeron monocitos de sangre periférica. Se trabajó con un número pequeño de muestras y es probable que la alta variabilidad enmascarara alguna diferencia real que se pudiera haber observado. Además, el número de células obtenidas de sangre periférica no alcanzó para hacer duplicados de cada experimento, haciendo difícil el interpretar los datos obtenidos.

Los niveles plasmáticos de estradiol no varían tan drásticamente en hombres como en las mujeres, pero es posible que a través del desarrollo humano, la expresión y sensibilidad de los receptores para estradiol cambie. Los donadores de los cuales se obtuvieron los monocitos no pertenecían a un grupo de edad particular, lo cual pudo haber contribuido a la alta variabilidad observada en los experimentos.

También es posible que los receptores de estradiol de células de donadores varones tengan un umbral de saturación más bajo que el de las mujeres y que las tres concentraciones de estradiol probadas sean superiores al umbral de activación óptimo. Esto daría como resultado que no se observaran diferencias entre los tratamientos con estradiol. Sin embargo, consideramos que esta posibilidad es remota, ya que se probaron

tres concentraciones de 17- $\beta$  estradiol que comprendían tres órdenes de magnitud representativos de concentraciones fisiológicas en la mujer, que aunque probablemente son diferentes que a las encontradas en el hombre, difícilmente serían 3 órdenes de magnitud menores en éste último.

En un trabajo de [Delpy, et al 2005](#), se demostró que el estradiol afecta la susceptibilidad a [Miastenia gravis autoinmune experimental en un modelo murino sólo si el animal había sido expuesto por tres semanas a la hormona antes de la inducción de la enfermedad. Esto puede sugerir que los efectos del estradiol pueden ser a largo plazo sobre algunos tipos celulares y que 72 horas de incubación quizá no sean suficientes para observar un efecto en los monocitos.](#) Sería interesante estudiar si una exposición más prolongada al estradiol tiene algún efecto sobre la expresión de los receptores Fc. En un único experimento, se cultivaron monocitos de un donador por siete días después de un pulso de estradiol a las tres diferentes concentraciones. Este tratamiento no tuvo ningún efecto sobre la expresión de los receptores. Este experimento sólo se llevó a cabo una vez con monocitos aislados de sangre periférica y no con células THP-1 y no se determinó capacidad fagocítica.

A pesar de que los resultados obtenidos de los experimentos realizados en este trabajo sugieren que no existe una correlación entre la concentración de estradiol con la cual las células son tratadas y la expresión y función de los receptores Fc $\gamma$ RI y RII tanto en células THP-1 como en monocitos humanos aislados de sangre periférica de donadores varones sanos, esto no quiere decir que, en estas condiciones, el estradiol no pueda tener efectos sobre estos receptores y algunas otras de sus funciones .

Sería una buena idea investigar si hay efectos del estradiol a más corto plazo, es decir, antes de las 24 horas, ya que hay hormonas que además de efectos a largo plazo pueden inducir cambios celulares casi inmediatos o detectables en un par de horas.

Basándonos sólo en nuestros resultados, no es posible concluir que el estradiol no tenga efecto alguno sobre los Fc $\gamma$ Rs. Por ejemplo, en este trabajo no se midió la cantidad de mensajero producida de ninguno de los dos receptores. El modo de acción del estradiol

involucra su entrada a la célula y la unión a su receptor. La actividad que este complejo, hormona-receptor, lleva a cabo es como factor de transcripción (*Cavaillès V, 2002.*). Por lo tanto, es posible que si los receptores Fc $\gamma$ RI y RII estuvieran regulados por estradiol, se produciría un incremento en la producción de RNA mensajero, aunque esto no necesariamente implique traducción y formación de la proteína. Además, existen mecanismos no genómicos por los cuales el estradiol pueda estar afectando la función de los receptores Fc que no necesariamente involucran la expresión de éstos.

Se ha reportado que el 17- $\beta$  estradiol induce directa o indirectamente la transcripción de varios genes de citocinas, así como de receptores para citocinas y otras moléculas en una variedad de tejidos.

Un efecto directo del estradiol sobre la expresión de Fc $\gamma$ Rs se reportó por *Kramer, et al (2004)*. Este estudio muestra que el estradiol, a través de una disminución del receptor Fc $\gamma$ RIIIa o CD16a, indirectamente lleva a una disminución en la producción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 en monocitos y macrófagos humanos. Por otro lado, se ha reportado que el estradiol induce la producción de TNF- $\alpha$  e IL10 en monocitos humanos tratados con PMA (*Carruba G, et al, 2003, Ghisletti, et al, 2005*). En un análisis transcripcional de citocinas en células THP-1 tratadas con estradiol se encontró que había un ligero aumento en la producción de mensajero para las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-6 dependiendo del tiempo de exposición al estrógeno (*S. Capellino, et al, 2005*). Aunque estos datos parecen ser contradictorios y confusos, ilustran que el estradiol puede tener diferentes efectos funcionales sobre células monocíticas.

Ya que en este trabajo no se midió la producción de mensajeros para citocinas, ni la secreción de éstas, no se puede descartar la posibilidad de que el estradiol esté actuando sobre esta otra función de los receptores Fc $\gamma$  en monocitos y macrófagos.

Es importante mencionar que el 17- $\beta$  estradiol es uno de tres estrógenos presentes en la circulación. A pesar de que es el más potente de los tres y casi el único responsable de la maduración del folículo en mujeres, no es el más abundante en sangre. Es posible que



el estradiol por sí mismo no tenga efecto, sino que la acción en conjunto de dos o más hormonas esteroideas sea lo que produzca un efecto apreciable.

Otro punto a considerar es el hecho de que sólo se utilizaron monocitos aislados de sangre periférica de varones, excluyendo muestras de sangre de mujeres. Este criterio se utilizó, ya que sería difícil evaluar la concentración de estradiol en sangre de donadoras femeninas al momento de la extracción de la sangre y estandarizar las condiciones para el tratamiento con estradiol *in vitro*, debido a las grandes variaciones en la concentración de estradiol en sangre dependiendo de la etapa del ciclo menstrual en la cual se encuentre cada donadora en el momento de donar.

Ha sido reportado que existen diferencias significativas en la respuesta a tratamientos con hormonas entre hombres y mujeres que padecen la misma enfermedad autoinmune. Existen diferencias relacionadas con el dimorfismo sexual que no pueden ser ignoradas (*Rider V, et al, 1998*). Aunque los monocitos de sangre periférica de varones expresan ambos receptores, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , para estradiol, es posible que estos receptores no estén activos debido al contexto androgénico en el que se encuentran o que el umbral de activación o afinidad por la hormona de estos receptores sea diferente al de las mujeres. Por estas razones, sería también interesante estudiar el efecto del estradiol sobre la expresión y función de los receptores Fc $\gamma$ RI y RII en mujeres.

Cabe mencionar que en este trabajo se midió la expresión del receptor Fc $\gamma$ RII mediante un anticuerpo monoclonal que reconoce a las isoformas Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIb, por lo que no fue posible determinar la expresión individual de cada uno de los isotipos. Estos receptores tienen funciones completamente opuestas, ya que mientras el receptor IIa contiene motivos ITAM en su región citoplásmica, el receptor IIb contiene motivos ITIM que inhiben los efectos de fosforilación de los motivos de activación ITAM. Es posible que haya habido cambios en la expresión de algún subtipo particular de receptor II que no haya sido apreciado debido a la falta de disponibilidad de un anticuerpo específico en el laboratorio que reconozca sólo a un subtipo particular del receptor II.

Los resultados obtenidos no se deben interpretar como definitivos, en cuanto a que el estradiol no tenga efecto alguno sobre los Fc $\gamma$ Rs *in vivo*. Además de lo mencionado

anteriormente, existe una limitación inherente a los experimentos *in vitro* y *ex vivo*, que es la ausencia de una matriz extracelular y otras condiciones fisiológicamente necesarias para el funcionamiento integral de las células. La falta de contacto con un epitelio, además de la falta de interacción con otras células y otras moléculas solubles en sangre, como citocinas y hormonas, puede impedir la correcta regulación de la actividad de los receptores Fc. Muy probablemente los resultados obtenidos *in vitro* no reflejen con precisión lo que ocurre *in vivo*.

Es importante mencionar que aunque este trabajo se enfocó en estudiar el efecto del estradiol sobre la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y RII en monocitos, existen muchos otros receptores que también están involucrados con los procesos desencadenados por los receptores Fc $\gamma$ . Los monocitos y macrófagos expresan otros receptores que no se consideraron en este estudio, como receptores para complemento (*Schmidt, et al, 2005*), otros receptores Fc $\gamma$  y Fc (*Pasquier, et al, 2005*), receptores tipo Toll ó TLR, entre otros. Estos otros receptores pueden ser regulados o no por el estradiol y sus funciones pueden interferir con la fagocitosis mediada por receptores Fc.

En pacientes con LES se ha demostrado que los niveles del receptor Fc $\gamma$ RII son mucho menores que en personas sanas y además es aún menores en hombres que en mujeres que padecen de esta enfermedad. (*Chang, et al 1999*). En este mismo estudio, se concluye que los altos niveles de prolactina encontrados en pacientes con LES sumado a los bajos niveles de Fc $\gamma$ RII pueden contribuir a la severidad de los síntomas y al pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.

Es importante recordar que la mayoría de las enfermedades autoinmunes son multifactoriales, y que existen tanto factores genéticos, como ciertos polimorfismos en genes para los receptores Fc $\gamma$  y otros genes aún desconocidos, que predisponen a una persona a una enfermedad. También existen factores ambientales que afectan la expresión de estos genes, además de los diferentes tipos de estrés a los cuales un individuo puede estar expuesto.

Si además consideramos que una respuesta inmunológica no sólo es el resultado de la activación de un solo tipo celular, sino que existen muchos tipos celulares involucrados,

incluyendo células que modulan la respuesta inmunológica, como las células T reguladoras, no sería sorprendente encontrar efectos del estradiol, así como de otras hormonas en otros tipos celulares.

Existe suficiente evidencia del efecto del estradiol sobre las enfermedades autoinmunes, pero los mecanismos exactos de acción de esta hormona sobre las diferentes células del sistema inmunológico y su participación en el desarrollo y mantenimiento de las enfermedades autoinmunes es aún incierto. El hecho de que en monocitos humanos no se haya observado ningún efecto directo del estradiol sobre la expresión y función de los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII, no significa que estos receptores y estas células no jueguen un papel importante en las enfermedades autoinmunes ni que otras de sus funciones no puedan ser afectadas por el estradiol u otras hormonas. Por ejemplo, se ha encontrado que otras hormonas, como la prolactina, pueden tener efectos inmunomoduladores sobre los linfocitos T y B a nivel de la expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas (*Chavez-Rueda, et al, 2005*).

Como se sugiere en el trabajo de *Delpy, et al (2005)*, es posible que el estradiol predisponga o aumente la susceptibilidad a desarrollar algún padecimiento autoinmune favoreciendo una polarización hacia una respuesta tipo Th1, más que a través de una regulación transcripcional de los Fc $\gamma$ Rs. Si es así, esta polarización podría explicar el porqué en enfermedades mediadas por anticuerpos, como LES, los síntomas se exacerban durante el embarazo, cuando la concentración de estradiol en sangre es más alta y disminuyen durante la menopausia, donde los niveles de hormonas sexuales, incluyendo el estradiol disminuyen drásticamente, pero no explicaría el por qué en pacientes con enfermedades autoinmunes mediadas por células, como la AR, sucede lo contrario, es decir, durante el embarazo los síntomas disminuyen mientras que en la menopausia se exacerban. Nuevamente, es importante recordar que las hormonas tienen un papel dicotómico, es decir, pueden inducir una respuesta tipo Th1 a cierta concentración, pero también pueden inducir una respuesta tipo Th2 a otra concentración.

## Conclusiones

El 17- $\beta$  estradiol no mostró ningún efecto sobre la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y RII en la superficie tanto de células THP-1 como de monocitos humanos aislados de sangre periférica de varones a las concentraciones probadas ni a los tiempos medidos.

El 17- $\beta$  estradiol parece no afectar significativamente la función fagocítica de células THP-1 tratadas in vitro con tres diferentes concentraciones de estradiol. Tampoco hubo ningún efecto considerable al tratar monocitos humanos de sangre periférica de donadores varones sanos con las mismas concentraciones de estradiol a los diferentes tiempos probados.

El estradiol puede estar regulando otros mecanismos en células monocíticas no necesariamente relacionados con la fagocitosis, tales como la producción y liberación de citocinas.

Es posible que el estradiol afecte de manera diferente la expresión y función de los receptores Fc $\gamma$ RI y RII en monocitos de sangre periférica de donadores femeninos.

La modulación de la expresión de los receptores Fc observada en ratón y otros modelos difiere de los resultados obtenidos de este trabajo ya que si se logran observar diferencias en la expresión de receptores Fc $\gamma$  después de los tratamientos con estradiol. Esto solamente refleja que el uso de modelos animales, aunque provee información importante acerca del funcionamiento del sistema inmune no siempre corresponde a un funcionamiento similar por parte del sistema inmune humano.

## Referencias

Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhangal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD, Cook HT. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*. 2006 Feb 16;439(7078):851-5.

Amigorena S, Bonnerot C: Fc receptor signaling and trafficking: A connection for antigen processing. *Immun Rev* 172:279–284, 1999

Bolland S. A newly discovered Fc receptor that explains IgG-isotype disparities in effector responses. *Immunity*. 2005 Jul;23(1):2-4. Review.

Bouman A, Schipper M, Heineman MJ, Faas M. 17beta-estradiol and progesterone do not influence the production of cytokines from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans. *Fertil Steril*. 2004 Oct;82 Suppl 3:1212-9.

Burshtyn DN, Yang W, Yi T, Long EO: A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* 272:13066–13072, 1997

Capellino S., B. Villaggio, P. Montagna, A. Sulli, C. Craviotto, M. Cutolo, 17beta-estradiol and testosterone influence the mRNA expression and the time course of inflammatory cytokines in activated human monocytic cell line (THP-1) *Reumatismo*, 2005; 57(3):193-196

Carruba G, D'Agostino P, Miele M, Calabro M, Barbera C, Bella GD, Milano S, Ferlazzo V, Caruso R, Rosa ML, Cocciadiferro L, Campisi I, Castagnetta L, Cillari E. Estrogen regulates cytokine production and apoptosis in PMA-differentiated, macrophage-like U937 cells. *J Cell Biochem*. 2003 Sep 1;90(1):187-96.

Cavaillès V, Estrogens and receptors: an evolving concept, *Climacteric*. 2002 Jun;5 Suppl 2:20-6.

Chang DM, Chang CC, Kuo SY, Chu SJ, Chang ML. Hormonal profiles and immunological studies of male lupus in Taiwan. *Clin Rheumatol*. 1999;18(2):158-62.

Chavez-Rueda K, Hernandez J, Zenteno E, Leanos-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol*. 2005 Aug;116(2):182-91.

Clynes R, Calvani N, Croker BP, Richards HB. Modulation of the immune response in pristane-induced lupus by expression of activation and inhibitory Fc receptors. *Clin Exp Immunol*. 2005 Aug;141(2):230-7.

Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*. 2004;13(9):635-8. Review.

Daëron, M, Fc Receptor Biology, *Annu. Rev. Immunol.* 1997. 15:203–34

De León-Nava MA, Morales-Montor J, Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2?, *Revista de Investigación Clínica*, Vol. 58 No.2, 2006. pp 161-169

Delpy L, Douin-Echinard V, Garidou L, Bruand C, Saoudi A, Guery JC. Estrogen enhances susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis by promoting type 1-polarized immune responses. *J Immunol*. 2005 Oct 15;175(8):5050-7.

Dijstelbloem HM, van de Winkel JG, Kallenberg CG. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol*. 2001 Sep;22(9):510-6. Review.

Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol*. 2005 Apr;25(8):2957-68.

Gomez F, Ruiz P, Bernal JA, Escobar M, Garcia-Egido A, Lopez-Saez JJ. Enhancement of splenic-macrophage Fc gamma receptor expression by treatment with estrogens. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Jul;8(4):806-10.

Gonzalez-Escribano MF, Aguilar F, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIIA and Fc gamma RIIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunogenet*. 2002 Aug;29(4):301-6.

Hamerman JA, Lanier LL. Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors. *Sci STKE*. 2006 Jan 31;2006(320)

Hogarth P Mark, Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity, *Current Opinion in Immunology* 2002, 14:798–802

Homo-Delarche F, Fitzpatrick F, Christeff N, Nunez EA, Bach JF, Dardenne M., Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;40(4-6):619-37. Review.

Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol*. 1994;57:1-127. Review

Isnardi I, Lesourne R, Bruhns P, Fridman WH, Cambier JC, Daeron M., Two Distinct Tyrosine-based Motifs Enable the Inhibitory Receptor Fc gamma RIIB to Cooperatively Recruit the Inositol Phosphatases SHIP1/2 and the Adapters Grb2/Grap, *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):51931-8. Epub 2004 Sep 28.

Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Shlomchik, Mark. *Immunobiology* 5<sup>th</sup> edition, New York and London: Garland Publishing; c2001

Jungi TW. A rapid and sensitive method allowing photometric determination of erythrophagocytosis by mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods*. 1985 Sep 3;82(1):141-53.

Kian Tee M, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, Cvorovic A, An J, Christy RJ, Yamamoto KR, Leitman DC., Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta. *Mol Biol Cell*. 2004 Mar;15(3):1262-72.

Kimura T, Kihara H, Bhattacharyya S, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP: Downstream signaling molecules bind to different phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) peptides of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem* 271:27962–27968, 1996

Kramer PR, Kramer SF, Guan G. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1967-75.

Lang, Thomas J., Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol*. 2004 Dec;113(3):224-30. Review.

Lewis, C.E. and J.O'D. McGee. *The Natural Immune System: the Macrophage*, IRL Press, Oxford University Press 1992, Chapter 1.p31-49

.

Matsumoto K, Watanabe N, Akikusa B, Kurasawa K, Matsumura R, Saito Y, Iwamoto I, Saito T. Fc receptor-independent development of autoimmune glomerulonephritis in lupus-prone MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum*. 2003 Feb;48(2):486-94.

McGaha TL, Sorrentino B, Ravetch JV. Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science*. 2005 Jan 28;307(5709):590-3

Merrill J., Dinu A., Lahita R., *Autoimmunity: The Female Connection*, Medscape Women's Health, Medscape Inc, 1996



Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV., FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*. 2005 Jul;23(1):41-51.

Pan L, Pei P. Signaling transduction by IgG receptors. *Chin Med J (Engl)*. 2003 Apr;116(4):487-94. Review.

Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffie C, Henin D, Benhamou M, Pretolani M, Blank U, Monteiro RC. Identification of FcαRI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcγITAM. *Immunity*. 2005 Jan;22(1):31-42.

Peeva E, Zouali M., Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett*. 2005 Nov 15;101(2):123-43. Review.

Petkova SB, Konstantinov KN, Sproule TJ, Lyons BL, Awwami MA, Roopenian DC. Human antibodies induce arthritis in mice deficient in the low-affinity inhibitory IgG receptor FcγRIIB. *J Exp Med*. 2006 Feb 20;203(2):275-80.

Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology*. 2006 May;118(1):58-65.

Radstake TR, Blom AB, Sloetjes AW, van Gorselen EO, Pesman GJ, Engelen L, Torensma R, van den Berg WB, Figdor CG, van Lent PL, Adema GJ, Barrera P. Increased FcγRII expression and aberrant tumour necrosis factor alpha production by mature dendritic cells from patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004 Dec;63(12):1556-63

Ravetch JV, Bolland S., IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-90. Review.

Rider V, Foster RT, Evans M, Suenaga R, Abdou NI. Gender differences in autoimmune diseases: estrogen increases calcineurin expression in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998 Nov;89(2):171-80.

Sanders MC, Levinson AI, Schreiber AD. Hormonal modulation of macrophage clearance of IgG-sensitized cells. *Trans Assoc Am Physicians*. 1987;100:268-75.

Sarvetnick N, Fox HS., Interferon-gamma and the sexual dimorphism of autoimmunity. *Mol Biol Med*. 1990 Aug;7(4):323-31. Review.

Salmon JE, Kimberly RP, Gibofsky A, Fotino M. Defective mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus: dissociation of Fc receptor-ligand binding and internalization. *J Immunol*. 1984 Nov;133(5):2525-31.

Schmidt RE, Gessner JE. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. *Immunol Lett*. 2005 Aug 15;100(1):56-67. Review.

Takai T., Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J Clin Immunol*. 2005 Jan;25(1):1-18. Review.

Stefanescu RN, Olferiev M, Liu Y, Pricop L. Inhibitory Fc gamma receptors: from gene to disease. *J Clin Immunol*. 2004 Jul;24(4):315-26. Review.

Szemraj J, Kawecka I, Lachowicz L, Zylinska L. Non-genomic effect of estradiol on plasma membrane calcium pump activity in vitro. *Pol J Pharmacol*. 2003 Sep-Oct;55(5):887-93.

Tan Sardjono C, Mottram PL, van de Velde NC, Powell MS, Power D, Slocombe RF, Wicks IP, Campbell IK, McKenzie SE, Brooks M, Stevenson AW, Hogarth PM. Development of spontaneous multisystem autoimmune disease and hypersensitivity to antibody-induced inflammation in Fc gamma receptor IIa-transgenic mice. *Arthritis Rheum*. 2005 Oct;52(10):3220-9.

Thomas W, Coen N, Faherty S, Flatharta CO, Harvey BJ. Estrogen induces phospholipase A2 activation through ERK1/2 to mobilize intracellular calcium in MCF-7 cells. *Steroids*. 2006 Mar;71(3):256-65. Epub 2005 Dec 22.

Tornwall J, Carey AB, Fox RI, Fox HS. Estrogen in autoimmunity: expression of estrogen receptors in thymic and autoimmune T cells. *J Gend Specif Med*. 1999 Sep-Oct;2(5):33-40.

Tridandapani S, Siefker K, Teillaud JL, Carter JE, Wewers MD, Anderson CL. Regulated expression and inhibitory function of Fc $\gamma$ RIIb in human monocytic cells. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):5082-9.

Tsuchiya N, Kyogoku C. Role of Fc $\gamma$  receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: insights from Asia. *Autoimmunity*. 2005 Aug;38(5):347-52. Review.

Vély F, Olivero S, Olcese L, Moretta A, Damen JE, Liu L, Krystal G, Cambier JC, Dae ron M, Vivier E: Differential association of phosphatases with hematopoietic coreceptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Eur J Immunol* 27:1994–2000, 1997

Villarreal J, Crosdale D, Ollier W, Hajeer A, Thomson W, Ordi J, Balada E, Villardell M, Teh LS, Poulton K. Mannose binding lectin and Fc $\gamma$ RIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Sep;40(9):1009-12.

Wines BD, Gavin A, Powell MS, Steinitz M, Buchanan RR, Mark Hogarth P: Soluble Fc $\gamma$  RIIa inhibits rheumatoid factor binding to immune complexes. *Immunology* 09:246–254, 2003

Yap SN, Phipps ME, Manivasagar M, Tan SY, Bosco JJ. Human Fc $\gamma$  receptor IIA (Fc $\gamma$ RIIA) genotyping and association with systemic lupus erythematosus (SLE) in Chinese and Malays in Malaysia. *Lupus*. 1999;8(4):305-10.

# Apéndice

## Buffer de Lavados (FACS)

100 ml PBS  
5 ml Suero Fetal Bovino  
0.1 g  $\text{NaN}_3$   
Filtrar por  $0.45\mu\text{m}$   
Guardar a  $4^\circ\text{C}$

## Paraformaldehido 1%

1g Paraformaldehido  
100 ml PBS

## DGVB2<sup>+</sup>

0.25 g gelatina  
0.23 g barbital  
12.5 g dextrosa  
2.1 g NaCl  
75  $\mu\text{l}$  1M  $\text{CaCl}_2$   
250  $\mu\text{l}$  1M  $\text{MgCl}_2$   
ajustar pH a 7.5  
llevar a 500 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada  
Filtrar por  $0.45\mu\text{m}$   
Calentar a  $45^\circ\text{C}$  para disolver la gelatina y filtrar mientras aún esta caliente

## Buffer de Boratos

0.2M ácido bórico  
0.15M NaCl  
pH 8.5

## Solución de Alsevers

10.25 g dextrosa  
2.1 g NaCl  
4 g Citrato de sodio  $2\text{H}_2\text{O}$   
0.275 g Ácido cítrico  $\text{H}_2\text{O}$   
Ajustar pH a 6.2  
Llevar a 500 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada  
Filtrar por  $0.22\mu$

**Solución de lisis (estéril) para extracción de monocitos humanos**

Stock I:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  = 16.58 g/1L  $\text{H}_2\text{O}$

Stock II:  $\text{NaHCO}_3$  = 8.4 g/1L  $\text{H}_2\text{O}$

Stock III: EDTA = 0.146 g/1L  $\text{H}_2\text{O}$

Mezclar en fresco:

5 ml Stock I

2 ml Stock II

1 ml Stock III

2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada

**Solución de lisis para determinación colorimétrica del ensayo de fagocitosis**

0.6% SDS en PBS

**Solución de revelado de fagocitosis**

4 mg 3,3' diaminobenzidina

20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$

10 ml PBS