

UCH-FC
Biotecnología
E 746



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO



**"ROL DE LAS PLAQUETAS EN LA POLARIZACIÓN
DE MACRÓFAGOS HUMANOS."**

GISSELLE SALOMÉ ESCOBAR ARREPOL

DIRECTOR DE TESIS:

Prof. Dra. Mercedes López Nitsche. Programa Disciplinario Inmunología, ICBM.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

CO-DIRECTOR DE TESIS:

MSc. Claudio Pérez. Programa Disciplinario Inmunología, ICBM. Hospital Clínico de la
Universidad de Chile.

PATROCINANTE:

Prof. Dra. María Rosa Bono. Departamento de Inmunología. Facultad de Ciencias.
Universidad de Chile.

Julio 2015
Santiago de Chile

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Gisselle Salomé Escobar Arrepol:

**"ROL DE LAS PLAQUETAS EN LA POLARIZACIÓN
DE MACRÓFAGOS HUMANOS."**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título:

Dra. Mercedes López Nitsche

Patrocinante:

Dra. María Rosa Bono

Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión:

Dr. Miguel Allende

Evaluator:

Dr. Elías Utreras





Desde la Educación Media comencé a interesarme en la Biología y como esta podría solucionar problemas relevantes para nuestra nación. Es por ello que con el fin de ingresar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile, ingresé al Programa de Bachillerato el año 2007, y a mi carrera en el año 2009.

Dentro de la Universidad conocí muchas personas que me ayudaron en el desarrollo de mi pensamiento crítico, científico y social, así como amigos y colegas con los cuales formé un vínculo que aún perdura.

En mi carrera, comencé a interesarme en el área de la salud y realicé unidades de investigación en laboratorios de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina. Posteriormente, mi interés por la ciencia aplicada me llevaron a realizar mi Tesis en el Laboratorio de Regulación e Inmunología del Cáncer con la Dra. Mercedes López, donde concluimos el proyecto y generamos nuevas preguntas para otras líneas de investigación.

A mis padres y hermanos por su entrega y apoyo
en este camino que elegí...

AGRADECIMIENTOS

A los que son parte del Laboratorio de Regulación e Inmunología del Cáncer y de Inmunología Antitumoral de la Facultad de Medicina quienes guiaron mi formación profesional, a la Profesora Mercedes López por permitirme formar parte de su equipo y ayudarme a desarrollar mi pensamiento crítico, al Profesor Claudio Pérez por ser mi tutor y amigo en este proceso.

A la Universidad de Chile y los Profesores de la Facultad de Ciencias por guiar mi formación académica y crítica.

A mi familia, colegas y amigos que me han apoyado y querido todo este tiempo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Especificos.....	12
METODOLOGÍA.....	13
1. Preparación de PRP y SRFC.....	13
2. Medición de citoquinas en el SRFC.....	13
3. Generación <i>in vitro</i> de macrófagos derivados de monocitos CD14 ⁺ humanos.....	15
4. Evaluación morfológica de los macrófagos generados mediante tinción celular.....	16
5. Evaluación de marcadores de superficie de los macrófagos generados mediante citometría de flujo.....	16
6. Estimulación <i>in vitro</i> de macrófagos usando PRP o SRFC.....	17
7. Evaluación de marcadores de superficie de macrófagos estimulados con plaquetas o SRFC.....	17
8. Evaluación de la producción de citoquinas en los macrófagos estimulados con plaquetas o SRFC.....	18
9. Análisis de datos.....	18

RESULTADOS.....	19
1. Caracterización del concentrado plaquetario utilizado para la estimulación de macrófagos.....	19
2. Generación de macrófagos <i>in vitro</i> a partir de monocitos CD14+ humanos.....	24
3. Fenotipificación mediante marcadores de superficie de macrófagos estimulados con SRFC.....	30
4. Fenotipificación mediante marcadores de superficie de macrófagos estimulados con plaquetas completas (PRP).....	32
5. Producción de citoquinas en el sobrenadante de macrófago estimulados con plaquetas o SRFC.....	34
6. Evaluación fenotípica de macrófagos al estimular con concentraciones crecientes de plaquetas.....	36
7. Evaluación de la repolarización en macrófagos proinflamatorios incubados con sobrenadante de macrófagos estimulados con plaquetas.....	39
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIÓN.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparación de la concentración plaquetaria en las dos fracciones plaquetarias recolectadas.....	20
Figura 2: Expresión de la citoquina TGF- β en las fracciones plaquetarias.....	22
Figura 3: Morfología de los monocitos y macrófagos generados <i>in vitro</i>	25
Figura 4: Expresión de marcadores de superficie en monocitos (MON) y macrófagos (M ϕ) analizados mediante citometría de flujo.....	28
Figura 5: Evaluación de marcadores de superficie en macrófagos estimulados con SRFC.....	31
Figura 6: Evaluación de marcadores de macrófagos estimulados con plaquetas completas.....	33
Figura 7: Evaluación de la producción de citoquinas en macrófagos estimulados con plaquetas o SRFC.....	35
Figura 8: Evaluación de CD206 en macrófagos estimulados con cantidades crecientes de plaqueta.....	38
Figura 9. Evaluación de marcadores de superficie en macrófagos proinflamatorios estimulados con el sobrenadante de macrófagos tratados con plaquetas.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Expresión de citoquinas en las fracciones plaquetarias.....	23
Tabla 2: Comparación de la intensidad media de fluorescencia de marcadores de superficie en monocitos (MON) y macrófagos (M ϕ).....	29

ABREVIATURAS

ACD: Ácido cítrico-citrato trisódico-dextrosa.

ACK: Amonio-cloruro-potasio

ADP: Adenosina difosfato

APC: Aloficocianina. Fluoróforo

CD11c: Cúmulo de diferenciación 11c. Integrina α_x .

CD14: Cúmulo de diferenciación 14. Co-receptor de LPS

CD32: Cúmulo de diferenciación 32. Receptor Fc

CD68: Cúmulo de diferenciación 68. Ligando de proteínas de baja densidad

CD80: Cúmulo de diferenciación 80. Molécula coestimuladora B7.1, ligando de CD28

CD86: Cúmulo de diferenciación 86. Molécula coestimuladora B7.2, ligando de CD28

CD163: Cúmulo de diferenciación 163. Receptor scavenger haptoglobina-hemoglobina

CD206: Cúmulo de diferenciación 206. Receptor de manosa

CREB: Elemento de unión respuesta a AMPc

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

EMR1: Receptor tipo mucina del factor de crecimiento epidermal

ERK: Quinasa reguladora de señal extracelular

FITC: Isotiocianato de fluoresceína. Fluoróforo

HLA: Antígeno leucocitarios humanos

HRP: Peroxidasa de rábano. Enzima para detección en ELISA

IL: Interleuquina

INF- γ : Interferón gamma

iNOS: Óxido nítrico sintasa

JNK: Quinasas c-jun N-terminal

LPS: Lipopolisacárido

MCS-F: Factor estimulante de colonia de macrófagos. Citoquina

MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad de clase II

NF- κ B: Factor nuclear κ B

PAF: Factor de agregación plaquetaria

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: Célula mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: Ficoeritrina. Fluoróforo

PE-Cy5: Estreptavidina. Fluoróforo

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PRP: Plasma rico en plaquetas

RCF: Fuerza centrífuga relativa

RPM: Revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

SRFC: Suero rico en factores de crecimiento.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta. Citoquina

T_H2: Linfocitos T helper tipo 2

TLR: Receptor tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

RESUMEN

Antecedentes y objetivo: Los macrófagos son células altamente plásticas que al activarse pueden polarizar hacia dos perfiles establecidos, clásico o alternativo. La activación clásica, genera macrófagos proinflamatorios. Estas células son eficientes en defender al organismo contra infecciones y agentes extraños. La activación alternativa por el contrario, genera macrófagos reparadores, los cuales participan en los procesos fisiológicos de mantención tisular y en ciertas patologías como desórdenes vasculares y cáncer. Las plaquetas, por su parte, son fragmentos celulares que participan en procesos de inflamación y de reparación tisular. Su activación libera diversas moléculas que favorecen la diferenciación de monocitos a macrófagos no polarizados. Sin embargo, se desconoce su efecto en la polarización de macrófagos. Conocer los mecanismos de interacción entre plaquetas y macrófagos, dos actores fundamentales, por ejemplo, en la progresión del cáncer, nos permitiría modular el nicho tumoral. Es por estas razones que nuestro trabajo se enfoca en el estudio del rol de las plaquetas en la polarización de macrófagos.

Metodología: A partir de donantes sanos de Banco de Sangre, se obtuvo Plasma Rico en Plaquetas (PRP) o Suero Rico en Factores de Crecimiento (SRFC) (derivado de la activación del PRP con cloruro de calcio). Se midió la concentración de plaquetas en el PRP y el contenido de citoquinas presente en el SRFC. Paralelamente, se cultivaron monocitos CD14+ purificados mediante "rosetas" en medio RPMI/ SFB/ M-CSF durante siete días. Luego, las células fueron cosechadas y caracterizadas morfológica y

fenotípicamente por microscopía óptica y citometría de flujo, respectivamente. Por último, los macrófagos generados fueron estimulados durante 24 hrs. con SRFC o plaquetas completas (PRP), y se realizó una caracterización fenotípica mediante citometría de flujo y se midió la producción de citoquinas mediante ELISA.

Resultados: Los macrófagos generados a partir de monocitos humanos, presentaron una morfología típica y expresaron los marcadores clásicos del linaje monocito-macrófago CD11c, CD14 y CD32. La estimulación de estos macrófagos no polarizados con SRFC, que contiene una alta concentración de TGF- β , no generó diferencias significativas en la expresión de los marcadores CD206, CD163 y CD86 o en la producción de citoquinas en comparación al control no estimulado. En contraste, ante la estimulación de macrófagos con PRP (plaquetas integras) se encontró un aumento en la expresión del receptor de manosa CD206 y en los niveles de IL-10, en relación al control sin estimulación. Tanto CD206 como IL-10, son marcadores característicos del perfil reparador o alternativamente activado.

Conclusión: Las plaquetas integras inducen la polarización de macrófagos hacia un fenotipo reparador (protumoral). Nuestra proyección es establecer si en un microambiente tumoral existe una interacción entre plaquetas y macrófagos que promueva el desarrollo y la propagación del tumor.

ABSTRACT

Background and objective: Macrophages are highly plastic cells which when activated can polarize towards two established profiles, classical or alternative. The conventional polarization generates proinflammatory macrophages. These cells are efficient in defending organism against infections foreign agents. The alternative activation on the contrary, generates macrophages involved in repair and related to physiological processes of tissue maintenance and diseases such a vascular disorder and cancer. The platelets on their behalf are cellular fragments and participate in inflammatory processes and tissue regeneration. Their activation releases several molecules that promote differentiation of blood monocytes into non-polarized macrophages. However, it is unclear if platelets play a role in the process of macrophage polarization. Understanding the mechanisms by which platelets and macrophages interact, two key players, for example, of tumor progression, would allow us to modulate the tumoral niche. It is for these reasons that our work focuses in the study of the platelets role on non-polarized macrophages.

Methodology: From healthy donors of Blood Bank, it was obtained Platelet Rich Plasma (PRP) and Rich Serum Growth Factors (SRFC) (PRP derivated from the activation with calcium chloride). We measured the platelet concentration in PRP and the cytokine content in SRFC. Simultaneously, CD14⁺ monocytes purified by "Rosettes" were cultured in RPMI / SFB/ M-CSF for seven days. Then, cells were harvested and characterized morphologically and phenotypically by light microscopy

and flow cytometry, respectively. Finally, macrophages were stimulated for 24 h. using SRFC or whole platelets (PRP), and a phenotypically characterized by measuring surface markers and cytokine production by ELISA.

Results: The human monocyte derivated macrophages presented a typical morphology and expressed the classic markers of macrophage-monocyte, i.e. CD11c, CD14 and CD32. Stimulation of these non-polarized macrophages with SRFC, which has a high concentration of TGF- β , did not generate statistically significant differences in the expression of CD206, CD163 and CD86 markers, neither in the cytokine production, compared to unstimulated macrophage. In contrast, upon stimulation of macrophages with PRP (whole platelets) we found an increase in the mannose receptor CD206 expression and in the IL-10 levels compared to the non-stimulated control. Both IL-10 and CD206 are characteristic of the repairing or alternative activated phenotype.

Conclusions: Whole platelets induce macrophage polarization towards a repair phenotype (protumoral). Our project is to establish wether there is an interaction between platelets and macrophages in the tumor microenviroment that promote development and spread of the tumor.

INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son fragmentos celulares que participan en procesos de inflamación y reparación tisular. Estas contienen moléculas que favorecen la diferenciación de monocitos sanguíneos a macrófagos [Ammon y col., 1998]. Sin embargo, no está claro si las plaquetas cumplen un rol en el proceso de activación que puede generar macrófagos con un perfil inflamatorio o reparador. La polarización de macrófagos ocurre por estímulos y mecanismos diferentes, capacitándolos para desarrollar una respuesta inmune acorde a su estado de activación [Ammon y col., 1998]. Dado que, plaquetas y macrófagos, participan en los procesos de reparación tisular, esta investigación ayudaría a entender de qué manera su interacción podría favorecer o revertir un microambiente tolerante que propicie la mantención y progresión de enfermedades como el cáncer.

Ontogenia y función del Macrófago

Los macrófagos son células fagocíticas del sistema inmune innato que se generan a partir de monocitos circulantes provenientes de la médula ósea. La transformación del monocito en macrófago y su posterior activación incluye cambios morfológicos, fisiológicos y funcionales que permiten detectar y responder frente a señales que no se encuentran normalmente en tejidos sanos [Geissmann, 2000]. La expresión de ciertos receptores es crucial para el reconocimiento de estas señales. Por ejemplo, el receptor scavenger y los TLR se unen a DAMPs presentes en células apoptóticas y necróticas, o

PAMPs, expresados en microorganismos [Erwig y Henson, 2008 ; Hajishengallis y Lambris,2011].

Morfológicamente, los monocitos presentan un núcleo contorneado de gran proporción en la célula, y numerosos gránulos finos que contienen enzimas lisosomales, peroxidasa, esterasas y lisozimas. La cromatina es viscosa o con forma de encaje resaltando la leve inmadurez del leucocito [Rodak y col., 2011]. Una vez en el tejido, los monocitos se pueden diferenciar hacia macrófagos dependiendo del microambiente. Estas últimas presentan un mayor tamaño, 2 a 4 veces mayor que los monocitos, tienen núcleo circular, a menudo con nucléolos, y un patrón de cromatina reticular. También, los macrófagos presentan un citoplasma abundante con gran cantidad de gránulos, vacuolas y restos de células fagocitadas [Rodak y col., 2011].

Además de la morfología, los macrófagos son distinguidos de otros tipos celulares por la expresión de diversos marcadores de superficie de membrana como CD68, EMR1, CD11c, receptores Fc y CD14 [Ammony col., 2000; Khazen y M'bika, 2005]. Siendo este último un marcador de linaje de monocitos que disminuye en macrófagos. Sin embargo, ninguno de estos es específico para la población estudiada, por lo que a menudo es necesario generar un panel de marcadores para caracterizar los macrófagos utilizados.

En los tejidos, los fagocitos conocidos como macrófagos responden a diversas señales (como productos microbianos, productos de daño celular y diversas citoquinas provenientes de linfocitos activados) activándose y adquiriendo distintos fenotipos

funcionales. En respuesta a estas señales, los macrófagos cambian su morfología retrayendo sus prolongaciones y expresando en su superficie distintos marcadores. Esta activación puede ser clasificada en; activación clásica, asociada a la inflamación aguda, y alternativa, relacionada con la reparación tisular. Esta polarización está determinada por la activación de distintas vías de transducción de señales como NF- κ B, JNK, ERK, p38 y CREB. Mientras estímulos proinflamatorios como LPS y citoquinas inflamatorias polarizan al macrófago hacia un fenotipo inflamatorio, la presencia de citoquinas antiinflamatorias, polarizan al macrófago hacia un fenotipo reparador [Murray y Wynn, 2011].

Macrófagos de tipo inflamatorio

Los macrófagos de tipo inflamatorio participan en la defensa contra diversas bacterias, protozoos y virus, y presentan un rol en la inmunidad antitumoral [Murray y Wynn, 2011]. La población de macrófagos inflamatorios se obtiene cuando la activación es inducida por IFN- γ o LPS [Mantovani y col., 2013]. Se ha descrito que IFN- γ en conjunto con LPS induce en los macrófagos el incremento de la capacidad presentadora de antígenos y diversos mecanismos que permiten la destrucción de patógenos, como: la liberación de enzimas lisosomales, la producción de citoquinas proinflamatorias, la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y el aumento de óxido nítrico producido por la enzima iNOS [Martínez y col., 2009; Davis y col., 2013]. Además, la estimulación de macrófagos con LPS permite la secreción del TNF- α , una citoquina involucrada en la inflamación y la respuesta inmune anti-tumoral, cuya producción es potenciada con IFN- γ [Maja y Sandford, 1992; Hasan y col., 2012]. Cabe destacar que,

la activación de TLR4 mediante LPS también permite regular la respuesta inflamatoria mediante la producción de IL-10, una potente citoquina anti-inflamatoria [Iyer y col., 2010].

Los macrófagos inflamatorios expresan proteínas de superficie de membrana que permiten su identificación, tales como CD86, CD80 y MHC-II [Re-Giraud y col., 2012]. Otros marcadores que aumentan su expresión en estos macrófagos son los genes que codifican para la indolamina-pirrol 2 dioxigenasa e iNOS [Mackaness, 1964].

Macrófagos de tipo reparador

Los macrófagos de tipo reparador se generan a partir de la activación alternativa de macrófagos y poseen funciones relacionadas a la remodelación, reparación y cicatrización de tejido [Mantovani y col., 2013]. Dicha activación ocurre por diferentes estímulos originando subpoblaciones de macrófagos reparadores, M2a, M2b y M2c. Los macrófagos M2a se obtienen *in vitro* al inducirlos con la citoquina IL-4 o IL-13. Los macrófagos M2b son inducidos *in vitro* por complejos inmunes, LPS e IL-1ra. Por último, los macrófagos M2c se obtienen *in vitro* al estimular con las citoquinas IL-10 o el factor de crecimiento TGF- β [Mantovani y col., 2004]. La expresión de marcadores de diferenciación de macrófagos reparadores permite la identificación de cada subtipo. Mientras que la subpoblación M2a expresa combinadamente los marcadores CD206, CD163 (receptor scavenger) y Arginasa 1 [Villalta y col., 2009]; la subpoblación M2b se identifica por la presencia de MHC-II, CD86 y CD163; y la subpoblación M2c por los marcadores Arginasa 1, CD163, CD206, TLR4 y TLR8 [Gordon y Taylor, 2005].

En general, los macrófagos de tipo reparador expresan marcadores comunes como el receptor scavenger CD163, el receptor de manosa CD206 y la citoquina IL-10, que le permiten participar en la eliminación de parásitos, la remodelación de tejidos y la inmunosupresión [Hao y col., 2012]. La citoquina IL-10 expresada por macrófagos reparadores, promueve la producción de IL-4 por las células T_H2 y la cicatrización de heridas, ya que puede activar la arginasa 1, lo que contribuye a la producción de matriz extracelular [Corraliza y col., 1995; Mantovani y col., 2009].

Además de los marcadores de superficie, los macrófagos reparadores se pueden distinguir de los macrófagos inflamatorios mediante el metabolismo diferencial de L-arginina. Macrófagos inflamatorios regulan el aumento de iNOS para catabolizar L-arginina a óxido nítrico y citrulina, mientras que los macrófagos reparadores inducen la arginasa 1 que metaboliza arginina a ornitina y poliaminas, precursores necesarios para la síntesis de colágeno y la proliferación celular [Odegaard y Chawla, 2008].

Interesantemente, el macrófago de perfil reparador se ha visto asociado a la progresión de diversos cánceres. Esto se debe a que promueve un microambiente tolerante para el crecimiento del tumor. Secretan citoquinas y proteasas que promueven la angiogénesis, el crecimiento, metástasis e inmunosupresión [Hao y col., 2012; Mantovani y col., 2002]. Además, estudios demuestran que en cáncer de mama se producen citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , que polarizan los macrófagos de tipo inflamatorio a reparador, evadiendo así la respuesta inmunológica y favoreciendo la inmunosupresión en el nicho tumoral [Sica y col., 2008].

Estructura y rol de las Plaquetas

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos pequeños de aproximadamente 2 μm . de diámetro derivados de la fragmentación de células precursoras megacariocitos, las cuales forman parte del tejido hemocitopoyético de la médula ósea [Semple y col., 2011]. Están formadas por una membrana de fosfolípidos que es cubierta con glicoproteínas e integrinas esenciales para los procesos de adhesión, agregación y activación plaquetaria. Las glicoproteínas conectadas forman el glucocálix que contiene múltiples proteínas integrales provenientes del plasma, entre ellas se encuentran los antígenos ABO de la plaqueta y el linfocito humano (HLA), los receptores de trombina, adrenalina, el factor de von Willebrand, ADP y PAF [Fristma, 1988]. En el citosol contienen tres tipos de gránulos: 1) gránulos densos, que contienen agonistas de plaquetas tales como serotonina y ADP que amplifican la activación plaquetaria; 2) gránulos α , que contienen proteínas para potenciar los procesos de activación y coagulación, principalmente: el factor 4 plaquetario, PDGF, la fibronectina, el fibrinógeno, los factores de la coagulación y la citoquina TGF- β , donde este último se encarga de estimular el depósito de matriz extracelular; y 3) gránulos lisosomales, que contienen glicosidasas y proteasas [Semple y col., 2011].

Las plaquetas regulan la hemostasia, iniciando la formación de coágulos y trombos, y son una fuente natural de factores de crecimiento [Semple y col., 2011]. Su mecanismo de acción ocurre en tres pasos, el fenómeno de adhesión, activación y agregación plaquetaria. La adhesión plaquetaria comienza sobre la ruptura del vaso a través del colágeno expuesto. Luego en la activación, ocurre la fijación del colágeno, la

formación de trombina y de receptores de glicoproteínas como GPIIb/IIIa. El fibrinógeno y otras proteínas adhesivas se unen a este receptor glicoproteico generando el tercer paso, el fenómeno de agregación plaquetaria. En este último paso se requiere de actividad metabólica celular y se liberan sustancias desde los gránulos plaquetarios, en un proceso facilitado por los fosfolípidos de membrana [Heemkerk y col., 2013].

Para promover su función, las plaquetas reclutan leucocitos y células progenitoras a los sitios de daño y trombosis. Además, almacenan, producen y liberan factores proinflamatorios, anti-inflamatorios y angiogénicos a la circulación, lo que estimula la generación de trombina [Smyth y McEver, 2009].

Plaquetas y el sistema inmune

Además de la función primaria de las plaquetas en la hemostasia y trombosis, las plaquetas influyen en los procesos de inflamación y reparación, manteniendo la integridad vascular y la cicatrización de heridas. La regulación de estos procesos se logra gracias a la expresión de receptores inmunológicos y de adhesión en las plaquetas, y por la liberación de mediadores inflamatorios que favorecen el reclutamiento de macrófagos y otros leucocitos a los sitios de daño [Smyth y col., 2009]. Al mismo tiempo, las plaquetas poseen un sistema canicular abierto, que en conjunto con receptores de reconocimiento especializados, contribuyen a la endocitosis de componentes séricos, de antígenos e incluso de patógenos, lo que favorece la respuesta inmune [Li y col., 2012; Von Hundelshausen y Weber, 2007].

Luego de la inflamación ocurre la cicatrización de tejido, que comienza con un aumento en el número de fibroblastos y macrófagos reparadores, mientras la cantidad de neutrófilos decrece. Se termina la producción de mediadores inflamatorios y los presentes se inactivan o son eliminados por difusión y macrófagos reparadores [Steed, 1997]. Así, en el área de daño permanecen sustancias que promueven el reclutamiento, crecimiento y morfogénesis de células, que corresponden a citoquinas, factores de crecimiento u otras sustancias liberadas o presentes en la superficie de plaquetas activadas [Nurden y col., 2008].

Dada la participación de las plaquetas en los procesos de cicatrización de tejido, el uso terapéutico de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas está muy extendido. Entre sus usos clínicos se encuentran: regeneración de hueso en odontología y cirugía maxilofacial, cirugía cosmética, cicatrización de heridas en úlceras, cirugía ortopédica, reparación de tendones y ligamentos, regeneración nervio-facial, etc. [Nurden y col., 2008]. Para ello se utilizan preparados autólogos como PRP, un concentrado plaquetario, o SRFC, que corresponde al sobrenadante derivado de las plaquetas activadas en el PRP [Nurden y col., 2008]. Cabe destacar que los efectos terapéuticos obtenidos del uso de PRP y SRFC se deben principalmente a los factores de crecimiento, mencionados anteriormente, PDGF y TGF- β , donde este último participa de la regeneración de tejido conectivo y hueso, estimula la deposición de matriz de colágeno y tiene propiedades anti-inflamatorias que favorecen sus efectos [Marx y col., 1998].

Por otro lado, se han asociado las plaquetas con la progresión tumoral en diversos tipos de cáncer, y el uso de antiplaquetarios ha sido reportado como un tratamiento efectivo en algunos tipos de neoplasias [Smyth y col., 2009]. Reportes recientes vinculan la inhibición de la activación plaquetaria con una respuesta inmune antitumoral más efectiva [Gay y Felding-Habermann, 2011]. Estudios indican que puede deberse a que las plaquetas:

1. Secretan factores que promueven el crecimiento tumoral y la angiogénesis.
2. Potencian la adhesión de las células tumorales al endotelio facilitando la extravasación.
3. Rodean a las células tumorales protegiéndolas de la inmunovigilancia [Goubran y col., 2014].

Entre los factores de crecimiento derivados de las plaquetas que favorecen la progresión del cáncer se encuentra TGF- β , una citoquina de propiedades inmunosupresoras que altera la respuesta de linfocitos T transformándolos en linfocitos T reguladores [Goubran y col., 2014]. Interesantemente, muchos estudios apuntan a que TGF- β además de promover la angiogénesis, estimula la liberación de metaloproteinasas en células de melanoma humano, lo que favorecería la generación de metástasis. Resultados similares han sido reportados para otros cánceres como cáncer de mama, carcinoma de próstata y sarcoma de Kaposi [Mantovani y col., 2009].

Interacción plaqueta - macrófagos

Estudios muestran que las plaquetas activadas son capaces de participar en la diferenciación de monocitos hacia macrófagos [Ammon y col., 1998; Passacuale y col., 2011]. También hay estudios que muestran que los macrófagos aumentan la fagocitosis de plaquetas activadas vía el receptor scavenger, aumentando la secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS. Este efecto proinflamatorio puede prevenirse artificialmente tratando las plaquetas con dexametasona [Skull y col., 2010]. Otros estudios muestran que en la formación de placas de ateroma en humanos, existe una relación entre la activación plaquetaria y las lipoproteínas de baja densidad [Aviram y Brook, 1987], afectando el ingreso de lipoproteínas al macrófago, lo que provoca un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias [Persson y col., 2006]. Por otro lado, también se ha visto un efecto de los macrófagos sobre las plaquetas. Por ejemplo, la producción de PAF por parte de los macrófagos, que origina la agregación / degranulación plaquetaria, e induce la inflamación y cambios en la permeabilidad del epitelio [Menica-Huerta y col., 1978].

Presentación del problema a estudiar

Estos antecedentes muestran que tanto plaquetas como macrófagos participan en los procesos de inflamación y reparación de tejido. Y si bien se ha visto una interacción entre plaquetas y macrófagos para promover la respuesta inflamatoria, esta ha sido en tiempos reducidos (inferiores a 1 hr.) y en presencia de antígenos como LPS [Skull y col., 2010]. Por tanto, aún no ha sido establecido el fenotipo, el perfil inmunológico y la

función de los macrófagos al ser estimulados con SRFC derivado de plaquetas o de una interacción directa con la plaqueta. En este proyecto, pretendemos definir si las plaquetas son capaces de polarizar a los macrófagos y establecer el rol inmunológico potencial que cumple esta interacción.

En diversos trabajos se ha establecido separadamente la contribución de macrófagos de perfil reparador y de plaquetas en el desarrollo de diferentes fenómenos incluidos los procesos tumorales como la angiogénesis, el crecimiento tumoral, metástasis, inmunosupresión y el remodelamiento tisular. Sin embargo, la comunicación celular y los mecanismos de cómo estas células pudiesen relacionarse para favorecer determinados fenómenos no es bien conocida. Este proyecto es una primera aproximación para establecer si existe una comunicación entre plaquetas y macrófagos, que permita comprender de qué manera interactúan en el nicho tumoral favoreciendo un microambiente tolerante que propicie la mantención y propagación del tumor.

En particular, y dado que tanto plaquetas como macrófagos están asociados a la progresión tumoral, al favorecer la respuesta de tipo anti-inflamatoria o reparadora, creemos que las plaquetas podrían inducir a los macrófago hacia un perfil de tipo reparador.

Hipótesis

“Las plaquetas dirigen la polarización de macrófagos humanos hacia un perfil fenotípico reparador o protumoral”

Objetivo General

Estudiar la participación de las plaquetas en la activación y polarización de macrófagos hacia perfiles reparadores o “protumorales” que favorezcan el desarrollo de tumores.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el concentrado plaquetario utilizado para la estimulación de macrófagos.
2. Evaluar fenotípicamente el perfil de macrófagos al estimular con SRFC derivado de plaquetas.
3. Evaluar fenotípicamente el perfil de macrófagos al estimular con plaquetas completas.



METODOLOGÍA

1. Preparación de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y Suero Rico en Factores de Crecimiento (SRFC).

20 ml de sangre obtenida de donantes sanos de Banco de Sangre fue utilizada para preparar el PRP. La sangre fue depositada en tubos de 4 ml que contienen 1,5 ml de ACD (citrato de trisodio 22 g/l, ácido cítrico 8 g/l y dextrosa 24,5 g/l) como antiagregante plaquetario. Los tubos fueron centrifugados a 100 x g durante 5 minutos. Se obtuvieron 3 fracciones en el tubo, las cuales correspondían a Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), PRP y células sanguíneas. Se recuperaron las fracciones de PPP y PRP separadamente, y se midió la concentración de plaquetas mediante un hemocitómetro. Posteriormente, ambas fracciones fueron activadas con 50 µl de cloruro de calcio al 10 % por cada 1 ml de PRP o PPP. Luego de 10 minutos se formó un coágulo (trombo) y se esperó por otros 20 minutos para obtener la retracción del coágulo. A continuación, se centrifugó a 2000 x g y se recolectó el sobrenadante del PRP, que corresponde al SRFC. El sobrenadante de PPP fue utilizado como control en el análisis de la expresión de citoquinas por ELISA del SRFC.

2. Medición de citoquinas en el SRFC.

Se midió la concentración de las citoquinas TGF-β, IL-1β, IL-10 y TNF-α en el SRFC derivado de plaquetas obtenido de donantes sanos, mediante el kit Human ELISA

Ready-SET-Go (Ebiosciences, CA, USA) para las correspondientes citoquinas. Para la detección de TGF- β 1, se utilizaron las instrucciones dadas por el fabricante. En breve, se sensibilizó la placa de ELISA con un anticuerpo de captura de TGF- β 1 durante 12 hrs. a 4°C. Posteriormente, se lavaron las células de la placa con 0,05 % Tween-20 en PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo y se bloquearon los pocillos mediante la solución diluyente del kit por 1 hr. a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se agregó una dilución 1:10 de SRFC, durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Se realizó un siguiente lavado y a continuación se activó el TGF- β 1 latente, contenido en el SRFC, mediante la exposición a 1 N de ácido clorhídrico durante 10 minutos y neutralizados por agregación de hidróxido de sodio. Luego, se lavó la placa y se incubó con el anticuerpo de detección para TGF- β 1 por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se incubó con una enzima conjugada a avidina, Avidin-HRP, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la placa minuciosamente para eliminar el exceso de solución y se agregó el sustrato, que permite el cambio de coloración para observar las concentraciones de TGF- β presentes en los sobrenadantes. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 N al cabo de 10 minutos y se midió a 560 nm el cambio colorimétrico en el lector de ELISA. El mismo protocolo de ELISA se utilizó para la detección de IL-10, IL-1 β y TNF- α , con la diferencia de que no requirieron de la activación de las citoquinas ya que se encuentran en su forma inmunoreactiva en el suero.

3. Generación *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos CD14⁺ humanos.

Los monocitos se obtuvieron de capa leucocitaria (Buffy Coat) provenientes de donantes sanos de Banco de sangre del Hospital Salvador. Brevemente, se depositaron 10 ml del concentrado en tubos falcon de 50 ml, y se agregaron 500 µl de un cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos CD14⁺ del Kit Rossette Sep de STEMCELL, que realiza una selección por depleción negativa. Se incubaron durante 30 minutos a 37° C. Luego, se agregaron 10 ml de PBS 1X suplementado con SFB al 2%, y la mezcla se depositó en un falcon con 10 ml de Ficol. El tubo se centrifugó durante 20 minutos a 1200 RCF y luego se recuperó el anillo celular que corresponde a la fracción de monocitos. Posteriormente se lavaron las células agregando 20 ml de PBS 1X, y se centrifugaron durante 5 minutos a 400 x g. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de buffer ACK para eliminar los eritrocitos residuales. Luego de 10 minutos a 37° C de incubación, se centrifugó durante 5 minutos a 400 x g. El pellet se resuspendió en 20 ml de PBS 1X y se centrifugó 5 minutos a 400 x g. Se repitió el lavado pero se centrifugó a 200 x g para eliminar las plaquetas residuales. El pellet se resuspendió en RPMI 1640 y se evaluó la viabilidad y el número de monocitos CD14⁺ obtenidos mediante Tripan blue, bajo microscopio. Se sembraron 3 millones de células CD14⁺ en 2 ml de RPMI 1640 / 10% SFB suplementado con M-CSF a una concentración de 50 ng/ml. Transcurridos 3 días de incubación a 37° C se adicionó el medio de cultivo fresco junto con la citoquina M-CSF. Luego de 7 días de cultivo, las células fueron cosechadas y luego analizadas morfológica y fenotípicamente.

4. Evaluación morfológica de los macrófagos generados mediante tinción celular.

La morfología de las células obtenidas se evaluó mediante una tinción hematoxilina-eosina bajo un microscopio de luz. Luego de 7 días de incubación con M-CSF, los macrófagos fueron cosechados de la placa mediante un rastrillo y se depositaron 200 µl de células en PBS 1X en un eppendorf de 1,5 ml. Las células fueron fijadas sobre un portaobjeto y se realizó una tinción hematoxilina-eosina en el Laboratorio clínico del Banco de sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se tomaron fotografías de la imagen captada de un microscopio de luz 100X en inmersión. Lo mismo fue realizado para monocitos no estimulados con M-CSF.

5. Evaluación de marcadores de superficie de los macrófagos generados mediante citometría de flujo.

Los macrófagos obtenidos fueron caracterizados fenotípicamente mediante un panel de anticuerpos anti: CD14 y CD11c, conjugados con el fluoróforo PE (BD, PharMingen, San Diego, Ca, USA), y CD32, conjugado con APC (BD). El análisis se realizó usando citometría de flujo. Para ello las células fueron cosechadas de la placa mediante un rastrillo estéril (cell scrapers), depositadas en tubos falcon y lavadas con PBS 1X suplementado con SFB al 2%. Luego, se traspasaron 200 µl de células a cada pocillo en una placa de 96 pocillos fondo V (250 mil células por pocillo). Se centrifugó la placa y se resuspendieron las células con los anticuerpos, para incubar durante 30 minutos en oscuridad y a 4° C. Se centrifugó la placa y se lavó el exceso de anticuerpo dos veces con PBS 1X suplementado con SFB al 2%. Las células teñidas fueron fijadas

en paraformaldehído al 2% durante 12 hrs. Finalmente, se lavó el paraformaldehído mediante la solución de lisis FACS (BD) y se realizó la lectura en el citómetro FACSVerse (BD). Se realizaron controles negativos sin anticuerpo para cada paciente.

6. Estimulación *in vitro* de macrófagos usando PRP o SRFC.

3×10^5 macrófagos generados a partir de monocitos humanos fueron estimulados con 3×10^8 plaquetas o el equivalente de SRFC. Para comparar los macrófagos generados por la estimulación con plaquetas, se estimularon macrófagos con; 1) LPS (100 ng/ml) mas IFN- γ (20 ng/ml), para generar macrófagos con perfil inflamatorio. Además, se incubaron macrófagos en presencia de Cloruro de Calcio 10 mM como control interno de la estimulación con SRFC. Se utilizaron macrófagos sin estímulo para comparar el efecto de los tratamientos del PRP o SRFC en la polarización del macrófago. Para todas las condiciones se usaron placas de 24 pocillos y se incubaron a 37° C durante 24 hrs. Finalizada la incubación, el sobrenadante se recuperó y almacenó a -80° C. Se agregó PBS 1X suplementado con SFB al 2% y se cosecharon las células adheridas a la placa de forma mecánica, mediante un rastrillo estéril, para su análisis por citometría de flujo.

7. Evaluación de marcadores de superficie de macrófagos estimulados con plaquetas o SRFC.

Los macrófagos estimulados con SRFC o plaquetas completas fueron fenotipificados mediante el panel de anticuerpos anti: CD86, CD206 y CD163,

conjugados a los fluoróforos PE-Cy5 (eBIOSCIENCE), FITC (BioLegend) y PE (eBIOSCIENCE), respectivamente. El análisis se realizó usando citometría de flujo, mediante el protocolo descrito en el punto 6 de la Metodología.

8. Evaluación de la producción de citoquinas en los macrófagos estimulados con plaquetas o SRFC.

A partir de los sobrenadantes de macrófagos estimulados con plaquetas completas, SRFC derivado de plaquetas activadas, y los controles apropiados, se determinó la producción de citoquina IL-10 y TNF- α , mediante el kit Human ELISA Ready-SET-Go (Ebiosciences, CA, USA) para las correspondientes citoquinas. El protocolo de ELISA corresponde al descrito en el punto 3 de la Metodología para citoquinas en su forma inmunoreactiva.

9. Análisis de datos.

Todos los experimentos fueron realizados utilizando el análisis estadístico T de Student de términos pareados con una cola, para determinar las diferencias significativas entre tratamientos con $n \geq 3$. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPAD Prism.

RESULTADOS

1. Caracterización del concentrado plaquetario utilizado para la estimulación de macrófagos.

1.1 Medición de la concentración de plaquetas en preparados sanguíneos provenientes de donantes sanos.

Se evaluó la concentración de plaquetas en el PPP y PRP obtenido en seis muestras sanguíneas provenientes de 6 donantes sanos mediante un hemocitómetro. El contenido de plaquetas en el PPP tiene un promedio de $188 \times 10^3 \pm 121$ plaquetas / μl , mientras que el PRP contiene $785 \times 10^3 \pm 247$ plaquetas / μl , aproximadamente cuatro veces más concentración que el PPP (Figura 1), este resultado concuerda con lo descrito en la literatura [Mazzocca y col., 2012] y permite validar el protocolo de obtención de plaquetas para la estimulación de los macrófagos. En relación a la pureza del PRP, esta fue de un 99% de plaquetas y el 1% restante correspondía a eritrocitos y leucocitos. En experimentos posteriores de estimulación de macrófagos con PRP, el concentrado plaquetario fue pasado por un filtro leucocitario que retiene leucocitos y eritrocitos. La cantidad de leucocitos luego del paso por el filtro no superó los 20 células / μl de acuerdo a mediciones realizadas con el hemocitómetro. En el caso del SRFC, el filtrado se realizó con filtro microbiológico de 0,22 μM que descarta los elementos celulares presentes, incluido los restos plaquetarios.

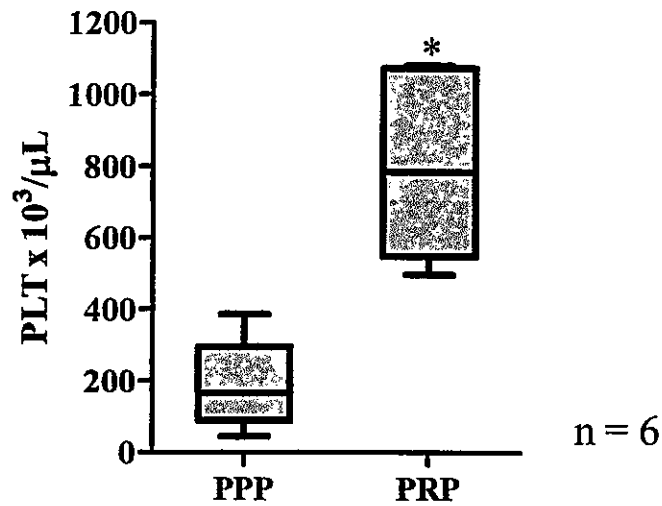


Figura 1: Comparación de la concentración plaquetaria en las dos fracciones plaquetarias recolectadas. Se analizó por hemocitómetro el contenido de plaquetas en PRP y PPP de 6 donantes sanos. Se indica el contenido de plaquetas por μl . Las barras indican promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$.

1.2 Medición de la concentración de citoquinas en las fracciones activadas de PRP (SRFC) y PPP .

Las plaquetas contienen diferentes moléculas como factores de crecimiento y citoquinas que podrían inducir la polarización del macrófago. Entre estas moléculas, el TGF- β e IL-1 β se encuentran presentes en alta concentración en las plaquetas y son liberadas al momento de la agregación plaquetaria [Andia y Maffulli, 2013]. Decidimos evaluar estas citoquinas para establecer su concentración en el preparado y verificar la activación funcional de la plaqueta. Además, se evaluó la presencia de IL-10 y TNF- α en los preparados plaquetarios. Cabe recordar que la IL-10 y el TNF- α son producidas principalmente por macrófagos reparadores e inflamatorios, respectivamente [Mantovani y col., 2004]. La medición de estas citoquinas en el PRP activado (o SRFC) se hizo para descartar la contribución de la plaqueta, a los niveles de citoquinas encontradas en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos estimulados con preparados plaquetarios que se hicieron posteriormente.

Nuestros resultados mostraron que la concentración de TGF- β en el PRP fue de 13132 ± 3357 pg/ml mientras que los niveles de TGF- β en el PPP alcanzaron 6376 ± 2874 pg/ml (Figura 2), siendo prácticamente el doble en la primera. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de la citoquina IL-1 β , mientras que los niveles de TNF- α e IL-10 fueron indetectables en el PRP y PPP (Tabla 1).

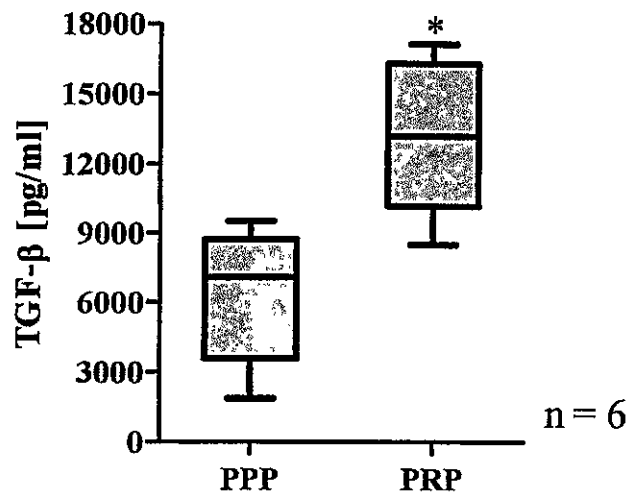


Figura 2: Expresión de la citoquina TGF- β en las fracciones plaquetarias. El contenido de TGF- β fue determinado mediante ELISA en el sobrenadante generado de plaquetas activadas (SRFC). Concentración de TGF- β pg/ml en las fracciones de plaquetas PRP y PPP. El experimento se realizó para un $n = 6$. Las barras indican promedio \pm SEM. *: $p < 0,05$.

Citoquina	PPP [pg/ml]	PRP [pg/ml]	Observación
TGF- β	6376 \pm 2874	13132 \pm 3357	P < 0,05
IL-1 β	18,9 \pm 7,69	20,9 \pm 7,2	NS
IL-10	<2 *	<2 *	NS
TNF- α	<2 *	<2 *	NS

*Bajo el nivel de detección del Kit

Tabla 1: Expresión de citoquinas en las fracciones plaquetarias. El contenido de estas citoquinas fue determinado mediante ELISA en el sobrenadante generado de plaquetas activadas o SRFC. La tabla muestra la concentración promedio de citoquina en el PRP y PPP mas la desviación estándar, para un n = 6.

2. Generación de macrófagos *in vitro* a partir de monocitos CD14+ humanos.

2.1 Fenotipificación de macrófagos mediante morfología.

Para ver el efecto que tenían las plaquetas sobre los macrófagos primero fue necesario establecer la generación de macrófagos. Ellos se obtuvieron mediante protocolos establecidos en la literatura [Martínez y col., 2006]. Se realizó un análisis morfológico mediante una tinción hematoxilina-eosina sobre monocitos cultivados durante siete días con y sin M-CSF. En la imagen de la Figura 3 se muestra claramente que los monocitos tratados y no tratados con M-CSF presentan una morfología diferente, también, las células tratadas con M-CSF presentan características morfológicas similares a macrófagos teñidos con hematoxilina-eosina, donde los núcleos son de color violeta y el citoplasma de color rosa. El tamaño de los monocitos estimulados con M-CSF es 2 a 4 veces más grande que los monocitos sin estímulo. Además, se observó que los monocitos contenían un núcleo redondo o con forma de riñón, denso y que ocupaba una gran parte de la célula, un citoplasma pequeño, redondo y con presencia de gránulos finos. En cambio los macrófagos, presentaron un núcleo redondo, granular, menos denso, y un citoplasma abundante, redondo y con una gran cantidad de gránulos y vacuolas, coherentes con la forma de un macrófago. Se observaron algunas células de mayor tamaño en la muestra de monocitos, aunque en una proporción mucho menor, y que corresponden probablemente a monocitos que se diferenciaron hacia macrófagos sin un estímulo adicional. Por último, no se encontraron linfocitos, eritrocitos ni otros leucocitos en los cultivos celulares.

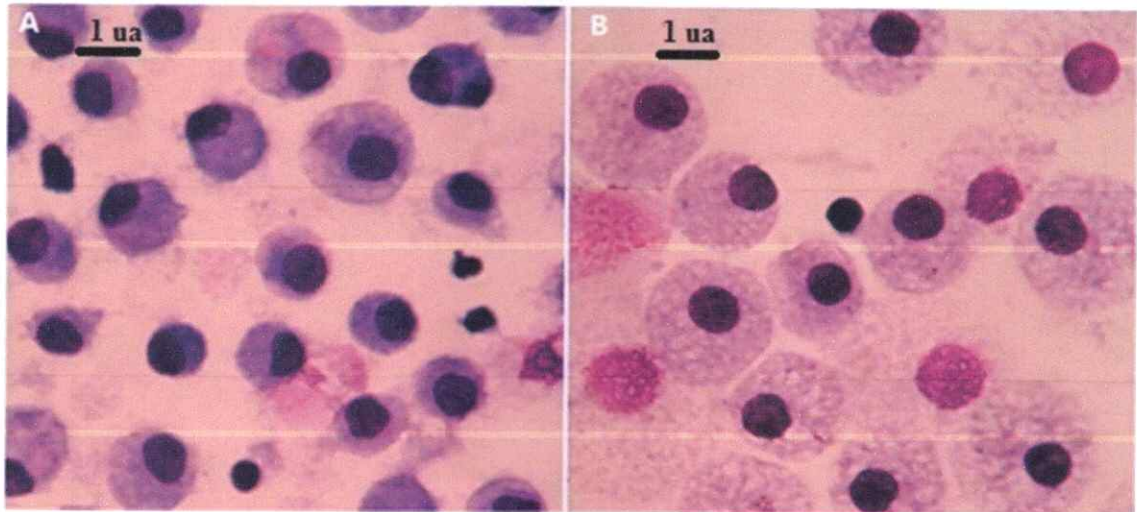


Figura 3: Morfología de los monocitos y macrófagos generados *in vitro*. Visualización microscópica de monocitos de sangre periférica (A) y macrófagos obtenidos *in vitro* (B). Tinción hematoxilina-eosina, microscopía de luz inmersión 100X. "1 ua" = unidad arbitraria.

2.2 Fenotipificación de macrófagos mediante la expresión de marcadores de superficie.

Debido a que no existen marcadores de superficie específicos de la población de macrófagos, generamos un panel de marcadores de superficie para caracterizar a nuestros macrófagos generados. Para ello se evaluó mediante citometría de flujo la expresión de CD14, un marcador de linaje de monocitos, y CD11c y CD32, una molécula de adhesión y un receptor Fc, respectivamente, que aumentan su expresión en macrófagos [Ammon y col., 2000].

La Figura 4 muestra el resultado de la citometría de los antígenos CD14, CD11c y CD32. De acuerdo a la citometría, no se observaron diferencias en el tamaño o la complejidad celular como las encontradas en el análisis morfológico realizado anteriormente. Una explicación a este hecho, es que la adquisición de células en citometría fue realizada en una escala logarítmica que no permite evaluar claramente la morfología celular dentro del linaje monocito-macrófago. Sin embargo, de acuerdo a los marcadores utilizados si encontramos diferencias entre los dos cultivos celulares. Se seleccionó la población celular de acuerdo al tamaño y la complejidad celular, para luego analizar los marcadores de diferenciación de las células monocito-macrófago. Nuestros resultados mostraron que el marcador CD14 disminuyó su expresión en las células cultivadas con M-CSF hasta el día 7, cuando adquieren una morfología equivalente a la de un macrófago, lo que concuerda a lo esperado. Por otro lado, el marcador CD11c aumentó su expresión en células tratadas con M-CSF (considerados macrófagos), mientras que para CD32 no se observaron diferencias significativas entre

los monocitos tratados y no tratados con M-CSF (Tabla 2). Todas las células tratadas con M-CSF, expresaron los marcadores analizados, demostrando que la población generada es una población homogénea cuyo fenotipo en comparación a los monocitos no tratados fue CD14^{low} CD11c^{high} CD32+. Este fenotipo correspondería a un macrófago no polarizado, validando el protocolo de generación de macrófagos a partir de monocitos humanos.

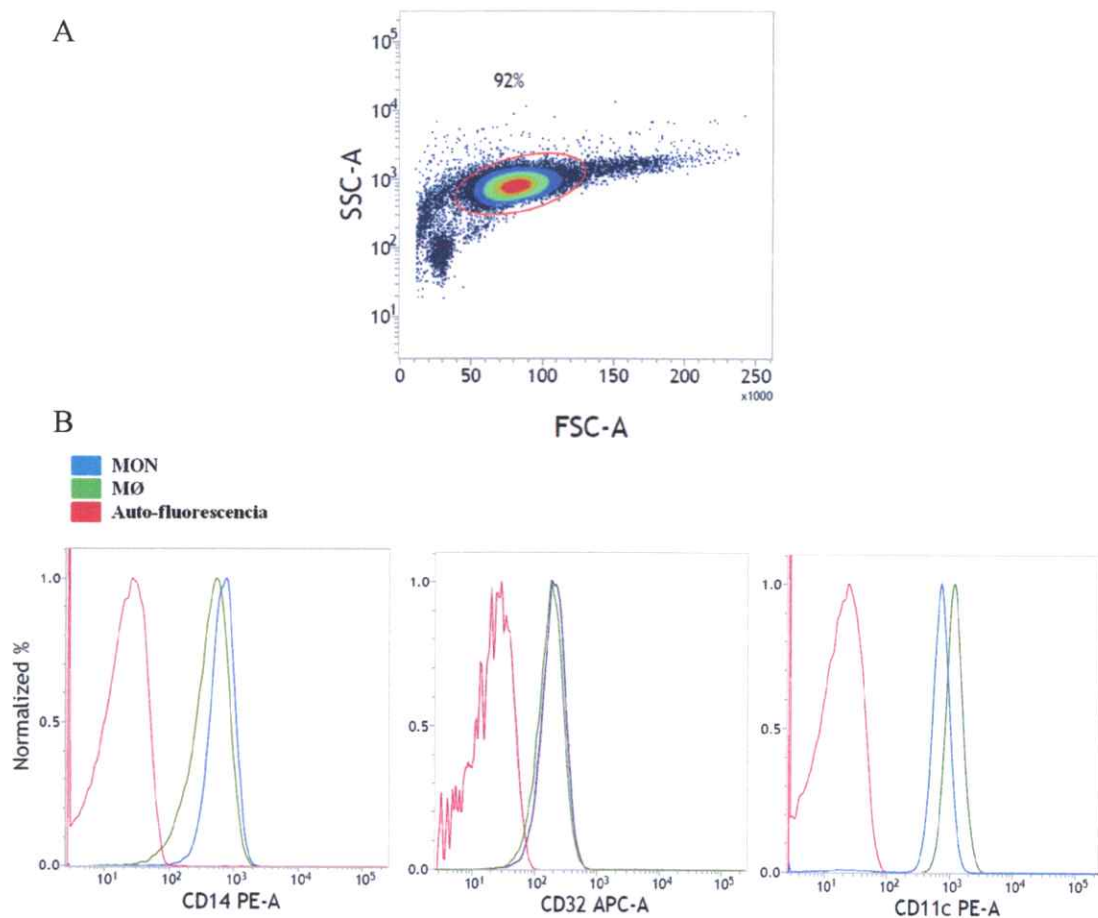


Figura 4: Expresión de marcadores de superficie en monocitos (MON) y macrófagos (MØ) analizados mediante citometría de flujo. Expresión de marcadores de superficie en monocitos de sangre periférica estimulados durante 7 días con M-CSF (MØ), o sin estímulo (MON). Las células fueron marcadas con distintos anticuerpos conjugados y analizados por citometría de flujo. A) Corresponde a la selección de la población donde se encuentran los MON y MØ, mediante la complejidad granular (SSC) y el tamaño (FSC) de las células. B) Histogramas de la expresión de CD14, CD32 y CD11c obtenidos a partir de la población seleccionada en A.

Antígeno	MON	MØ	Observación
CD32	187±3,5	208±10,1	NS
CD11c	1125±145	1659±212	P < 0,05
CD14	698±13,5	480±41	P < 0,05

Tabla 2: Comparación de la intensidad media de fluorescencia de marcadores de superficie en monocitos (MON) y macrófagos (MØ). Los monocitos corresponden a células purificadas de muestras sanguíneas y analizadas por citometría de flujo. Los macrófagos fueron generados a partir de monocitos cultivados durante siete días con M-CSF, y luego analizados por citometría de flujo. La tabla muestra la expresión media de los marcadores de superficie: CD32, CD11c y CD14 mas el error estándar, obtenida para un n = 3.

3. Fenotipificación mediante marcadores de superficie de macrófagos estimulados con SRFC.

Los macrófagos generados fueron cultivados con SRFC (equivalente a 1000 plaquetas / μ l) para evaluar su rol en la polarización de macrófagos. Luego de la estimulación por 24 hrs, se evaluó la expresión de la molécula coestimuladora CD86, y las moléculas CD206 y CD163, asociadas a macrófagos reparadores. Ya que el SRFC se obtuvo luego de la activación de plaquetas con cloruro de calcio, se utilizó un control adicionando esta molécula al cultivo de macrófagos a la misma concentración utilizada para activar las plaquetas. Se generó además, un cultivo de macrófago de tipo inflamatorio [Martínez y col., 2006] para establecer si los macrófagos tratados con SRFC presentaban un perfil similar. En el análisis por citometría de flujo se realizó una doble selección de la población, primero mediante tamaño y complejidad y luego dentro de la población se seleccionaron las células CD14⁺ (Figura 5). Nuestros resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en los marcadores CD206, CD163 y CD86, en relación al macrófago sin estímulo. Esto nos hizo suponer que a pesar del alto contenido de TGF- β en el SRFC, a 24 horas no es un estímulo suficiente para polarizar al macrófago hacia un perfil reparador. Cabe mencionar que los macrófagos tratados con cloruro de calcio disminuyeron la expresión de los marcadores CD206 y CD163 (Figura 5). El perfil citométrico generado con calcio se asemeja más a lo que ocurre con los marcadores en el macrófago proinflamatorio, aunque como lo demostramos más adelante no produce IL-10 y TNF- α . No tenemos una respuesta a esta observación, aunque podría ser interesante en modelo óseo.

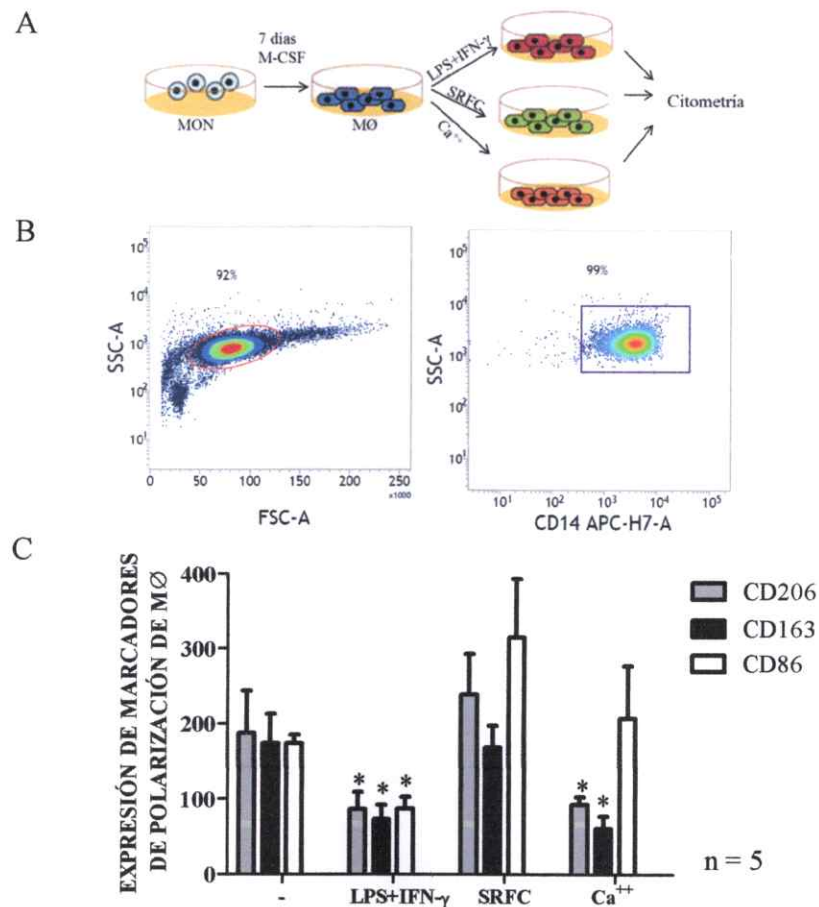


Figura 5: Evaluación de marcadores de superficie en macrófagos estimulados con SRFC. Expresión de marcadores en la superficie de macrófagos estimulados durante 24 hrs. con: LPS mas IFN- γ , SRFC derivado de plaquetas, cloruro de calcio (Ca⁺⁺) o sin estímulo adicional (-). Las células fueron marcadas con distintos anticuerpos conjugados y analizados por citometría de flujo. A) Representación del protocolo experimental realizado. B) Corresponde a la selección de la población de macrófagos por granularidad (SSC) y tamaño (FSC) de las células, y luego mediante la expresión de CD14. C) Expresión de CD206, CD163 y CD86 en las diferentes condiciones de MØ, a partir de la población CD14 positiva. El experimento fue realizado para un n = 5. Las barras indican promedio \pm SEM. * = p < 0,05, en comparación al control sin estímulo.

4. Fenotipificación mediante marcadores de superficie de macrófagos estimulados con plaquetas completas (PRP).

Ya que el SRFC derivado de plaquetas parece no generar un efecto en el fenotipo de los macrófagos, al menos en 24 hrs., pensamos que tal vez sería necesaria una interacción directa con las plaquetas integras. Para ello se co-incubaron macrófagos con plaquetas enteras durante 24 hrs. y se evaluaron los marcadores de superficie CD206, CD86 y CD163. La población de macrófagos CD14+ fue seleccionada igual que en el experimento anterior, descartando la presencia de plaquetas en la ventana citométrica.

Nuestros resultados muestran que los macrófagos estimulados con plaquetas completas aumentaron significativamente la expresión de CD206, mientras que disminuyeron CD163, comparados a los macrófagos sin tratamiento. Se observó además, una disminución en el marcador CD86, asociado a un perfil inflamatorio. Esta disminución también fue observada en los macrófago tratados con LPS mas INF- γ (Figura 6).

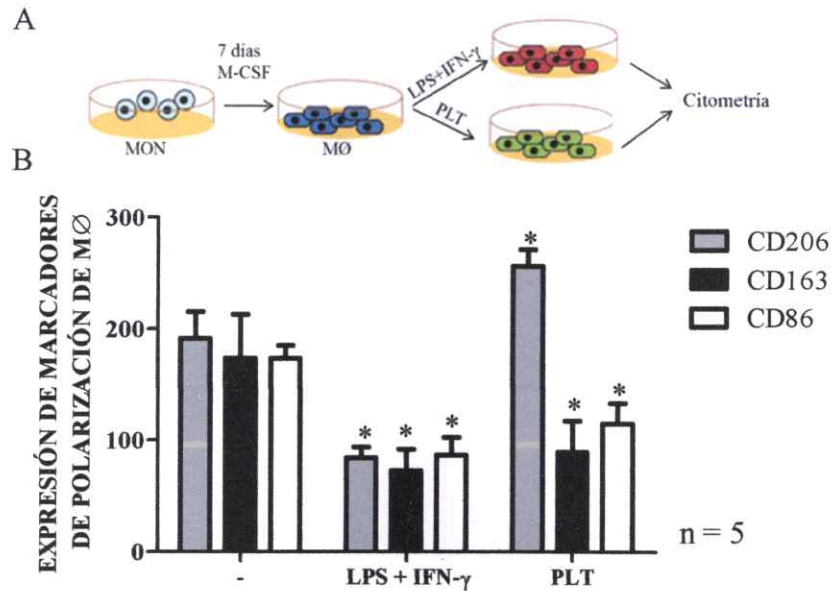


Figura 6: Evaluación de marcadores de macrófagos estimulados con plaquetas completas. Expresión de marcadores en la superficie de macrófagos estimulados durante 24 hrs. con: LPS mas IFN- γ , plaquetas enteras (PLT), o sin estímulo adicional (-). Las células fueron marcadas con distintos anticuerpos conjugados y analizados por citometría de flujo. Los macrófagos fueron previamente seleccionados por tamaño y granulosidad, y mediante la expresión de CD14. A) Representación del protocolo experimental realizado. B) Expresión de CD206, CD163 y CD86 en las diferentes condiciones de MØ. El experimento fue realizado para un n = 5. Las barras indican promedio \pm SEM. * = p < 0,05, en comparación al control sin estímulo.

La incubación de macrófagos con plaquetas aumentó el marcador CD206 y disminuyó CD86, lo que favorecería una polarización hacia un fenotipo reparador de macrófagos al cabo de 24 hrs. Para consolidar nuestra idea evaluamos la producción de citoquinas descritas para macrófagos inflamatorios o reparadores.

5. Producción de citoquinas en el sobrenadante de macrófago estimulados con plaquetas o SRFC.

Para caracterizar mejor el tipo de macrófagos generado se midió la producción de IL-10 y TNF- α en el sobrenadante de macrófagos estimulados con SRFC o PRP. Se observó que sólo los macrófagos estimulados con PRP (plaquetas integras) aumentan la producción de IL-10 con respecto al macrófago sin tratar (Figura 7). Este aumento alcanza ocho veces el nivel basal, mientras que el control de macrófagos tratado con LPS mas INF- γ aumentó esta citoquina en veinte órdenes de magnitud. Como lo mencionamos anteriormente, los niveles de IL-10 son menores a 2 pg/ml en el SRFC (y por añadidura en el PRP), cantidad despreciable en relación a los 80-100 pg/ml producidos por el macrófago tratado con PRP. Por lo tanto, los niveles de IL-10 se deben exclusivamente a la producción del macrófago. En relación y como era de esperar, los macrófagos tratados con LPS mas INF- γ aumentan significativamente la producción de TNF- α , mientras que no se observó una variación para la producción de esta citoquina en los macrófagos estimulados con SRFC o PRP con respecto al macrófago sin tratar. Este resultado concuerda con el obtenido al medir la expresión de marcadores de superficie en macrófagos.

Finalmente, los macrófagos estimulados con plaquetas completas durante 24 hrs. aumentan la expresión del receptor de manosa (CD206) y la producción de la citoquina IL-10, generándose un macrófago con características reparadoras.

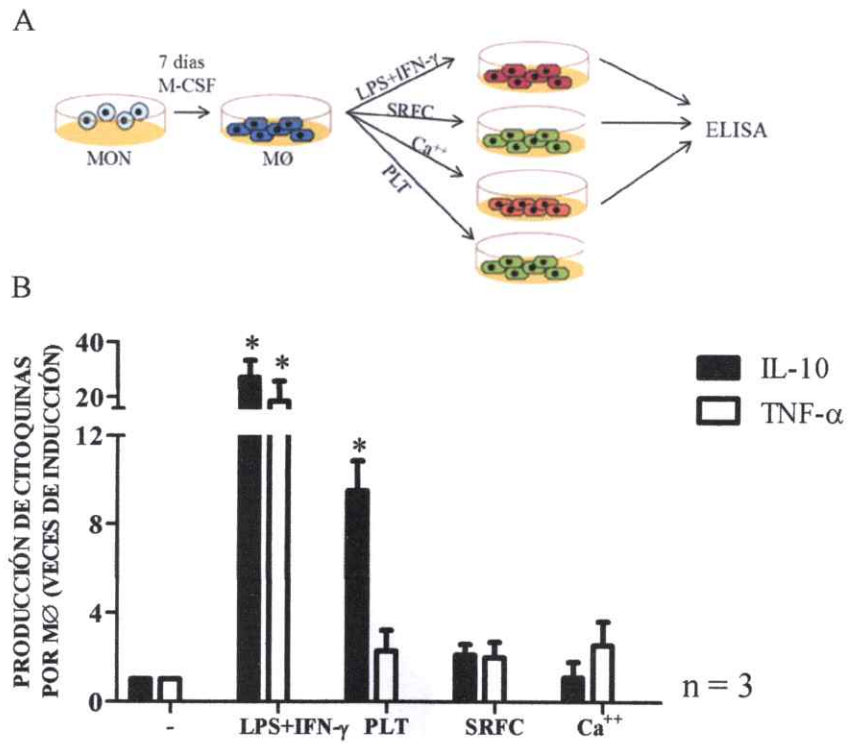


Figura 7: Evaluación de la producción de citoquinas en macrófagos estimulados con plaquetas o SRFC. Producción de citoquinas en macrófagos estimulados por 24 hrs. con LPS + IFN- γ , plaquetas enteras (PLT), SRFC (SRFC), cloruro de calcio (Ca⁺⁺) o sin estímulo adicional (-). El sobrenadante de las células fue recolectado y almacenado a -80°C, para posteriormente realizar el ELISA de IL-10 y TNF- α . A) Representación del protocolo experimental realizado. B) Producción de IL-10 y TNF- α en los MØ bajo diferentes condiciones. Se realizó el experimento para un n = 3. Las barras indican promedio \pm SEM. * = p < 0,05, en comparación al control sin estímulo.

6. Evaluación fenotípica de macrófagos al estimular con concentraciones crecientes de plaquetas.

En el experimento anterior se utilizó una relación de 1:1000 entre macrófagos / plaquetas. En esa razón, los marcadores CD206 y CD86 varían su expresión en el macrófago. Para determinar si el cambio fenotípico observado anteriormente es o no dosis-dependiente se estimuló a los macrófagos con diferentes concentraciones plaquetarias, generándose una relación de 1/125, 1/250, 1/500, 1/1000 entre macrófago / plaqueta. No se utilizaron concentraciones mayores de plaquetas, debido a que se forma una “costra” en el cultivo que hace imposible disgregar las células para su análisis por citometría de flujo. En la evaluación, se observó que a medida que aumenta la relación macrófago / plaqueta, aumenta significativamente y de forma lineal la expresión de CD206 llegando a su máxima expresión en 1000 plaquetas por macrófago (Figura 8). Esto confirmó que los macrófagos tratados con plaquetas en una relación 1/1000 logra el efecto máximo en el marcador CD206. Otros trabajos que han investigado la interacción entre plaquetas y monocitos u otros leucocitos han llegado a la misma relación dosis-efecto [Maitre y col., 2010; Svensson Holm y col., 2008]. Además, se observa en la Figura 8, que en todas las concentraciones plaquetarias probadas se induce la expresión de CD206, sin embargo, solo alcanza significancia estadística a partir de la relación 1/500.

En relación al marcador CD86, la curva obtenida muestra que existe un máximo de expresión en las razones 1/250 y 1/500, mientras que no se observa un cambio en la expresión de CD86 en las concentraciones de 1/125 y 1/1000 (Anexo). El resultado de la expresión de CD86 en la concentración 1/ 1000 concuerda con nuestro resultado anterior. De acuerdo a estos resultados, el máximo aumento en los dos marcadores se logra con una concentración de 500 plaquetas por cada macrófago.



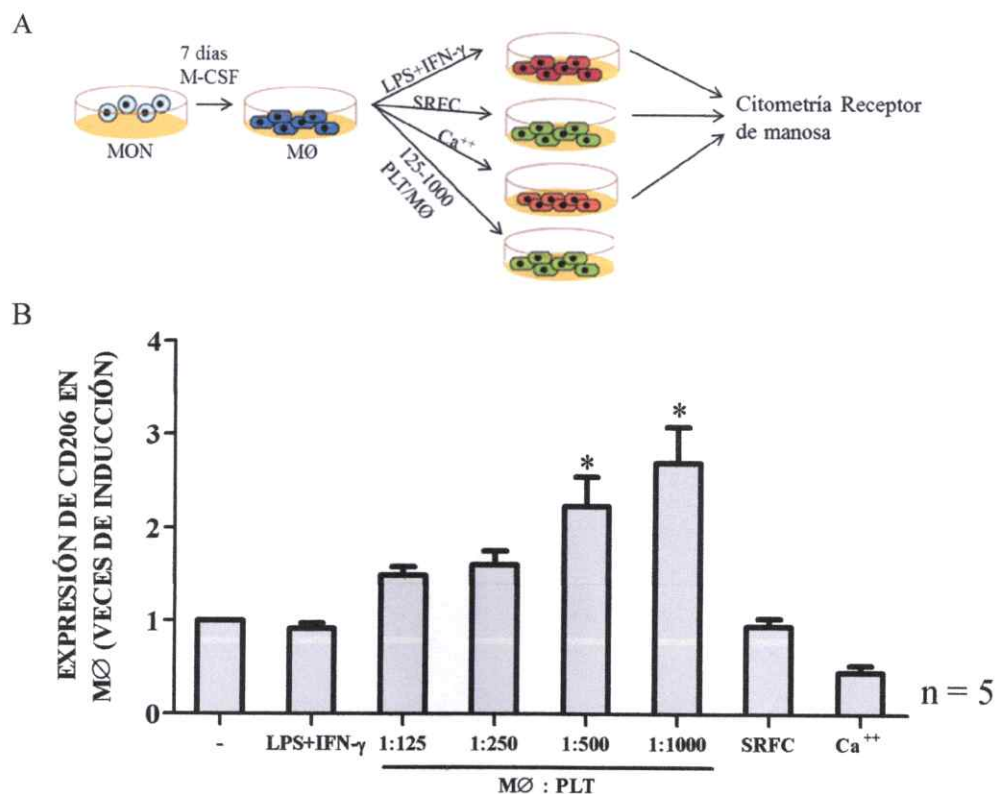


Figura 8: Evaluación de CD206 en macrófagos estimulados con cantidades crecientes de plaqueta. Se co-incubaron macrófagos con plaquetas en una dosis creciente de plaquetas, durante 24 hrs. Las condiciones corresponden a: macrófagos más LPS e IFN- γ (LPS + IFN- γ), relación macrófago: plaqueta 1:125; 1:250; 1:500; y 1:1000, macrófagos más SRFC (SRFC), macrófagos más cloruro de calcio (Ca⁺⁺) y sin estímulo adicional (-). Las células fueron marcadas con anticuerpos conjugados y analizados por citometría de flujo. A) Representación del protocolo experimental realizado. B) Expresión en veces de inducción de CD206 en las diferentes condiciones de macrófagos. El experimento se realizó para un n = 5. Las barras indican promedio \pm SEM. *: p<0,05, en comparación al control sin estímulo.

7. Evaluación de la repolarización en macrófagos proinflamatorios incubados con sobrenadante de macrófagos estimulados con plaquetas.

Debido a las propiedades asociadas a los macrófagos reparadores, quisimos evaluar si los sobrenadantes derivados de los cultivos macrófagos tratados con plaquetas podrían repolarizar macrófagos de perfil inflamatorio hacia un fenotipo neutro o reparador. En el resultado se observó que existe un leve aumento en la expresión de CD206 en los macrófagos proinflamatorios tratados con estos sobrenadantes, asimilándose al macrófago sin estímulo adicional (Figura 9). Este efecto en la expresión del marcador CD206 no se observó al estimular macrófagos proinflamatorios con el sobrenadante de macrófagos tratados con SRFC. Si bien es necesario aumentar el número de experimentos para validar el resultado, este permite evidenciar una posible repolarización de macrófagos proinflamatorios mediante plaquetas. Por ello también se incluyó un histograma representativo de los cambios en la expresión de CD206 (Anexo 5).

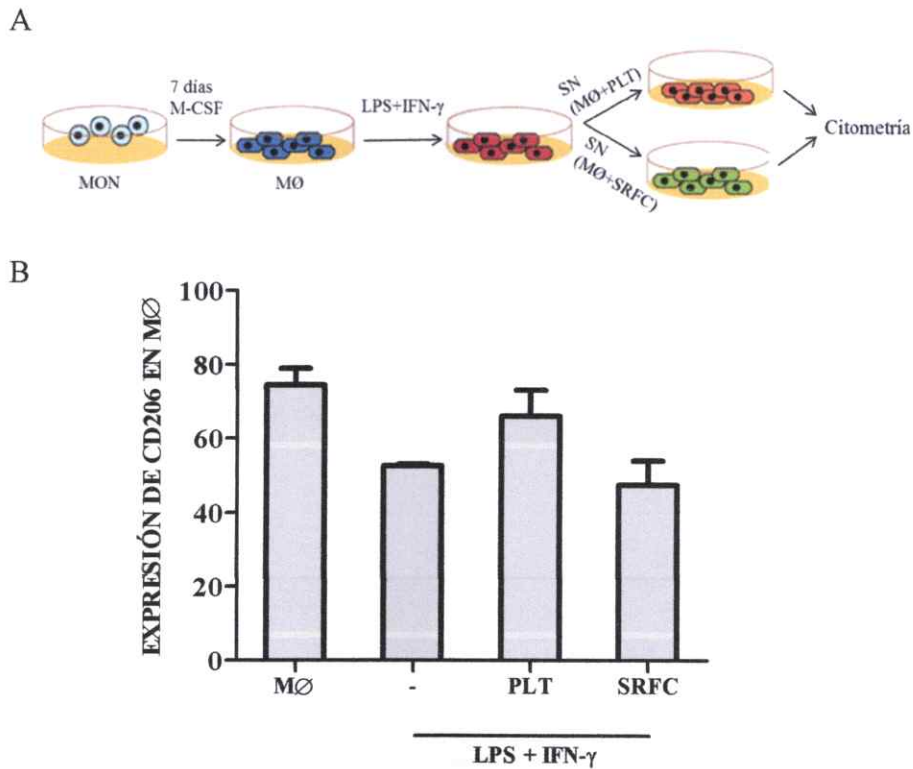


Figura 9. Evaluación de marcadores de superficie en macrófagos proinflamatorios estimulados con el sobrenadante de macrófagos tratados con plaquetas. Las condiciones corresponden a: 1) Macrófagos sin estímulo adicional (MØ). 2) Macrófagos estimulados durante 24 hrs. con LPS mas IFN- γ , como control de macrófago proinflamatorio (-). 3) Los macrófagos proinflamatorios anteriores (nuevo medio) co-incubados durante 24 hrs. adicionales con el sobrenadante de macrófagos estimulados con plaquetas completas (PLT) o SRFC (SRFC). Las células fueron marcadas con anticuerpos conjugados y analizados por citometría de flujo. A) Representación del protocolo experimental realizado. B) Expresión de CD206 en los macrófagos proinflamatorios estimulados bajo las diferentes condiciones. El experimento se realizó para un n = 2, por lo que muestra una tendencia.

DISCUSIÓN

En esta Tesis estudiamos el efecto de las plaquetas en la polarización de macrófagos generados a partir de monocitos humanos. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con las plaquetas íntegras y no su contenido citoplasmático, permite la polarización de macrófagos hacia perfiles reparadores. El fenotipo de los macrófagos generados se caracteriza por un aumento en la producción de IL-10 y en la expresión del receptor de manosa (CD206), mientras que disminuye los marcadores CD163 y CD86. Si bien tanto el receptor de manosa CD206 como el receptor scavenger haptoglobina-hemoglobina CD163 son considerados marcadores clásicos de macrófagos reparadores, un estudio demostró que exhiben patrones de inducción mutuamente excluyentes [Porcheray y col., 2005]. Ellos observaron que la estimulación de macrófagos con IL-4 o TGF- β aumenta la expresión de CD206 y reprime CD163, un patrón de expresión similar al observado en nuestros resultados. Cabe mencionar que estas dos citoquinas son utilizadas para polarizar macrófagos hacia perfiles reparadores.

El Factor de Crecimiento TGF- β podría inducir el perfil de macrófagos obtenido

Las plaquetas poseen un alto contenido de TGF- β , citoquina que es liberada en forma inactiva durante la activación plaquetaria. En las mediciones realizadas para TGF- β en el SRFC derivado de PRP se encontró que su concentración fue de 13 ng/ml aproximadamente, y la concentración de TGF- β recombinante que se utiliza para polarizar macrófagos hacia un fenotipo reparador es de 10 ng/ml [Porcheray y col.,

2005]. En nuestros resultados, solo los macrófagos tratados con plaquetas integras y no el SRFC, fue capaz de polarizar al macrófago hacia un fenotipo similar al dado por TGF- β . Este resultado, es controversial debido a que el SRFC contiene TGF- β que fue liberado de la activación plaquetaria. Una explicación posible es que en la estimulación de macrófagos, el SRFC se diluye en medio RPMI/ 10% SFB entre tres a cuatro veces, quedando una cantidad efectiva de 3-4 ng/ml de TGF- β . Además, debemos considerar que parte de este TGF- β se encuentra inactivo y no conocemos su tiempo de activación. El TGF- β es almacenado en 3 complejos en la plaqueta: el complejo latente de proteína de unión a TGF- β (LTBP), el complejo latente péptido asociado (LAP) y el dímero activo de TGF- β , los cuales se liberan al activarse la plaqueta y solo el 5% se encuentra en su forma activa [Grainger y col., 1995]. Estos complejos pueden disociarse mediante proteasas presentes en el suero, liberadas por las plaquetas u otras células, permitiendo que el complejo de TGF- β se encuentre activo cuando ocurra la cicatrización de tejido, posterior a la inflamación [Nunes y col., 1997; Blakytyn y col., 2004]. En esta línea, es posible que al estimular los macrófagos con el SRFC derivado de plaquetas durante 24 hrs. no se lograra activar una cantidad biológicamente importante del complejo TGF- β para generar un efecto en los macrófagos. Debido a esto, proponemos evaluar el efecto del SRFC a mayores tiempos de estimulación, en el que podría observarse un efecto en la polarización de los macrófagos dada por una activación de TGF- β presente en el SRFC.

En el efecto observado en macrófagos estimulados con plaquetas integras, la liberación de TGF- β desde su superficie plaquetaria podría generar una concentración

local muy alta de la citoquina y una tasa de activación más rápida debido a una interacción célula-célula.

En particular, cuando las plaquetas se activan expresan P-selectina y pierden la asimetría de membrana, lo que favorece su fagocitosis por los macrófagos [Scull y col., 2010]. Por su parte, los macrófagos pueden regular la respuesta proinflamatoria eliminando células apoptóticas o restos celulares [Gregory y Devitt, 2004]. Por lo que es esperable que al ser removidas las plaquetas por los macrófagos, también se favorezca la regulación de la inflamación, que podría ser promovida mediante mediadores plaquetarios como el TGF- β . Cuya activación, sugerimos, podría verse favorecida al entrar en contacto de directo con el macrófago y por ende con las proteasas, como MMP que se produce en macrófagos no polarizados (Anexo 4). En cualquier caso la posibilidad de que el TGF- β liberado por plaquetas integras genere el fenotipo reparador observado en los macrófagos no polarizados, es una posibilidad a seguir investigando.

Moléculas plaquetarias que pueden favorecer la polarización de macrófagos

La medición de más factores plaquetarios involucrados en la polarización del macrófago será evaluada en experimentos posteriores a esta Tesis. Sin embargo, y de forma de considerarlos como elementos que participan en este proceso son discutidos aquí.

Entre los factores derivados de plaquetas descritos, que pueden actuar sobre la polarización de macrófagos humanos están: 1. Mediadores lipídicos; PAF y tromboxano

(TXA₂), 2. Factores de crecimiento; PDGF y TGF- β , 3. Citoquinas; IL-1 β y HMGB1, y 4. La monoamina neurotransmisora serotonina (5-HT) [Weyrich y Zimmerman, 2004]. Una publicación reciente reveló que el receptor del mediador lipídico PAF en macrófagos, induce un fenotipo reparador de alta producción de la citoquina IL-10, en presencia de LPS, al fagocitar grupos lipídicos derivados de células muertas [Ferracini y col., 2013]. Así mismo, otro estudio reciente demostró que 5-HT es capaz de promover el mantenimiento de un fenotipo reparador de macrófagos y disminuir la liberación de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS, sin afectar la producción de IL-10 [de las Casas-Engel y col., 2013]. Como se mencionó anteriormente, el factor de crecimiento TGF- β induce la generación de macrófagos de tipo reparador que se caracterizan por la expresión del receptor de manosa y la producción de citoquina IL-10. De modo similar, si bien no se ha visto su rol directo en la polarización, el factor de crecimiento PDGF induce en los macrófagos una mayor quimiotaxis y proliferación de fibroblastos para la cicatrización de heridas [Utela y col., 2004]. Por el contrario, se ha visto que TXA₂, un eicosanoide producido principalmente en las membranas de las plaquetas, tiene una acción proinflamatoria que potencia la respuesta inmunológica en linfocitos T y macrófagos, aunque los mecanismos que promueven esta acción aún no son claros [Thomas y col., 2003]. Además, se ha visto que la proteína HMGB1, sintetizada por plaquetas, células epiteliales y macrófagos, funciona como mediador inflamatorio, favoreciendo la polarización de macrófagos proinflamatorios frente a la infección [Tian y col., 2015]. Por último, la citoquina IL-1 β , sintetizada por plaquetas en el citosol, promueve el rol inflamatorio de los macrófagos, aunque no se ha evaluado su rol en la polarización [Weyrich y Zimmerman, 2004]. Sin embargo, al medir la concentración de

IL-1 β en el SRFC derivado de PRP, no se encontraron diferencias significativas en comparación a los niveles plasmáticos en el PRP, por lo que suponemos no influiría en el fenotipo de macrófago encontrado.

Cambios fenotípicos en macrófagos polarizados con Plaquetas

Como se mencionó antes, al evaluar la polarización de macrófagos mediante plaquetas completas, encontramos un aumento significativo en la expresión del receptor de manosa CD206 y una disminución del receptor scavenger CD163. Este fenotipo de macrófago tuvo una expresión homogénea, es decir, no hubo dos poblaciones celulares diferentes o una heterogeneidad celular.

El receptor de manosa, un receptor de lectina endocítico tipo C, actúa como un PRR de residuos terminales de glicanos presentes en la membrana de diversos microorganismos patógenos [Gazi y Martínez-Pomares, 2009] o en las proteínas inflamatorias en circulación [Lee y col., 2002], permitiendo su reconocimiento, fagocitosis y degradación en el lisosoma. Sin embargo, este receptor no es esencial y tiene un rol pasivo en la fagocitosis, ya que la parte citoplasmática del receptor no contiene motivos de señalización [Stahl y Ezekowitz, 1998]. Otro rol clave del receptor de manosa es su participación en la resolución de la inflamación, la expresión de este receptor aumenta en la fase final de la inflamación, lo que es consistente con su rol en la eliminación de agentes inflamatorios, como hidrolasas lisosomales y otras glicoproteínas. Los receptores de manosa reconocen señales de glicanos en las proteínas inflamatorias en circulación, lo que permite su internalización y degradación en el

lisosoma [Lee y col., 2002]. Además de la remoción de glicoproteínas en el suero, el receptor de manosa también tiene un rol activo en la remoción de la circulación de hormonas de glicoproteínas sulfatadas y componentes de la matriz como colágenos [Stahl y Ezekowitz, 1998]. En consecuencia, el principal rol del receptor de manosa es el de mantener una homeostasis en base a la eliminación eficaz de moléculas que requieren una vida media corta en el tejido o circulación, y el que no desencadene una cascada de transducción de señales es el escenario deseable para una eliminación silenciosa de moléculas endógenas [Martinez-Pomares, 2008].

Por otra parte, el rol principal del receptor scavenger CD163, también asociado a macrófagos de tipo reparador, es limpiar los complejos haptoglobina-hemoglobina de la sangre o el tejido y protegerlos del daño oxidativo después de una hemólisis (Philippidis y col., 2004). La estimulación con IL-10 y dexametasona provocan un aumento en su expresión, mientras que IL-4, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , LPS y TGF- β disminuyen su expresión [Porcheray y col., 2005]. La ausencia de IL-10 y la presencia de TGF- β en nuestro estímulo plaquetario pudieron ocasionar la disminución en la expresión relativa de CD163. Además, si bien la estimulación de macrófagos con plaquetas provoca un aumento en la producción de la IL-10, al parecer la concentración secretada no es capaz de aumentar la expresión de CD163 y disminuir la expresión de CD206, al menos a las 24 horas post- estímulo.

Como se mencionó arriba, nuestros macrófagos aumentan la expresión de CD206 y la producción de IL-10. Esta citoquina le permite al macrófago participar en la

eliminación de parásitos, en inmunosupresión y en la remodelación de tejidos [Hao y col., 2012]. Concordando con sus roles en los procesos de regulación de la inflamación, tanto la expresión del receptor de manosa CD206 como la producción de citoquina IL-10 son características de varias subpoblaciones de macrófagos reparadores [Hao y col., 2012].

Esto nos permite concluir que, en base a la expresión de marcadores de superficie y el perfil de citoquinas, la estimulación de macrófagos mediante plaquetas es capaz de polarizar las células hacia un fenotipo reparador, que participa en los procesos de inmunoregulación y remodelación de tejido al menos a las 24 horas y sin un estímulo adicional, como LPS que induce la producción de IL-10.

No sabemos si en tiempos menores de estimulación con plaquetas completas, los macrófagos presentan un fenotipo inflamatorio. Las plaquetas poseen moléculas pro y anti inflamatorias que podrían influir en la polarización del macrófago. En referencia a lo anterior, un estudio demostró que al co-incubar macrófagos con plaquetas durante 45 minutos aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias [Scull y col., 2010]. Estos efectos, al parecer antagónicos, pueden ser normales si consideramos que los componentes plaquetarios pueden actuar temporalmente en el macrófago. Por tanto, la plasticidad celular desarrollada por el macrófago al parecer depende del tiempo y de los estímulos con que se tope, pudiendo pasar de un estado inflamatorio a otro reparador y viceversa. Un experimento a desarrollar será determinar la cinética en la expresión de marcadores inflamatorios y reparadores a distintos tiempos de incubación con plaquetas.

Este hallazgo nos permitiría comprender de qué forma podrían operar *in vivo* plaquetas y macrófagos para participar en los procesos de inflamación y, posteriormente, en la reparación de tejido dañado.

Repolarización de macrófagos proinflamatorios a fenotipo reparador

La repolarización supone el pasar de un estado celular a otro, cambiando la función o al menos su fenotipo. Por ello, quisimos estudiar la plasticidad de macrófagos evaluando la capacidad de macrófagos proinflamatorios con baja expresión de CD206 de recuperar la expresión de este marcador. La incubación de los macrófagos proinflamatorios con sobrenadante de cultivo proveniente de macrófagos tratados con plaquetas enteras aumentó la expresión de CD206. Sabemos que el sobrenadante de cultivo carece de TNF- α , contiene IL-10, se expresan algunas metaloproteínas (Anexo) y probablemente exista TGF- β proveniente de la plaqueta. Por lo que no podemos afirmar si este aumento en el CD206 es generado por la plaqueta o por el macrófago. Además, si bien la cantidad de IL-10 producida en el sobrenadante (< 100 pg/ml) podría ser insuficiente para estimular al macrófago, otros factores podrían haber contribuido al aumento de la expresión de CD206. Por otro lado, y en base a resultados anteriores y a la literatura, podemos inferir que la plaqueta podría participar en el proceso de repolarización a través de varios factores, incluyendo el TGF- β .

En una tesis a desarrollar planteamos que las plaquetas podrían aumentar la expresión de receptor de manosa CD206 en macrófagos proinflamatorios, repolarizando su estado hacia un fenotipo reparador. La búsqueda de mecanismos que favorezcan la

interacción plaqueta-macrófagos hacia un fenotipo reparador, permitirán diseñar estrategias terapéuticas para la reducción de la inflamación en enfermedades inflamatorias crónicas como la artrosis.

Significancia Biológica de la polarización de macrófagos a un fenotipo reparador en cáncer

Como se ha mencionado anteriormente, la generación de macrófagos reparadores promueve la regeneración tisular, siendo muy importantes en la remoción de células muertas en contextos no inflamatorios o en la finalización de la inflamación. Sin embargo, su presencia puede provocar efectos nocivos en patologías como el cáncer. Los macrófagos reparadores adquieren una gran relevancia en el microambiente de tumores sólidos, constituyendo sobre el 50 % de la masa tumoral [Solinas y col., 2009]. Altos niveles de macrófagos reparadores están correlacionados con la proliferación de las células tumorales en diversos tumores, como cáncer de mamas, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de endometrio y ovarios [Balkwill, 2004; Tsutsui y col., 2005; Lewis y Pollard, 2006]. Esto se debe a que promueve un microambiente tolerante para el crecimiento del tumor, así como la secreción de citoquinas y proteasas que promueven la angiogénesis, el crecimiento, metástasis e inmunosupresión [Mantovani y col., 2002; Hao y col., 2012]. Interesantemente, se ha visto un aumento de la expresión del receptor de manosa CD206 en los macrófagos asociados a tumores (TAMs) en todos los modelos de tumor estudiados, y se utiliza comúnmente como un marcador de macrófagos en tumores *in vivo* [Movahedi y col., 2012]. En el contexto de un microambiente tumoral,

donde se encuentran muchas moléculas altamente glicosiladas, el receptor de manosa puede reconocerlas e internalizarlas [Allavena y col., 2010]. Estas moléculas glicosiladas pueden interferir en la producción de IL-10 inducida por LPS, aumentando la secreción de esta citoquina inmunoreguladora. En un microambiente tumoral IL-10 promueve la mantención de un microambiente supresor inhibiendo la diferenciación de linfocitos T_H1 mientras favorece los T_{reg} [Allavena y col., 2010]. Por lo tanto, las moléculas glicosiladas que se encuentran en el microambiente tumoral al ser reconocidas por el receptor de manosa refuerzan el fenotipo inmunosupresor, lo que podría ocurrir con nuestros macrófagos generados. La polarización de macrófagos inducida por plaquetas genera un fenotipo caracterizado por la alta expresión del receptor de manosa y la producción de IL-10, equivalente al fenotipo de los macrófagos asociados a tumores. Sería interesante evaluar si los macrófagos potencian su fenotipo supresor al encontrarse en un microambiente tumoral.

Por otro lado, las plaquetas también se han asociado a la progresión de diversos cánceres, y el uso de antiplaquetarios ha sido reportado como un tratamiento efectivo en algunos tipos de neoplasias [Smyth y col., 2009]. Existen diversos mecanismos por los cuales las plaquetas pueden favorecer el crecimiento tumoral y la angiogénesis, pero no se ha establecido si una interacción con los macrófagos podría formar parte de estos mecanismos. Nuestros resultados sugieren que las plaquetas son capaces de interactuar con los macrófagos permitiendo su polarización hacia un fenotipo característico de macrófagos asociados a tumores, el cual propicia la mantención y propagación del tumor. Posteriores estudios *in vivo* permitirán validar esta suposición e

iniciar la generación de blancos terapéuticos que impidan la interacción plaqueta-macrófago humanos como estrategia para los tratamientos contra el cáncer.

Repolarización de macrófagos en enfermedades inflamatorias o autoinmunes: Uso biomédico de plaquetas

El control de algunas patologías como la aterosclerosis o la artritis por ejemplo, puede verse favorecidas por la reconversión de macrófagos inflamatorios hacia perfiles reparadores. En el caso de la aterosclerosis, la enfermedad se caracteriza por la acumulación de macrófagos proinflamatorios en placas de ateroma, favoreciendo la inflamación mediante la secreción de mediadores de inflamación y proteasas de matriz extracelular. Estos hechos promueven apoptosis y necrosis celular, tras la cual liberan lípidos y otros factores que forman un núcleo necrótico pro-trombótico, causante de un infarto al miocardio o de accidentes cerebrovasculares [Moore y col., 2013]. En este sentido, la repolarización hacia macrófagos reparadores productores de IL-10, fomentaría la reparación de tejido, la formación de colágeno y la reducción de especies reactivas de oxígeno que dañan células endógenas, favoreciendo además, la remoción de células muertas y debris mediante receptores endocíticos [Moore y col., 2013]. Así mismo, en el proceso artrítico existe daño articular ocasionado por macrófagos inflamatorios. La inyección de PRP en zonas afectadas podría reconvertir macrófagos hacia un perfil reparador y favorecer la regeneración del tejido dañado.

CONCLUSIÓN

En este estudio demostramos *in vitro* que macrófagos derivados de monocitos humanos adquieren un fenotipo reparador al ser estimulados durante 24 hrs con plaquetas íntegras, no activadas. Este fenotipo consiste en un aumento de la expresión del receptor de manosa CD206, la disminución de CD163 y CD86 y la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, características de este perfil de macrófagos. Nos queda pendiente, definir con mayor precisión la plasticidad del macrófago y su transición entre un estado inflamatorio y otro reparador. Este proceso dinámico entre plaquetas y macrófagos podría darse *in vivo*, por lo que es necesario tenerlo en cuenta en los procesos de inflamación y reparación de tejido de una lesión, y su uso potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan tratar enfermedades relacionadas con inflamaciones crónicas. Por último, estos resultados constituyen una investigación preliminar de lo que podría ocurrir entre plaquetas y macrófagos para favorecer el microambiente tumoral, en la mantención y progresión del cáncer

BIBLIOGRAFÍA

- Allavena P., Chieppa M., Bianchi G. 2010. "Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages". *Clin Dev Immunol.* 2010: 547179.
- Ammon C., Meyer S.P., Schwarzfischer L. 2000. "Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells". *Immunology.* 100: 364-369.
- Ammon C., Kreutz M., Rehli M. 1998. "Platelets induce monocyte differentiation in serum-free coculture". *J Leukoc Biol.* 63(4): 469-76.
- Andia I., Maffulli N. 2013. "Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis". *Nature Reviews Rheumatology.* 9: 721-730.
- Aviram M., Brook J.G. 1987. "Platelet activation by plasma lipoproteins". *Prog Cardiovasc Dis.* 30(1): 61-72.
- Balkwill, F. 2004. "Cancer and the chemokine network". *Nat. Rev. Cancer.* 4: 540-550.
- Blakytyn R., Ludlow A., Martin G.E. 2004. "Latent TGF-beta1 activation by platelets". *J Cell Physiol.* 199(1): 67-76.
- Corraliza I.M., Soler G., Eichmann K., Modolell M. 1995. "Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages". *Biochem Biophys Res Commun.* 206(2): 667-73.
- Davis M.J., Tsang T.M., Qiu Y. 2013. "Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection". *MBio.* 4(3): e00264-13.
- de las Casas-Engel M., Domínguez-Soto A., Sierra-Filardi E. 2013. "Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7". *J Immunol.* 190(5): 2301-10.
- Erwig L-P., Henson P.M. 2008. "Clearance of apoptotic cells by phagocytes". *Cell Death & Differentiation.* 15: 243-250.

Ferracini M., Rios F.J., Pecenin M. 2013. "Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor". *Mediators Inflamm.* 2013: 950273.

Fristma G.A. 1988. "Platelet production and structure". *Hemostasis and Trombosis in the Clinical Laboratory*. Philadelphia. JB Lippincott. 206-228.

Gay LJ, Felding-Habermann B. 2011. "Contribution of platelets to tumour metastasis". *Nat Rev Cancer.* 11(2): 123-134.

Gazi U., Martinez-Pomares L. 2009. "Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology.* 214(7): 554-61.

Geissmann, F. 2000. "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells". *Science.* 327(5966): 656-61.

Gordon S., Taylor P. R. 2005. "Monocyte and macrophage heterogeneity". *Nature Rev. Immunol.* 5, 953-964.

Goubran H.A., Kotb R.R., Stakiw J. 2014. "Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment". *Cancer Growth Metastasis.* 7: 9-18.

Grainger D.J., Wakefield L., Bethell H.W. 1995. "Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin". *Nat Med.* 1(9): 932-7.

Gregory C.D., Devitt A. 2004. "The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically?". *Immunology.* 113:1-14.

Hajishengallis G., Lambris J.D. 2011. "Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity". *Nature Reviews Immunology.* 11(3): 187-200.

Hasan D., Chalouhi N, Jabbour P., Hashimoto T. 2012. "Macrophage imbalance (M1 vs. M2) and up regulation of mast cells in wall of ruptured human cerebral aneurysms: preliminary results". *Journal of Neuroinflammation.* 9: 222.

Hao N.B., Lü M.H., Fan Y.H. 2012. "Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors". *Clinical and Developmental Immunology.* 2012: 948098.

Heemskerk J.W., Mattheij N.J., Cosemans J.M. 2013. "Platelet-based coagulation: different populations, different functions". *J Thromb Haemost.* 11(1): 2-16.

Iyer S.S., Ghaffari A.A., Cheng G. 2010. "Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages". *J. Immunol.* 185(11): 6599-607.

- Khazen W., M'bika J. P. 2005. "Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes". *FEBS Lett.* 579 (25): 5631–4.
- Lee S.J., Evers S., Roeder D., Parlow A.F. 2002. "Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis". *Science.* 295 (5561): 1898–901.
- Lewis C.E., Pollard J.W., 2006. "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments". *Cancer Research.* 66 (2): 605–612.
- Li C, Li J, Li Y, Lang S, Yougbare I, Zhu G. 2012. "Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries". *Adv Hematol.* 2012: 384685.
- Mackness, G. B. 1964. "The immunological basis of acquired cellular resistance". *J. Exp. Med.* 120: 105–120.
- Maitre B., Mangin P.H., Eckly A. 2010. "Immature myeloid dendritic cells capture and remove activated platelets from preformed aggregates". *J Thromb Haemost.* 8(10): 2262-72.
- Maja M., Sandford R. S. 1992. "Effects of Gamma Interferon on Release of Tumor Necrosis Factor Alpha from Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocyte-Derived Macrophages". *INFECTION AND IMMUNITY.* 3756-3762.
- Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R. 2013. "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling". *Journal of Pathology.* 229: 176–185.
- Mantovani A., Sica A., Allavena P., Garlanda C. 2009. "Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation". *Human Immunology.* 70: 325–330.
- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P. 2004. "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization". *Trends Immunol.* 25: 677–686.
- Martinez F.O., Helming L., Gordon S. 2009. "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective". *Annu Rev Immunol.* 27: 451-83.
- Martinez F., Gordon S., Locati M. 2006. "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression". *J Immunol.* 177(10): 7303-11.
- Martinez-Pomares L. 2008. "The homeostatic properties of the mannose receptor in health and disease". *Immunology.* 27(3): 132-140.

- Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M. 1998. "Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 85(6): 638-46.
- Mazzocca A.D., McCarthy M.B., Chowanec D.M. 2012. "Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability". *J Bone Joint Surg Am.* 94(4): 308-316.
- Menica-Huerta JM, Duval D, Benveniste J. 1978. "Macrophage origin of platelet activating factor". *C R AcadSciHebdSeancesAcadSci D.* 286(2): 241-4.
- Moore K.J., Sheedy F.J., Fisher E.A. 2013. "Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance". *Nat Rev Immunol.* 13(10): 709-21.
- Movahedi K., Schoonooghe S., Laoui D. 2012. "Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages". *Cancer Res.* 72(16): 4165-77.
- Murray P.J., Wynn T.A. 2011. "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets". *Nat Rev Immunol.* 11(11): 723-37.
- Nunes I., Gleizes P.E., Metz C.N. 1997. "Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta". *J Cell Biol.* 10;136(5): 1151-63.
- Nurden A.T., Nurden P., Sanchez M. 2008. "Platelets and wound healing". *Front Biosci.* 13: 3532-48.
- Odegaard J.I. y Chawla A. 2008. "Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance". *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism.* 4(11): 619-626.
- Passacquale G., Vamadevan P., Pereira L. 2011. "Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes". *PLoS One.* 6(10): e25595.
- Persson J., Nilsson J., Lindholm M.W. 2006. "Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages". *Lipids Health Dis.* 5:17.
- Philippidis P., Mason J. C., Evans E. J. 2004. "Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery". *Circ Res.* 94(1): 119-26.

- Porcheray F., Viaud S., Rimaniol A.C. 2005. "Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation". *Clin Exp Immunol.* 142(3): 481-9.
- Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C.H. 2012. "In Vitro Generation of Monocyte-Derived Macrophages under Serum-Free Conditions Improves Their Tumor Promoting Functions". *PLOS ONE.* 7(8): e42656.
- Rodak B.F., Fritsma G.A., Keohane E. 2011. "Hematology: Clinical Principles and Applications". 4e. Saunders, Elsevier Inc. Capítulo 12, páginas: 144-146.
- Semple J.W., Italiano J.E., Freedman J. 2011. "Platelets and the immune continuum". *Nat Rev Immunol.* 11(4): 264-74.
- Scull C.M., Hays W.D., Fischer T.H. 2010. "Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets". *J. Inflamm. (Lond.).* 7:53.
- Sica A., Larghi P., Mancino A. 2008. "Macrophage polarization in tumour progression". *Semin Cancer Biol.* 18(5): 349-55.
- Smyth S.S., McEver R.P., Weyrich A.S. 2009. "Platelet functions beyond hemostasis". *J Thromb Haemost.* 7(11): 1759-66.
- Solinas G., Germano G., Mantovani A. 2009. "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation". *J Leukoc Biol.* 86(5): 1065-73.
- Stahl P.D., Ezekowitz R.A. 1998. "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense". *Curr. Opin. Immunol.* 10 (1): 50-5.
- Steed D.L. 1997. "The role of growth factors in wound healing". *Surg Clin North Am.* 77(3): 575-86.
- Svensson Holm A.C., Bengtsson T., Grenegård M. 2008. "Platelets stimulate airway smooth muscle cell proliferation through mechanisms involving 5-lipoxygenase and reactive oxygen species". *Platelets.* 19(7): 528-36.
- Thomas D.W., Rocha P.N., Nataraj C. 2003. "Proinflammatory actions of thromboxane receptors to enhance cellular immune responses". *J Immunol.* 171(12): 6389-95.
- Tian S., Zhang L., Tang J. 2015. "HMGB1 exacerbates renal tubulo interstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury". *Am J Physiol Renal Physiol.* 308(1): F69-75.

Tsutsui S., Yasuda K., Suzuki K. 2005. "Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density". *Oncology Reports*. 14(2): 425–431.

Uutela M., Wirzenius M., Paavonen K. 2004. "PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis". *Blood*. 104(10): 3198-204.

Villalta S. A., Nguyen H. X., Deng B. 2009. "Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy". *Hum. Mol. Genet.* 18, 482–496.

Von Hundelshausen P., Weber C. 2007. "Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease". *Circ Res*. 100(1): 27-40.

Weyrich A.S., Zimmerman G.A. 2004. "Platelets: signaling cells in the immune continuum". *Trends Immunol.* 25(9): 489-95.

ANEXO

ANEXO 1. Concentración plaquetaria en la sangre.

La concentración de plaquetas fue medida en la sangre además de en las fracciones PRP y PPP. Se realizó para 6 pacientes (Figura Anexo 1) y demuestran que la concentración de plaquetas basales (en la sangre) y en el PPP es la misma, pudiendo mantener a PPP como un control basal y limpio de plaquetas para los resultados mostrados en la tesis.

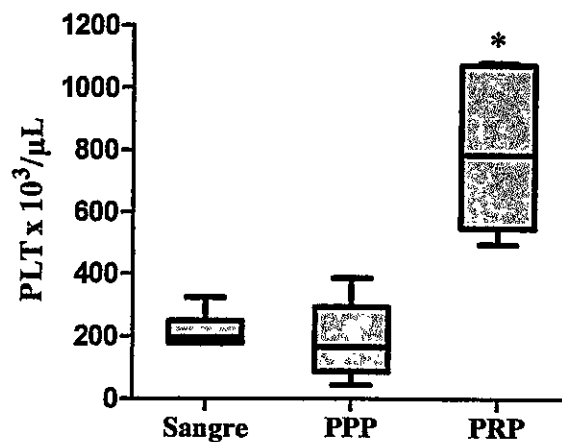


Figura Anexo 1: Comparación de la concentración plaquetaria en las dos fracciones plaquetarias y la sangre. Se analizó por hemocitómetro el contenido de plaquetas en la sangre y las fracciones PRP y PPP de 6 donantes sanos. Las barras indican el promedio \pm SEM. * = $p < 0,05$, en comparación a el contenido plaquetario en la sangre.

ANEXO 2. Efecto del suero en la estimulación de macrófagos.

Para descartar que el efecto de las plaquetas sobre los macrófagos se debiera al suero presente en el PRP y SRFC, previo a los resultados presentados en la tesis evaluamos el efecto del suero y plaquetas por separado en la expresión de marcadores de superficie. A partir de los resultados presentados en las siguientes figuras, se puede observar que la expresión de CD86 no presentó diferencias al estimular macrófagos con suero, pero hay una tendencia a disminuir la expresión de CD206. Esto permite descartar que el efecto del suero presente en el PRP o SRFC sea el que aumente el receptor de manosa característico de macrófagos reparadores. Cabe destacar que al estimular macrófagos solo con SRFC derivado de plaqueta no hubo diferencias en el marcador CD206, por lo que el SRFC parecería mantener el receptor de manosa pese a al suero.

En estos experimentos preliminares vimos una tendencia a aumentar la expresión de CD86 mediante el SRFC derivado de plaquetas activadas. Pero, como se muestra en los resultados de la tesis, al aumentar el "n" no vimos diferencias significativas. Además, en estos resultados también se muestra que al utilizar una concentración menor de SRFC derivado de plaquetas activadas (10%), no se generó un efecto en la expresión de marcadores de superficie. Razón por la que se estimularon los macrófagos directamente con SRFC (100%).

A modo de conclusión, estos resultados preliminares permitieron descartar el control de suero y la utilización de concentraciones menores de SRFC derivado de plaquetas para estimular a los macrófagos.

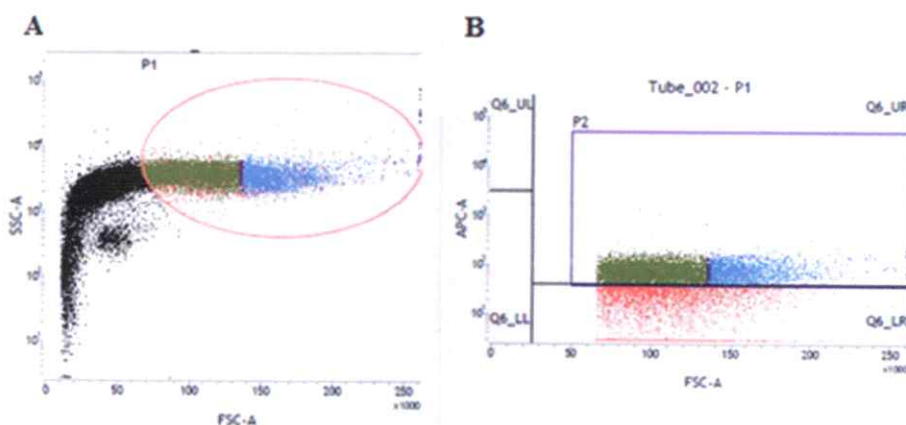


Figura Anexo 2: Selección de población de macrófagos. En A se ve la selección de la población P1 de macrófagos por tamaño (FSC) y granulosidad (SSC). En B se ve la población positiva para CD32 (P2), un marcador de nuestros macrófagos generados.

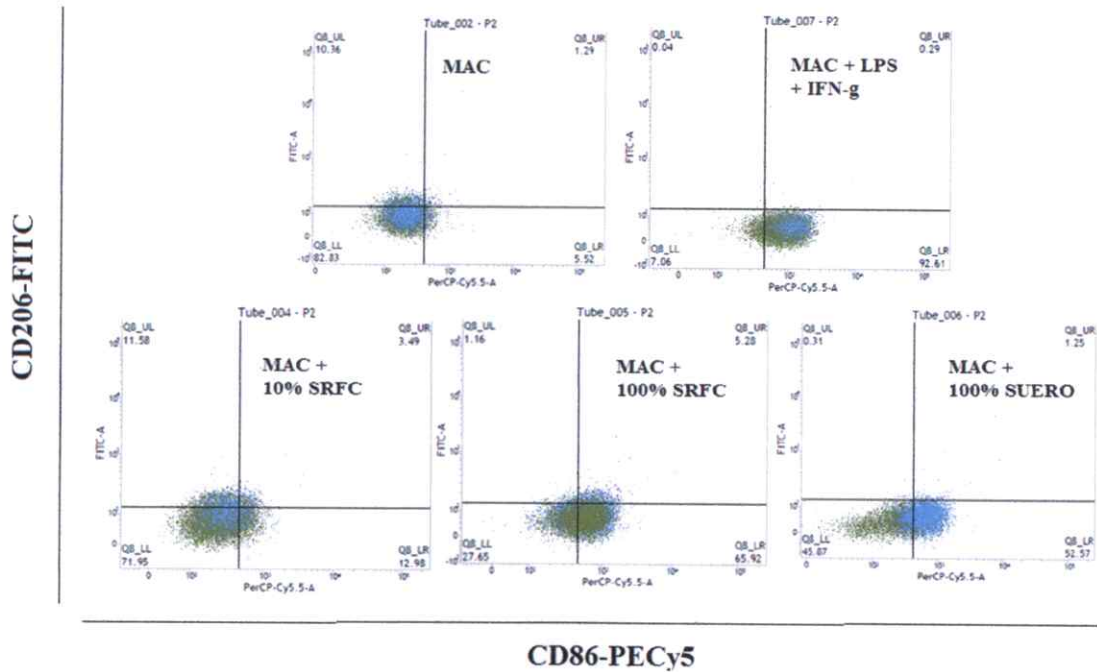


Figura Anexo 3: Dot plot de la Expresión de marcadores de superficie en macrófagos estimulados con 10% SRFC, 100% SRFC y 100% suero. Las condiciones corresponden a: 1) Macrófagos sin estímulo adicional (MAC), como control sin estímulo. 2) Macrófagos estimulados con LPS mas IFN- γ (MAC+LPS+IFN-g). 3) Macrófagos estimulados con 10 % de SRFC derivados de plaquetas activadas y 90% RPMI 10% SFB (MAC+10%SRFC). 4) Macrófagos estimulados con 100% SRFC (MAC+100%SRFC). 5) Macrófagos estimulados solo con suero AB obtenido de Banco de Sangre del Hospital Clínico de la U. de Chile (MAC+100% SUERO), como control para descartar el efecto del suero presente en el SRFC. Los macrófagos se estimularon bajo las diferentes condiciones durante 24 hrs. y luego se marcaron con anticuerpos para ser analizados mediante citometría de flujo. El análisis mostrado de CD206 y CD86 se realizó partir de la selección de la población mostrada en la Figura Anexo 2.

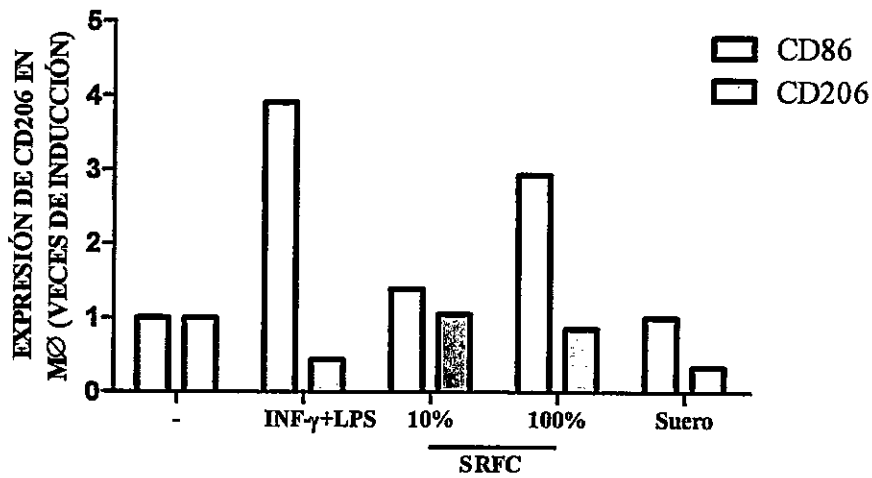


Figura Anexo 4: Evaluación de marcadores de superficie en macrófagos estimulados con SRFC y suero. Expresión de marcadores en la superficie de macrófagos estimulados durante 24 hrs. con: LPS mas IFN- γ , 10 o 100% de SRFC derivado de plaquetas, suero AB o sin estímulo adicional (-). Las células fueron marcadas con distintos anticuerpos conjugados y analizados por citometría de flujo. Se muestra la expresión en veces de inducción de CD206 y CD86 en las diferentes condiciones de MØ, a partir de la selección de la población mostrada en la Figura Anexo 2. El experimento se realizó para una muestra.

ANEXO 3. Expresión de CD86 en macrófagos estimulados con concentraciones crecientes de plaquetas.

En los experimentos realizados en la tesis, utilizó una relación de 1:1000 entre macrófagos / plaquetas. En esa razón, los marcadores CD206 y CD86 varían su expresión en el macrófago. Para determinar si el cambio fenotípico observado anteriormente es o no dosis-dependiente se estimuló a los macrófagos con diferentes concentraciones plaquetarias, generándose una relación de 1/125, 1/250, 1/500, 1/1000 entre macrófago / plaqueta. A continuación se muestra la expresión del marcador CD86. Si bien no se observó una curva dosis respuesta como en la expresión de CD206, encontramos un máximo de expresión en las razones 1/250 y 1/500, mientras que no se observó un cambio en la expresión de CD86 en las concentraciones de 1/125 y 1/1000. El resultado de la expresión de CD86 en la concentración 1/ 1000 concordó con nuestro resultado anterior. De acuerdo a estos resultados, el máximo aumento en los dos marcadores se logra con una concentración de 500 plaquetas por cada macrófago.

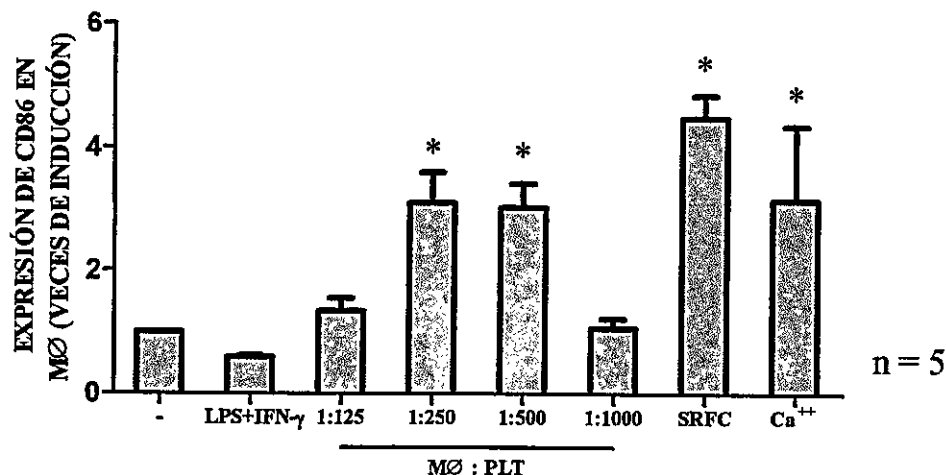


Figura Anexo 5: Expresión de CD86 en macrófagos estimulados con cantidades crecientes de plaqueta. Se co-incubaron macrófagos con plaquetas en una dosis creciente de plaquetas, durante 24 hrs. Las condiciones corresponden a: macrófagos más LPS e IFN- γ (LPS + IFN- γ), relación macrófago: plaqueta 1:125; 1:250; 1:500; y 1:1000, macrófagos más SRFC (SRFC), macrófagos más cloruro de calcio (Ca²⁺) y sin estímulo adicional (-). Las células fueron marcadas con anticuerpos conjugados y analizados por citometría de flujo. Se muestra la expresión en veces de inducción de CD86 en las diferentes condiciones de macrófagos. El experimento se realizó para un n = 5. Las barras indican promedio \pm SEM. *: p<0,05.

ANEXO 4. Actividad metaloproteasa en diferentes perfiles de macrófagos.

Además de la expresión de marcadores y la producción de citoquinas, evaluamos la actividad de MMP9, una metaloproteasa envuelta en la degradación de matriz extracelular, en macrófagos no polarizados, proinflamatorios y estimulados con SRFC derivado de plaquetas activadas. Se observó (Figura anexo 6) que todos los macrófagos presentan actividad metaloproteasa. También pareciera haber una leve disminución de la actividad en los macrófagos estimulados con SRFC. Dado que este resultado no nos permitió efectuar una diferencia clara entre los perfiles de macrófagos generados, no realizamos este ensayo al utilizar plaquetas completas. Pero no descartamos evaluar la actividad metaloproteasa de esta y otras proteínas en experimentos posteriores, ya que cumplen roles claves en diferentes procesos biológicos que podrían estar relacionados al perfil inmunológico del macrófago.

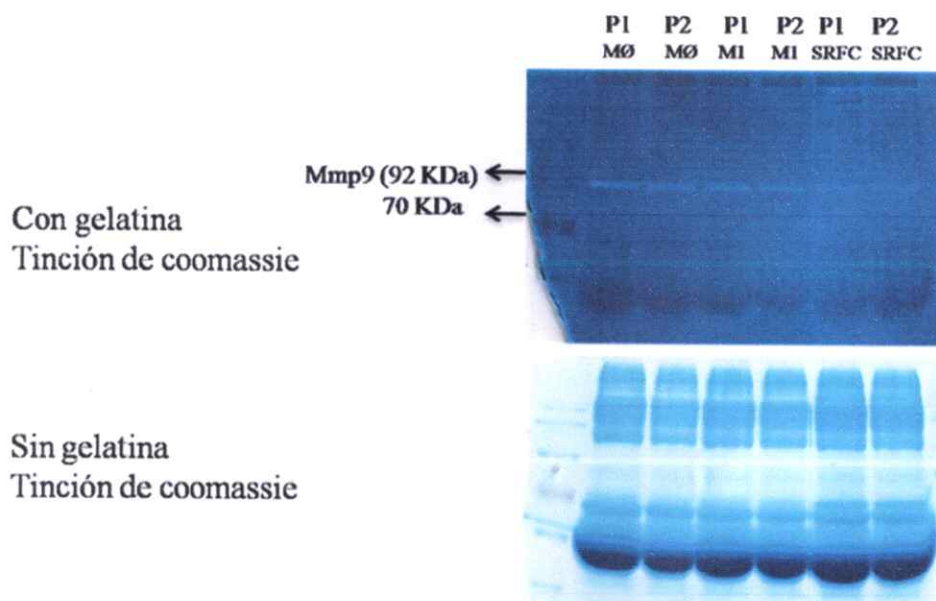


Figura Anexo 6: Actividad MMP9 en diferentes perfiles de macrófagos. Se evaluó la actividad de metaloproteasa de matriz bajo diferentes condiciones: 1) Macrófagos sin estímulo adicional (MØ). 2) Macrófagos estimulados con LPS mas IFN- γ durante 24 hrs., como control de macrófagos proinflamatorios (M1). 3) Macrófagos estimulados por 24 hrs. con SRFC derivado de plaquetas activadas (SRFC). Luego se recuperó el sobrenadante, se separaron las proteínas mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con gelatina 0,5%, como sustrato para la detección de actividad enzimática de MMP9. La actividad se reveló mediante una tinción de coomassie. Se realizó un segundo gel sin gelatina como control de carga de proteína. Se realizó el experimento para 2 pacientes (P1 y P2).

ANEXO 5. Histograma de la expresión de CD206 en macrófagos proinflamatorios incubados con el sobrenadante de macrófagos estimulados con plaquetas.

Con el fin de estudiar una posible repolarización de macrófagos proinflamatorios con macrófagos reparadores obtenidos del tratamiento con plaquetas. Estimulamos macrófagos proinflamatorios con el sobrenadante de macrófagos tratados con plaquetas y evaluamos la expresión de CD206. A continuación se muestra un histograma representativo para la expresión de CD206 en las diferentes condiciones de macrófagos.

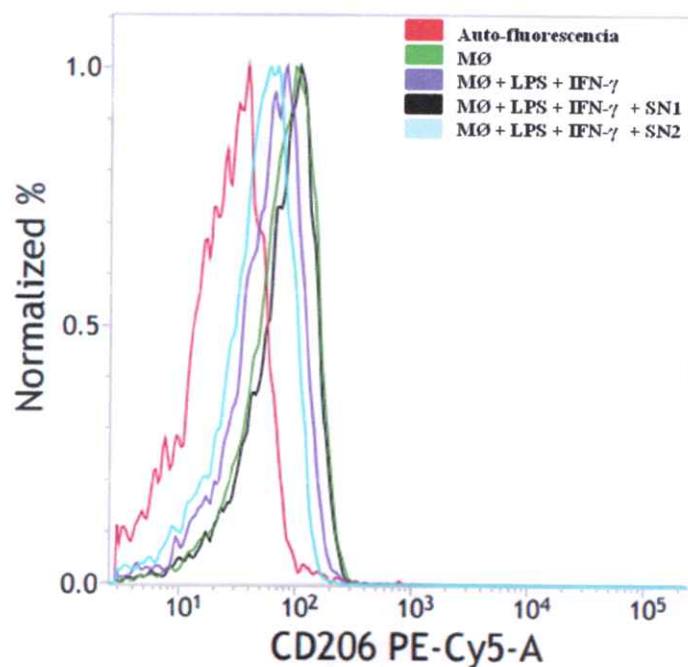


Figura Anexo 7: Histograma expresión CD206 en macrófagos proinflamatorios estimulados con el sobrenadante de macrófagos tratados con plaquetas.