



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

*“Caracterización de la activación de células mononucleares de sangre periférica humana después de migrar a través de monocapas de células endoteliales”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

JESSICA LAKSHMI PRIETO CHÁVEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** PROFESOR: RODOLFO PASTELIN PALACIOS  
**VOCAL:** PROFESOR: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE  
**SECRETARIO:** PROFESOR: LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO  
**1er. SUPLENTE:** PROFESOR: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ  
**2° SUPLENTE:** PROFESOR: ARACELI MENDIETA RERGIS

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

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS)

---

**ASESOR DEL TEMA: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**

---

(Nombre y firma)

**SUPERVISOR TÉCNICO: CDR. ISMAEL MANCILLA HERRERA**

---

(Nombre y firma)

**SUSTENTANTE: JESSICA LAKSHMI PRIETO CHÁVEZ**

---

(Nombre y firma)

## ABREVIATURAS

AAD	Aminoactinomicina D
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> : Células presentadoras de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
CBA	<i>Cytometric Bread Array</i> : Arreglos citométricos de perlas
CD	Clúster de diferenciación
CDAMs	<i>Cell death-associated molecules</i> : Moléculas asociadas a muerte celular
CE	Células endoteliales
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CMSP M	CMSP incubadas en ausencia de CE
CMSP ME	CMSP migrantes
CMSP MS	CMSP en contacto con factores solubles de CE
CTSG	Catepsina G
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> : Patrones moleculares asociados a daño
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> : Ácido desoxirribonucleico
EBM	<i>Endothelial basal medium</i> : Medio basal para células endoteliales
EGM	<i>Endothelial cell growth medium</i> : Medio de crecimiento para células endoteliales
ESL	<i>E-selectin ligand</i> : Ligando de E-selectina
ESAM	<i>Endothelial cell-selective adhesion molecule</i> : Molécula de adhesión selectiva de células endoteliales
FcR	<i>Fc receptor</i> : Receptor de Fc
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> : Isocianato de fluoresceína
fMLP	N-formil péptidos
FPR	<i>Formyl peptide receptors</i> : Receptor humano de formil-péptidos
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> : Proteína verde fluorescente
GPCR	<i>G protein coupled receptors</i> : Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosin trifosfato
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> : Células endoteliales aisladas de vena de cordón umbilical humano
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> : Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleucina
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> : Inmunorreceptores basados en motivos de activación
JAM	<i>Junctional adhesion molecules</i> : Molécula de adhesión cruzada
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> : Cinasa c-Jun N-terminal
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i> : Antígeno linfocítico asociado a función
LPS	Lipopolisacárido
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MAC	<i>Macrophage antigen</i> : Antígeno de macrófagos
MAdCAM	<i>Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule</i> : Molécula de adhesión celular adresina de mucosa
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i> : Proteínas activadas por mitógenos

MAPK	MAP cinasas
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i> : Proteína quimioatrayente de monocitos
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> : Proteína inflamatoria de macrófagos
mtDNA	<i>Mitochondrial DNA</i> : DNA mitocondrial
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i> : Proteína inhibidora de apoptosis neuronal
NK	<i>Natural killers</i> : Células asesinas naturales
NLR	<i>NOD-like receptor</i> : Receptor tipo NOD
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i> : Dominio de oligomerización de nucleótidos
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> : Patrones moleculares asociados a patógenos
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PLC	<i>Phospholipase C</i> : Fosfolipasa C
PB	<i>Pacific Blue</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> : Buffer salino de fosfatos
PE	<i>Phycoerythrin</i> : Ficoeritrina
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> : Molécula de adhesión plaquetaria/endotelial
PI	<i>Phosphoinositide</i> : Fosfoinositol
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> : Receptor de reconocimiento de patrón
PSGL	<i>P-selectin glycoprotein ligand</i> : Glicoproteína ligando de la P-selectina
RIG	<i>Retinoic acid-inducible gene</i> : Genes inducibles por ácido retinoico
RLR	<i>RIG-like receptor</i> : Receptor tipo RIG
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i> : Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SNC	Sistema nervioso central
ssRNA	<i>Single stranded ribonucleic acid</i> : Ácido ribonucleico de cadena sencilla
TLR	<i>Toll-like receptor</i> : Receptor tipo <i>Toll</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> : Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> : Molécula de adhesión celular vascular
VE	Vascular-endotelial

# ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Marco teórico .....</b>	<b>2</b>
<i>Proceso inflamatorio.....</i>	<i>3</i>
<i>Reclutamiento, migración y participación de leucocitos en el proceso inflamatorio .....</i>	<i>4</i>
<i>Subclases de monocitos circulantes y su relación con el proceso inflamatorio.....</i>	<i>7</i>
<i>Liberación de DAMPs durante lesión tisular.....</i>	<i>9</i>
<i>N-formil péptidos, como agentes quimioatrayentes, y sus receptores .....</i>	<i>10</i>
<i>Efecto del contacto con endotelios en la funcionalidad de leucocitos.....</i>	<i>11</i>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>12</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>12</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivos particulares .....</b>	<b>13</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>14</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>19</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>27</b>
<b>Conclusión .....</b>	<b>32</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>33</b>

## Resumen

En la respuesta inflamatoria aguda localizada es indispensable el reclutamiento de leucocitos circulantes hacia el sitio de lesión, lo cual requiere de la activación del endotelio a través del que migran los leucocitos en respuesta a agentes quimiotácticos; éstos pueden ser moléculas secretadas después de la activación de células del sistema inmunológico y no inmunológica, o bien componentes celulares que funcionan como alarminas o DAMPs. Entre estas últimas se encuentran los fMLP, parte de las proteínas mitocondriales, que pueden ser reconocidos por receptores expresados en monocitos, linfocitos y neutrófilos. Es indispensable que las células endoteliales estén activadas para permitir que los leucocitos se frenen y migren a través de ellas. Se ha descrito que este contacto induce en leucocitos humanos la expresión de moléculas de adhesión y MMPs indispensables para su desplazamiento en el tejido; además, el contacto con células endoteliales aumenta la resistencia a apoptosis de monocitos pro-inflamatorios. Algunos reportes recientes sugieren que la actividad inflamatoria se favorece con el contacto con células endoteliales, ya que aumenta la producción de quimiocinas; sin embargo no está claro si otras respuestas, como la secreción de citocinas y fagocitosis, que también forman parte de la respuesta inflamatoria, se modifican después del contacto con células endoteliales. Nuestro objetivo fue analizar el efecto de las células endoteliales sobre el fenotipo inflamatorio de CMSP en presencia de fMLP como agente quimioatractivo, utilizando un modelo de migración *in vitro*.

Observamos que son los monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) los que preferentemente migran en nuestro modelo a las 4 horas en presencia de fMLP (0.457 nM). La cantidad de citocinas y quimiocinas en sobrenadante es menor en las CMSP migrantes respecto a aquellas que no tuvieron contacto con células endoteliales. Esta disminución en la secreción de citocinas no depende de la dosis de LPS utilizada y no es debida a cambios (disminución o aumento) en la expresión de TLR-4 en la superficie de los monocitos. La capacidad de fagocitosis de bacterias *E. coli* opsonizadas tiende a aumentar en células migrantes respecto a las no migrantes, pero sin alcanzar diferencias significativas. Concluimos que el contacto con células endoteliales, y en presencia de un gradiente quimiotáctico, disminuye el fenotipo inflamatorio en monocitos, lo cual *in vivo* podría estar relacionado con respuestas de contención y/o resolución de la inflamación y a favor de la reconstitución del tejido.

## Marco Teórico

La inflamación es una respuesta de tejidos vascularizados ante el daño producido por un agente de naturaleza microbiológica, química o física. Es un proceso de vital importancia, ya que, después de las barreras físicas, es la primera línea de defensa del organismo. De su adecuado desarrollo depende la eliminación de agentes infecciosos o detritus celulares y la restitución del tejido<sup>1</sup>.

El proceso de inflamación local requiere de la activación de células residentes del tejido (ej. células epiteliales y macrófagos residentes), de células endoteliales y de leucocitos circulantes que migrarán hacia el tejido, atraídos por gradientes de quimiocinas y citocinas. La activación endotelial, indispensable para favorecer que los leucocitos circulantes se frenen y atraviesen las paredes vasculares hacia el tejido, también depende de estos mediadores solubles. Una vez en el tejido, neutrófilos y monocitos comienzan los procesos de fagocitosis y estallido respiratorio, lo que ayuda a controlar la infección por microorganismos y/o depurar detritus celulares. Fisiológicamente, se requiere que se redireccione el proceso inflamatorio a fin de favorecer los mecanismos de reconstrucción del tejido. En esta última fase predomina la presencia de citocinas anti-inflamatorias y la actividad de células reguladoras<sup>1,2</sup>.

En caso de que el daño y los mediadores inflamatorios no puedan ser contenidos, el proceso inflamatorio se puede extender, tanto en tiempo como espacio, dando así lugar a inflamación crónica, granulomatosa o procesos de inflamación sistémica<sup>1</sup>. En estos estados patológicos donde fallan los mecanismos de contención de la inflamación, los monocitos activados participan en el desarrollo de aterosclerosis<sup>3</sup>, hipertensión arterial<sup>4</sup> y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)<sup>5</sup>.

### *Proceso inflamatorio*

La respuesta inflamatoria típica consiste de cuatro componentes: inductores inflamatorios, receptores que los detectan, mediadores inflamatorios inducidos por estos últimos, y los tejidos que son blanco de estos mediadores<sup>1</sup>.

En condiciones basales, las células del endotelio vascular mantienen y regulan el flujo sanguíneo, controlan la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos y pueden interactuar por tiempos cortos con algunos leucocitos<sup>6</sup>. Durante el proceso inflamatorio, el endotelio vascular establece interacciones directas con los leucocitos circulantes mediante integrinas y selectinas (por ejemplo, P-selectina, E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1), contacto indispensable para la migración hacia los tejidos<sup>7, 8</sup>; adicionalmente, el endotelio puede también liberar factores de crecimiento y mediadores inflamatorios hacia el sitio de inflamación<sup>7, 8</sup>.

Para la migración transendotelial, en la región venular postcapilar de los vasos sanguíneos, se promueve el rápido reclutamiento de leucocitos por un proceso denominado “activación de células endoteliales”, definido como la adquisición de nuevas capacidades funcionales diferentes a las del resto de las células de éste tejido. Este proceso es inducido por mediadores inflamatorios que pueden ser primarios o secundarios. Los mediadores primarios son moléculas endógenas como las alarminas, también conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (por ejemplo, proteínas de choque térmico y DNA), o moléculas exógenas como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), entre los que se encuentran el lipopolisacárido (LPS) y la flagelina<sup>1</sup>. Por otro lado, entre los secundarios se encuentran citocinas inflamatorias ( $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  e  $IL-6$ , etc.), quimiocinas (MCP-1 e  $IL-8$ , entre otras), aminas vasoactivas (histamina) y eicosanoides (prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ )), todos los cuales se liberan ante diferentes inductores involucrados de la respuesta inflamatoria. Estos mediadores secundarios puede ser liberados por células residentes de los tejidos (como células epiteliales, macrófagos y células dendríticas) al ser reconocidos los inductores primarios por los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), entre los que se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs) o receptores tipo RIG (RLRs)<sup>1, 6</sup>.

### *Reclutamiento, migración y participación de leucocitos en el proceso inflamatorio*

La atracción de los leucocitos hacia el tejido dañado es un paso esencial en el proceso inflamatorio y la respuesta natural del huésped ante una infección u otro tipo de insulto. Las células migrantes en un tejido se encuentran con múltiples señales quimioatrayentes capaces de guiar su camino<sup>9</sup>. Entre los agentes quimioatrayentes más importantes y mejor descritos se encuentran las antes mencionadas quimiocinas<sup>10</sup>, que son citocinas liberadas por los leucocitos y células residentes de tejido, y que inducen la quimiotaxis o movilización de leucocitos hacia la zona de daño, siendo uno de sus principales efectos la activación dinámica de integrinas y otras moléculas de adhesión<sup>11-14</sup>.

Existen agentes quimiotácticos cuya liberación, a diferencia de las quimiocinas, es independiente de la activación de las vías de señalización de los PRRs, ya que estos otros quimioatrayentes se encuentran preformados en la célula e incluso pueden ser parte integral de estructuras subcelulares, como es el caso de los N-formil péptidos (fMLP) que se encuentran en productos proteicos provenientes de mitocondrias, y que se pueden liberar al morir las células<sup>15</sup>.

En las células endoteliales, los agentes quimiotácticos incrementan la expresión de las moléculas de adhesión y favorecen su movilización desde la superficie basal hacia la apical, lo que promueve la interacción de los leucocitos circulantes con las paredes vasculares activadas<sup>16</sup>. Esta comunicación celular es capaz de modificar el fenotipo y funcionalidad de los leucocitos, que estrechan su interacción con las células endoteliales para disminuir su velocidad (rodamiento, *rolling* en inglés) y poder migrar a los tejidos (diapédesis)<sup>16</sup>. En esta fase tiene gran importancia la interacción entre el antígeno asociado a función de linfocito tipo I (LFA-1) y la molécula de adhesión intercelular tipo I (ICAM-1) así como la participación de diferentes selectinas para la estabilización del contacto y reducción en la velocidad del rodamiento<sup>17, 18</sup>.

Las principales selectinas que median el anclaje de leucocitos en el proceso de migración son L-selectina (expresada en leucocitos), P-selectina y E-selectina (ambas expresadas en el endotelio activado), que son glicoproteínas de tipo 1 que se unen a hidrocarburos fucosilados y sialilados en forma dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )<sup>19</sup>. La

glicoproteína-1 ligando de la P-selectina (PSGL-1) es el ligando de mayor afinidad de estas tres selectinas; la asociación de PSGL-1 con L-selectina favorece la interacción leucocito-leucocito; así los leucocitos adheridos al endotelio facilitan la captura de otros leucocitos circulantes hacia el endotelio activado<sup>19</sup>. Así mismo, PSGL-1 es capaz de unirse a otras glicoproteínas, como CD44 y el ligando 1 de E-selectina (ESL-1)<sup>20</sup>. PSGL-1 es la principal molécula implicada en el anclaje inicial de monocitos, mientras que ESL-1 es necesario para convertir el anclaje inicial, que es transitorio, en un lento y más estable rodamiento. Finalmente, CD44 controla la velocidad del rodamiento e interviene en la polarización de PSGL-1 y L-selectina<sup>20</sup>.

Además de las selectinas y sus ligandos, existen otras moléculas con un papel muy importante en el anclaje de los monocitos al endotelio vascular, denominadas integrinas. Por ejemplo, las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  (expresada en linfocitos) y  $\alpha_4\beta_7$  (expresada en monocitos) interactúan con la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1 y la molécula de adhesión celular adresina de mucosa (MAdCAM)-1 respectivamente, mediando así el proceso de anclaje<sup>21</sup>.

En el caso específico de los monocitos, una vez que se anclan al endotelio y durante el rodamiento, monitorizan el repertorio de moléculas quimioatrayentes y ligandos de las integrinas presentes en el endotelio<sup>22</sup>. Este mecanismo también es mediado por la activación de las integrinas en los monocitos (en su mayoría las integrinas  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ), las cuales son requeridas para la migración hacia los tejidos<sup>22</sup>. En esta fase es que los monocitos, al reconocer IL-8 o MCP-1, pasan por un proceso de detenimiento o arresto<sup>23, 24</sup> en el que también intervienen ICAM-1 y VCAM-1<sup>25</sup>.

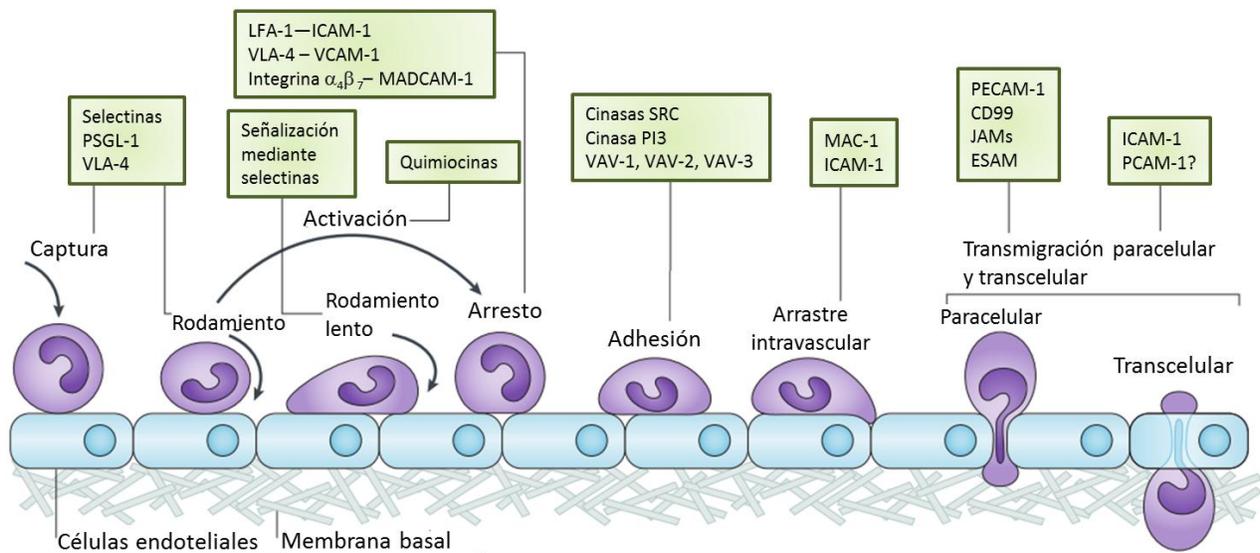
Los elementos fisiológicos que principalmente median la adhesión celular son las integrinas, y lo hacen a través de dos procesos: a) el incremento de la afinidad y de la avidéz y b) el incremento de la valencia de las mismas. Estos procesos ocurren en tiempos muy cortos que van desde milisegundos hasta minutos<sup>26-28</sup>. Se sabe que, además de la adhesión, las integrinas generan señales intracelulares que regulan la motilidad, capacidad de proliferación y apoptosis en los leucocitos<sup>29, 30</sup>.

Una vez frenados y adheridos al endotelio, los leucocitos atraviesan las paredes vasculares, lo que incluye penetrar la monocapa endotelial y la membrana basal

subyacente<sup>16, 19</sup>. Los extremos venosos de los vasos capilares, con espacios intercelulares más amplios que en el polo arterial, son los sitios donde primordialmente ocurren esta migración de leucocitos; aparentemente este proceso está guiado por neutrófilos y monocitos se “arrastran” (realizan *crawling*) por la pared del vaso sanguíneo, en un proceso que depende de MAC-1 e ICAM-1<sup>31, 32</sup>.

La extravasación de leucocitos a través del continuo endotelial puede ocurrir, como lo esquematiza la *Figura 1*, por dos mecanismos o vías: la vía paracelular y la transcelular<sup>33, 34</sup>. La vía paracelular es aquella en la que los leucocitos pasan a través de las uniones entre células endoteliales adyacentes; involucra la liberación o redistribución de cadherina vascular endotelial (VE-cadherina), ya que esta molécula podría obstaculizar el paso de los leucocitos<sup>35</sup>, y es facilitada por compartimentos intracelulares de membrana que contienen una reserva de la molécula de adhesión plaquetaria/endotelial tipo 1 (PECAM-1) y posiblemente otras moléculas de adhesión como la molécula de adhesión cruzada (JAM-A)<sup>36</sup>. La ruta transcelular ocurre en partes “delgadas” del endotelio dónde, por lo tanto, la distancia por recorrer para los leucocitos es menor y estos migran a través del cuerpo de las células endoteliales; se ha observado que este proceso se lleva a cabo en el sistema nervioso central (SNC), en distintos escenarios inflamatorios, como uveítis y etapas primarias de desmielinización autoinmunes<sup>34, 37-39</sup> y en modelos *in vitro*<sup>33, 40-42</sup>; aunque representa la ruta migratoria minoritaria (~5-20% de las células migrantes a través de HUVEC activadas con citocinas)<sup>33</sup> el proceso puede ser muy rápido (<1 min)<sup>40</sup>. Se ha observado que si el proceso de *crawling* se encuentra deshabilitado, la migración se retarda y ocurre preferentemente la vía transcelular sobre la paracelular<sup>32</sup>.

Es importante señalar que hacia la zona de daño se pueden convocar distintos leucocitos, importantes tanto para la respuesta inmunológica innata como adaptativa. En el infiltrado de inflamación aguda predominan neutrófilos, monocitos y células asesinas naturales (NK). Entre estas células se han descrito las que tienen una capacidad predominantemente inflamatoria, así como aquellas con capacidades anti-inflamatorias que pueden favorecer la limitación del proceso inflamatorio y los mecanismos de reconstitución del tejido<sup>16</sup>.



**Figura 1. Cascada de adhesión leucocitaria.** Las moléculas clave involucradas en cada paso se indican en los cuadros. ESAM, molécula de adhesión selectiva de células endoteliales; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular-1; JAM, molécula de adhesión cruzada; LFA-1, antígeno linfocítico asociado a función-1 (integrina  $\alpha_1\beta_2$ ); MAC-1, antígeno de macrófagos-1; MAdCAM-1, molécula de adhesión celular adreína de mucosa; PSGL-1, glicoproteína-1 ligando de la P-selectina; PECAM-1, molécula de adhesión plaquetaria/endotelial; cinasa PI3, fosoinositol-3 cinasa; VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular-1; VLA-4, antígeno muy tardío-4 (integrina  $\alpha_4\beta_1$ ). *Modificado de Ley, et. al.; Nat Rev Immunol, 2007.*

### Subclases de monocitos circulantes y su relación con el proceso inflamatorio

Se han descrito, en ratón, subpoblaciones de monocitos análogas a las humanas. En murinos estas subpoblaciones se caracterizan por la expresión del antígeno de superficie GR-1, una glicoproteína miembro del grupo de la familia de genes pertenecientes a Ly6 y que son empleados para identificar la procedencia hematopoyética de línea mieloide de las células de ratón<sup>43</sup>.

Los monocitos circulantes humanos se han clasificado de acuerdo a la expresión de las moléculas de superficie CD14 (co-receptor en la detección de LPS) y CD16 (receptor de Fc de baja afinidad)<sup>44</sup>. Dos subtipos principales han sido descritos: 1) los llamados "monocitos clásicos", con un patrón de expresión CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (o CD14<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>), cuyo fenotipo es más cercano a la descripción original de los monocitos, es decir, alta capacidad de fagocitosis y de secreción de citocinas proinflamatorias; representan el 90% de los monocitos en sangre periférica de humanos adultos sanos; y 2) los

“monocitos no-clásicos”, con patrón de expresión CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>++</sup>), que se encuentran en sangre periférica en una frecuencia de 10 a 15% de los monocitos en circulación. También ha sido propuesta una tercera clase de monocitos, con fenotipo CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, conocidos como “monocitos intermedios” y que corresponden al 2 a 5 % de los monocitos circulantes<sup>45, 46</sup>. Los monocitos Gr1<sup>+</sup>, son equivalentes a los monocitos clásicos humanos, mientras que los monocitos no-clásicos se asemejan a los monocitos Gr1<sup>-</sup>, que son descritos como los principales productores de citocinas inflamatorias tipo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en respuesta a lipopolisacárido (LPS)<sup>43</sup>. Asimismo, los monocitos Gr1<sup>-</sup>, después de una infección con *Listeria monocytogenes*, son los únicos productores de TNF- $\alpha$ , y en modelos de infección pulmonar e isquemia, los monocitos Gr1<sup>-</sup> cumplen la función de células guía en la extravasación de otros leucocitos, como neutrófilos, a los focos inflamatorios<sup>47, 48</sup>.

En humano, de acuerdo a lo que se ha reportado, los monocitos clásicos producen niveles más bajos de citocinas pro-inflamatorias y son más eficaces en la eliminación de bacterias en comparación con los monocitos no-clásicos. Por el contrario, los monocitos no-clásicos son mejores en la presentación de antígenos y han mostrado ser mejores productores de citocinas pro-inflamatorias<sup>49, 50</sup>; así mismo, poseen una elevada expresión de diversos genes implicados en la reorganización del citoesqueleto como RhoC y RhoF (Rho GTPasas) lo cual representa la base molecular de su gran movilidad sobre el endotelio en modelos *in vivo* (en ratón), en un comportamiento denominado “patrullaje”<sup>43, 44</sup>. Estos monocitos también muestran diferencias en la expresión de moléculas asociadas a la migración celular. Se ha encontrado, en los monocitos clásicos, mayor expresión de CCR1 (receptor de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 $\alpha$  y 3 ó MCP-1 $\alpha$ , -3, y RANTES), CCR2 (receptor MCP-1), CX<sub>3</sub>CR1 (receptor de fractaltina), CD11b (o integrina  $\alpha_M$ ), CD33 (receptor de ácido siálico) y CD62L (ligando de MAdCAM-1, PSGL-1 y CD34), en comparación con los monocitos no-clásicos, que expresan en mayor proporción el receptor CCR5 (receptor de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ))<sup>44, 51</sup>. Se propone que la expresión diferencial de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión entre estos subgrupos de monocitos puede corresponder a diferencias en su capacidad migratoria.

### *Liberación de DAMPs durante lesiones tisulares*

En la respuesta inflamatoria, las células, a través de sus PRRs, reciben señales tanto de los PAMPs como de los DAMPs<sup>52</sup>, que también se conocen con el nombre de *Moléculas Asociadas a Muerte Celular* (CDAMs)<sup>53</sup>, que se liberan tanto en presencia como ausencia de infección en respuesta al daño celular<sup>54</sup>. Los PAMPs incluyen moléculas como el LPS, peptidoglicano, ácido lipoteicoico y material genético de virus y bacterias (como RNA de cadena sencilla (ssRNA) y regiones de DNA ricas en guanina-citocina (CpG DNA)). Por otro lado, los DAMPs, corresponden a moléculas propias de las células que se re-localizan activa (por secreción) o pasivamente (por liberación) o bien corresponden a metabolitos de procesos de proteólisis y oxidación, asociados con muerte celular<sup>55, 56, 57</sup>. Entre los DAMPs que funcionan como señales de alarma cuando son liberadas al medio extracelular están: HMGB-1<sup>58, 59</sup>, ácido úrico<sup>60-62</sup>, glucosa<sup>63</sup> y proteínas de choque térmico<sup>62, 64, 65</sup>. Otros DAMPs conocidos son los componentes degradados de la matriz extracelular como el hialuronano, heparán sulfato, colágena y fibrina<sup>66</sup>. El repertorio de DAMPs presente en un tejido dañado puede variar de forma importante dependiendo del tipo de células (epiteliales o mesenquimales, por ejemplo) y componentes de matriz extracelular que se encuentren en el mismo<sup>55</sup>.

Los DAMPs tienen la capacidad de modular el sistema inmune al afectar la función de células presentadoras de antígeno (APCs, como células dendríticas y macrófagos), ya que pueden alterar su maduración y estado de activación, y con ello su capacidad de procesar y presentar antígenos<sup>56</sup>. Estos DAMPs también pueden ser reconocidos por otras estirpes leucocitarias, como eosinófilos<sup>67, 68</sup>, mastocitos<sup>67</sup> y neutrófilos<sup>69</sup>.

En los últimos años, las mitocondrias se han dado a conocer como una importante fuente de DAMPs, por lo que tienen un papel en la respuesta inflamatoria. Las mitocondrias organizan diversos procesos metabólicos básicos y también tienen un papel esencial y diferencial en el proceso de muerte celular por necrosis y apoptosis<sup>57</sup>. Entre las moléculas mitocondriales que son capaces de actuar como DAMPs se encuentran el material genético (mtDNA, rico en islas CpG), lípidos de membrana como la cardiolipina, ATP<sup>+</sup> y los fMLP, que son subproductos de traducción mitocondrial, diferentes al resto de los productos traducionales de la célula<sup>57</sup>.

Por ejemplo, se ha reportado que en algunas formas de daño tisular (como ruptura celular por presión, lisis mediada por complemento e hipoxia), mitocondrias funcionales son liberadas al espacio extracelular y éstas, a su vez, liberan ATP que es reconocido por el receptor purinérgico P2X7, expresado específicamente en células del sistema inmune, lo que activa el inflamosoma Nlrp3 sin la necesidad de que haya endocitosis; la activación del inflamosoma resulta en la activación de la caspasa 1, con el posterior procesamiento y secreción de IL-1 $\beta$ , capaz de reclutar neutrófilos al sitio de lesión pero también de producir daño al tejido del hospedero<sup>70, 71</sup>.

### *fMLP, como agentes quimioatrayentes, y sus receptores*

La quimiotaxis es la migración dirigida de células a lo largo de un gradiente químico y se ha demostrado en diferentes sistemas de células procariontes y eucariontes, como bacterias<sup>72</sup> y leucocitos<sup>73-75</sup>. En el caso de estos últimos, la quimiotaxis puede desencadenarse por componentes séricos, como las proteínas del complemento<sup>74</sup>, y compuestos producidos por bacterias<sup>75</sup>.

Un ejemplo de compuestos con capacidad quimiotáctica para los linfocitos son fMLP, cuyas únicas fuentes naturales son proteínas bacterianas<sup>76, 77</sup> o mitocondriales<sup>78</sup>; los fMLP son péptidos pequeños que se encuentran formilados en su extremo amino-terminal<sup>79</sup>. Se ha demostrado que estos compuestos funcionan como potentes quimioatrayentes para neutrófilos y macrófagos, y que su actividad depende del tipo y número de aminoácidos que los componen<sup>80</sup>.

Debido al origen de estas moléculas, se piensa que los receptores a los que se unen pueden mediar el tráfico de fagocitos, tanto a los sitios de infección como de daño tisular. El receptor humano de formil-péptidos (FPR), y sus variantes tipo 1 (FPRL-1) y tipo 2 (FPRL-2), pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR)<sup>15</sup>; FPR y FPRL-1 se unen a fMLP con alta y baja afinidad respectivamente<sup>15, 79</sup>, mientras que FPRL-2 no se une o responde a fMLP<sup>81</sup>, pero sí a péptidos quimiotácticos no-formilados identificados para FPRL-1<sup>82</sup>.

Inicialmente FPR y FPRL-1 fueron detectados, con un alto nivel de expresión, en neutrófilos y monocitos, pero se ha observado que otros tipos celulares también expresan estos receptores, aunque se desconoce su significancia biológica<sup>15</sup>. Se sabe que los fMLP se unen a su receptor y activan respuestas quimiotácticas y antimicrobianas en neutrófilos<sup>76, 77</sup>.

*Efecto del contacto con endotelios en la funcionalidad de leucocitos.*

Los diversos mecanismos de interacción endotelio-leucocito, que se han mencionado previamente, traen como consecuencia cambios en la capacidad de respuesta de los leucocitos. Por ejemplo, se ha observado que la migración de neutrófilos a través de monocapas de células endoteliales induce la expresión y liberación de elastasa<sup>78, 83</sup>, una proteasa secretada por los gránulos primarios, capaz de degradar distintos componentes de la matriz extracelular como elastina, colágena, proteoglicanos y fibronectina<sup>81, 82, 84</sup>, capaces de potenciar la respuesta inflamatoria.

La interacción de las células endoteliales activadas (con IL-1 $\beta$ , por ejemplo) con monocitos humanos induce, en éstos últimos, la expresión de genes como NAIP, que inhibe apoptosis, y de quimiocinas como MCP-1, -3, CCL2 y CCL7. Adicionalmente la interacción celular, cuando es mediada por la molécula de adhesión PECAM-1, reduce la producción de proteínas antimicrobianas como  $\alpha$ -defensina, catelicidina y catepsina G (CTSG) en monocitos<sup>8</sup>; ejemplos que nos muestran claramente que las interacciones leucocito-endotelio son relevantes para la funcionalidad de los primeros y, en consecuencia, para el desarrollo de la respuesta inflamatoria en tejidos lesionados.

## **Planteamiento del Problema**

La comunicación entre endotelio y leucocitos, que ocurre durante el reclutamiento de estos últimos hacia los tejidos periféricos, deriva en la expresión de múltiples moléculas de adhesión y modificaciones del citoesqueleto de estas células migrantes. El contacto directo con endotelio aumenta la resistencia a la apoptosis de leucocitos, con lo que se incrementa la participación de estas células en los eventos inflamatorios. Aunque varias evidencias sugieren que estas modificaciones funcionales sobre leucocitos podrían alcanzar eventos directamente relacionados con su activación, como secreción y síntesis de citocinas o factores quimioatrayentes y fagocitosis, hasta el momento se desconoce cómo impacta la interacción con endotelio en estas funciones.

## **Justificación**

Las interacciones endotelio-leucocito son eventos sumamente frecuentes e indispensables en el proceso de reclutamiento celular en inflamación localizada. Se sabe que éste contacto tiene efectos sobre algunas funciones leucocitarias, como aumentar su capacidad de resistencia a apoptosis, lo que podría traducirse en un mayor potencial inflamatorio dada la sobrevivencia aumentada; sin embargo, esto no ha sido estudiado a profundidad.

## **Hipótesis**

El contacto con células endoteliales incrementará la capacidad de secreción de citocinas inflamatorias y de fagocitosis de células mononucleares de sangre periférica.

## **Objetivo General**

Analizar el fenotipo inflamatorio de CMSP que, en respuesta a fMLP, migran o no a través de células endoteliales.

## **Objetivos Particulares**

- Determinar la capacidad de migración de diferentes subtipos de CMSP humanas.
- Determinar la capacidad funcional de CMSP humanas al migrar a través de monocapas de células endoteliales, mediante la cuantificación de citocinas/quimiocinas secretadas en respuesta a LPS.
- Determinar la expresión de TLR-4 en superficie de CMSP humanas que migran o no a través de monocapas de células endoteliales.
- Determinar la viabilidad y frecuencia de apoptosis que en respuesta a LPS tienen CMSP humanas que migran o no a través de monocapas de células endoteliales.
- Determinar la capacidad fagocítica de CMSP humanas que migran o no a través de monocapas de células endoteliales.

## **Materiales y Métodos**

### *Cultivo y mantenimiento de células endoteliales.*

Se aislaron células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) como se ha descrito anteriormente<sup>76</sup>. Después de aisladas, las HUVEC se mantuvieron en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, en medio de cultivo EBM<sup>®</sup>-2 (Endothelial Basal Medium – 2, 190860 Lonza<sup>®</sup>) enriquecido con EGM<sup>®</sup>-2 MV SingleQuots<sup>®</sup> (Endothelial Cell Growth Medium, CC-4147 Lonza<sup>®</sup>) en placas recubiertas con colágena IV.

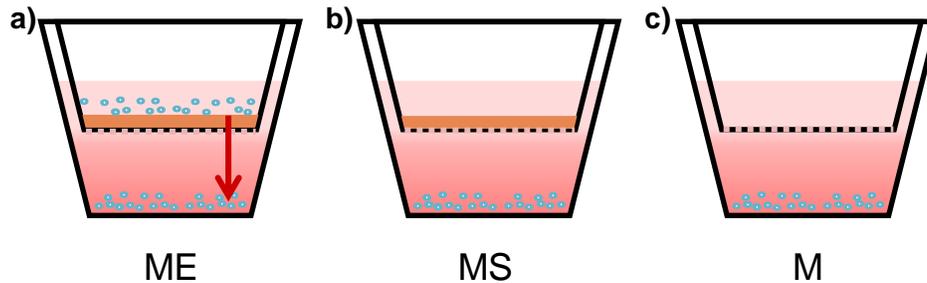
### *Aislamiento de CMSP mediante gradiente de densidad.*

A partir de concentrados leucocitarios (*buffy coats*) o de muestras de sujetos sanos obtenidas por venopunción humeral en tubos Vacutainer<sup>®</sup> (367878 BD<sup>®</sup> Biosciences) con heparina de litio como anticoagulante, se realizó la separación de CMSP mediante un sistema de gradientes de densidad por centrifugación (600 x *g*/20min, 4°C, sin freno) con Lymphoprep<sup>®</sup> (LYS 3773 Axis-Shield<sup>®</sup>) como se ha descrito previamente<sup>77</sup>. Se recuperó la región del gradiente correspondiente a CMSP. Se lavaron las células en dos ocasiones, agregando 10 mL de PBS y centrifugando a 400 x *g*/5 min. El concentrado (“botón”) celular se resuspendió en la cantidad de medio EBM<sup>®</sup>-2 enriquecido requerido para obtener una densidad de 1-2 x10<sup>6</sup> cel/mL.

### *Modelo de migración in vitro.*

24 h antes del ensayo de migración, se colocaron HUVECs sobre la membrana de la cámara superior de cámaras de Boyden (Transwell<sup>®</sup>, 3386 Corning<sup>®</sup> Inc.). Posteriormente, 1x10<sup>5</sup> CMSP aisladas se colocaron sobre las monocapas de células endoteliales en cámaras de Boyden y se incubaron durante 4 horas, con 0.457nM de fMLP en la cámara inferior. Como controles se manejaron: CMSP expuestas únicamente al sobrenadante de células endoteliales y a fMLP (MS) y CMSP incubadas con fMLP pero en ausencia de células endoteliales (M). La distribución de las diferentes

células, en las cámaras de Boyden, se muestra en la figura 2. Las células migrantes (ME) y los controles MS y M fueron recuperadas de la cámara inferior para las posteriores determinaciones.



**Figura 2. Descripción del tipo de CMSP obtenidas con el modelo compartimentalizado de migración *in vitro*.** Mediante la utilización de cámaras de Boyden, se generan dos espacios: la cámara superior, donde se colocan las CMSP; y la cámara inferior, donde se colocan fMLP como quimioatrayente y de donde: a) se recuperan las células que migran a través de la monocapa de células endoteliales (ME); o b) las células que no migrarán, pero estarán en contacto con factores solubles liberados por endotelios (MS); o c) donde se colocan CMSP en cámaras de Boyden no recubiertas con endotelio (M).

#### *Curva concentración-respuesta a fMLP.*

24 h antes del experimento, se colocaron HUVECs sobre la membrana de policarbonato de la cámara superior de cámaras de Boyden (Transwell<sup>®</sup>, 3386 Corning<sup>®</sup> Inc.) con poro de 3.0  $\mu\text{m}$ . Posteriormente,  $1 \times 10^5$  CMSP aisladas se colocaron sobre las monocapas de células endoteliales en cámaras de Boyden y se incubaron durante 4 horas, con diferentes concentraciones (0.0457, 0.457, 4.57, 45.7 y 457 nM) de N-formil-Met-Leu-Phe (fMLP, F3506 Sigma<sup>®</sup>) como agente quimioatrayente en la cámara inferior. Al finalizar el tiempo de incubación, las células migrantes (ME, ver *Figura 2*) fueron recuperadas y se realizó el conteo automatizado de las mismas (Countess<sup>®</sup> Automated Cell Counter, Invitrogen<sup>®</sup>).

### *Cinética de migración.*

24 h antes del ensayo, se colocaron HUVECs sobre la membrana de la cámara superior de cámaras de Boyden (Transwell<sup>®</sup>, 3386 Corning<sup>®</sup> Inc.). Posteriormente,  $1 \times 10^5$  CMSP aisladas se colocaron sobre las monocapas de células endoteliales en cámaras de Boyden y se incubaron durante diferentes tiempos (15 min – 240 min), con 0.457 nM de fMLP en la cámara inferior. Al finalizar el tiempo de incubación, las células migrantes (ME) fueron recuperadas y se realizó el conteo automatizado de las mismas (Countess<sup>®</sup> Automated Cell Counter, Invitrogen<sup>®</sup>).

### *Secreción de citocinas en respuesta a LPS de células migrantes o no migrantes.*

$5.4 \times 10^4$  células de las condiciones ME y M fueron re-suspendidas en 500  $\mu$ L de medio EBM<sup>®</sup>-2 enriquecido y colocadas en nuevas placas de cultivo. Estas células fueron estimuladas o no con diferentes concentraciones (5 – 100 ng) de LPS (*E. coli* O26: B6, L8274 Sigma Aldrich<sup>®</sup>), durante 8 horas, en incubación en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron centrifugadas a 500g durante 5 min, y el sobrenadante fue colectado y almacenado a -70°C.

### *Cuantificación de citocinas en sobrenadante.*

La cuantificación de citocinas y quimiocinas se realizó, en sobrenadante, mediante kits de arreglos citométricos de perlas (BD<sup>®</sup> Cytometric Bead Array (CBA)), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Los kits utilizados fueron: CBA Human MCP-1 Flex Set (558287 BD<sup>®</sup> Biosciences, límite de detección: 1.3 pg/mL), y CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (551811 BD<sup>®</sup> Biosciences), para la cuantificación de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IL-8 (límites de detección: 3.7 pg/mL, 7.2 pg/mL, 2.5 pg/mL, 3.3 pg/mL y 3.6 pg/mL, respectivamente).

#### *Evaluación de la expresión de TLR-4 y determinación de mecanismo de muerte celular.*

5.4x10<sup>4</sup> células de las condiciones ME y M fueron re-suspendidas en 500 µL de medio EBM<sup>®</sup>-2 enriquecido y colocadas en nuevas placas de cultivo. Estas células fueron estimuladas o no con 25 ng de LPS, durante 4 horas, en incubación con una atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la colección, lavado con PBS e inmunofenotipificación de las células, con los anticuerpos específicos α-HLA-DR (PE, 555812 *BD Biosciences*<sup>®</sup>), α-CD14 (PE-Cy7, 301814 *Biolegend*<sup>®</sup>), α-CD19 (FITC, 555412 *BD Biosciences*<sup>®</sup>), α-CD3 (FITC, 555319 *Pharmingen*<sup>®</sup>), α-TLR-4 (APC, 17-9917-73 *eBiosciences*<sup>®</sup>); Annexina V (PB, V35124 *Invitrogen*<sup>®</sup>) y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) (V35124 *Invitrogen*<sup>®</sup>) fueron utilizados para determinar el mecanismo de muerte celular en el cual podrían encontrarse las células.

#### *Evaluación de la capacidad de fagocitosis.*

2.5x10<sup>5</sup> células de las condiciones M y ME fueron co-incubadas, durante 30 minutos (37°C, agitación oscilatoria 5Hz), con 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) de bacteria *E. coli* cepa DH5α transfectada con el plásmido que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), previamente opsonizadas con suero humano descomplementado al 1%. Posteriormente, las células se incubaron 5 minutos con gentamicina, se lavaron e inmunofenotipificaron identificando antígenos de superficie con los anticuerpos α-CD14 (PE-Cy7, 301814 *Biolegend*<sup>®</sup>), α-CD16 (APC-Cy7, 302018 *Biolegend*<sup>®</sup>), α-HLA-DR (PE-Cy5, 555813 *BD*<sup>®</sup> *Biosciences*) y α-CD3 (PB, 300431 *Biolegend*<sup>®</sup>), a través de citometría de flujo.

#### *Análisis por citometría de flujo.*

Se realizó la inmunofenotipificación de las células M y ME, con los anticuerpos específicos α-HLA-DR (PE-Cy5, 555813 *BD*<sup>®</sup> *Biosciences*), α-CD14 (PE-Cy7, 301814 *Biolegend*<sup>®</sup>), α-CD16 (APC-Cy7, 302018 *Biolegend*<sup>®</sup>) y α-CD3 (PB, 300431

*Bilegend*<sup>®</sup>). Los leucocitos macados inmunofenotipificación, las células del ensayo de fagocitosis y las perlas de CBAs, fueron adquiridas con un citómetro de flujo FACS Aria (*BD*<sup>®</sup> *Biosciences*), con el software FACSDiva versión 6.0 para Windows (*BD*<sup>®</sup> *Biosciences*) después de realizar el acondicionamiento del equipo. Los datos obtenidos se analizaron con el software Infinicyt<sup>®</sup> para Windows (*Cytognos*<sup>®</sup>).

#### *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de Dunn (producción de citocinas) o una prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas (ensayo de fagocitosis), utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (*GraphPad*<sup>®</sup> *Software Inc.*).

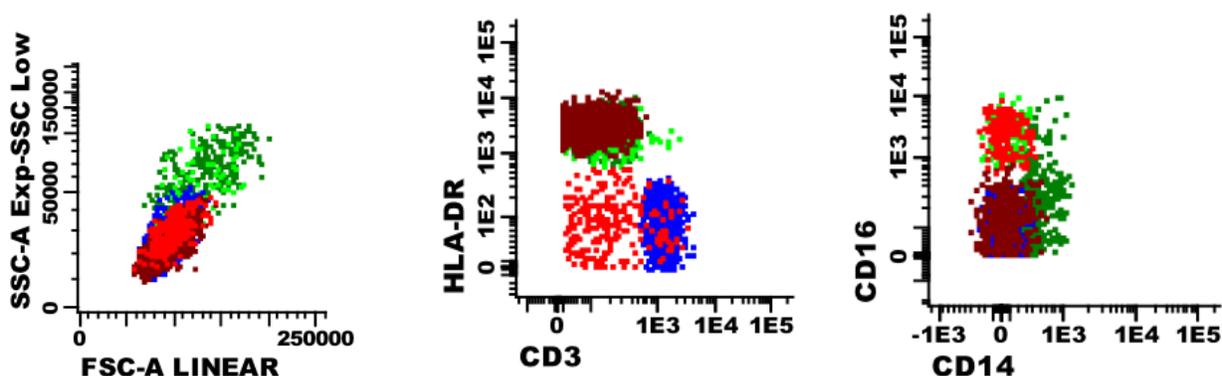
## Resultados

### Estrategia de análisis de las CMSP de trabajo.

Se obtuvo el inmunofenotipo de las CMSP de trabajo, utilizando como marcadores de identificación las moléculas de superficie HLA-DR, CD3, CD14 y CD16, además de las características de tamaño y complejidad relativas de cada una de las poblaciones celulares. De acuerdo a lo que se muestra en la tabla 1 y con la estrategia de selección que se ejemplifica en la figura 3, se clasificó a las CMSP en cinco poblaciones diferentes: monocitos clásicos, monocitos no-clásicos, linfocitos T, linfocitos B y células NK *like* (dado que no incluimos  $\alpha$ -CD56, no se puede descartar que éstas células sean monocitos que perdieron CD14 o contaminación de granulocitos).

**Tabla 1.** Inmunofenotipo de identificación de las CMSP aisladas.

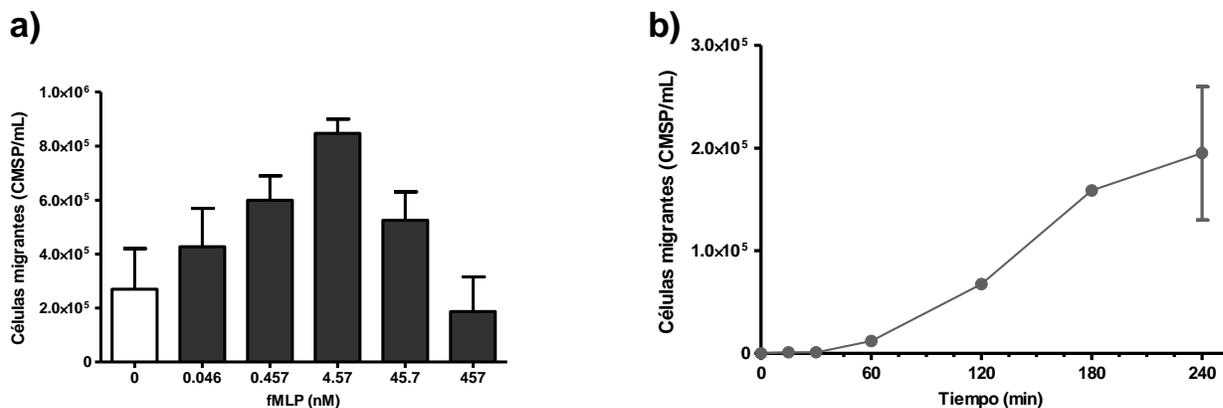
	Población		Inmunofenotipo
■	Monocitos Clásicos	FSC <sup>med</sup> SSC <sup>med</sup>	HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>
■	Monocitos No-Clásicos	FSC <sup>med</sup> SSC <sup>med</sup>	HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>
■	Linfocitos T	FSC <sup>low</sup> SSC <sup>low</sup>	HLA-DR <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD16 <sup>-</sup>
■	Linfocitos B	FSC <sup>low</sup> SSC <sup>low</sup>	HLA-DR <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> CD16 <sup>-</sup>
■	NK <i>like</i>	FSC <sup>low</sup> SSC <sup>low</sup>	HLA-DR <sup>-</sup> CD3 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup>



**Figura 3. Identificación de las CMSP aisladas: Estrategia de análisis.** De acuerdo a la expresión de los marcadores HLA-DR, CD3, CD14 y CD16, así como sus características de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) relativos, se clasificó a las células de trabajo en: Monocitos clásicos, monocitos no-clásicos, linfocitos T, linfocitos B y células NK.

### Estandarización del modelo de migración *in-vitro*.

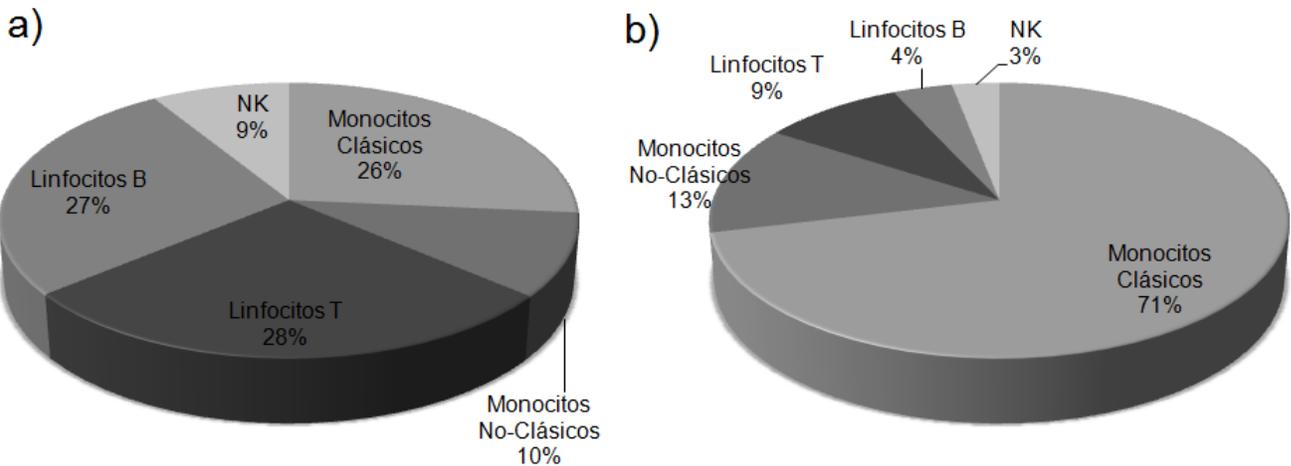
Para la estandarización del modelo se evaluó la dosis de fMLP y tiempo óptimo de migración del sistema. Como primera parte, se realizó una curva dosis-respuesta a fMLP, en la que observamos que la respuesta de CMSP al agente quimiotáctico es dosis dependiente con niveles de saturación a dosis superiores a 4.57 nM, en las que la migración se ve disminuida (*Figura 4a*). Utilizando una concentración 0.457 nM de fMLP, realizamos una cinética de migración. En los tiempos más cortos (15 y 30 minutos), la cantidad de células migrantes es indeterminable mediante conteo automatizado; a partir de los 60 min y hasta los 240 min (4 horas) se observa un aumento en la cantidad de células migrantes (*Figura 4b*).



**Figura 4. La exposición a fMLP favorece la migración de CMSP.** Utilizando el modelo *in vitro* de migración de CMSP humanas a través de monocapas de HUVEC, sostenidas en cámaras de Boyden, se cuantificó el número de células que atravesaron de la cámara superior a la inferior (células migrantes) en: a) en presencia de diferentes concentraciones de fMLP y b) a diferentes tiempos (dosis fMLP 0.457 nM).  $n = 2$ ;  $\bar{I}$  = error estándar.

Se realizó la inmunofenotipificación de las CMSP de trabajo, con los marcadores de superficie HLA-DR, CD3, CD14 y CD16. Con los resultados representativos de tres individuos, encontramos las siguientes proporciones: Monocitos clásicos =  $26.45 \pm 1.22\%$ , monocitos no-clásicos =  $9.77 \pm 2.54\%$ , linfocitos T =  $27.80 \pm 1.52\%$ , linfocitos B =  $27.11 \pm 2.55\%$ , células NK like =  $8.87 \pm 3.02\%$  (*Figura 5a*).

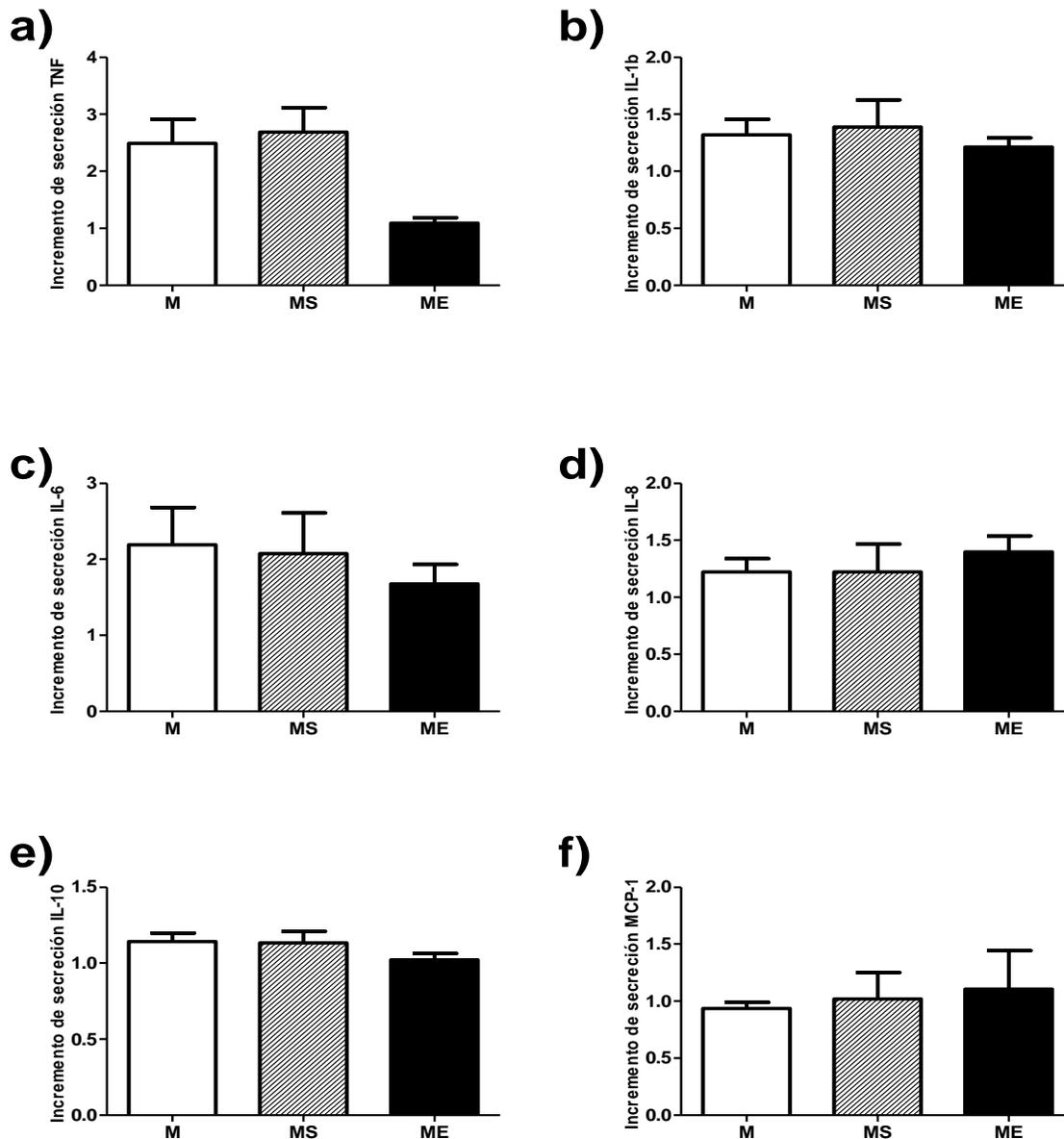
Pasadas 4 horas de migración, se realizó la inmunofenotipificación de las células migrantes con el mismo panel de anticuerpos. Encontramos una modificación en la proporción de las diferentes poblaciones celulares, de acuerdo a los resultados representativos de tres individuos: Monocitos clásicos =  $71.25 \pm 11.29\%$ , monocitos no-clásicos =  $12.84 \pm 1.35\%$ , linfocitos T =  $9.03 \pm 6.33\%$ , linfocitos B =  $3.83 \pm 4.18\%$ , células NK like =  $3.05 \pm 2.33\%$  (Figura 5b).



**Figura 5. Monocitos clásicos son los leucocitos con mayor capacidad de migración ante fMLP.** Se muestra la frecuencia de Linfocitos T, B, NK, monocitos clásicos y monocitos no clásicos en las CMSP a) aisladas de concentrados leucocitarios y b) recuperadas de la cámara inferior después de 4 horas de incubación (células migrantes), n = 3.

#### *Evaluación de la secreción de citocinas por estimulación con ligandos de TLRs.*

Después de 8 horas de estimulación con LPS, se obtuvieron las concentraciones de las citocinas en sobrenadante y los siguientes valores en cada una de las curvas de referencia: *TNF*:  $m = 4.45$ ,  $b = -1185.66$ ,  $r^2 = 0.912$ ; *IL-1 $\beta$* :  $m = 5.85$ ,  $b = -1418.04$ ,  $r^2 = 0.920$ ; *IL-6*:  $m = 6.96$ ,  $b = -1557.88$ ,  $r^2 = 0.925$ ; *IL-10*:  $m = 7.65$ ,  $b = -1901.01$ ,  $r^2 = 0.919$ ; *IL-8*:  $m = 5.32$ ,  $b = -1207.94$ ,  $r^2 = 0.926$ ; *MCP-1*:  $m = 7.55$ ,  $b = 26.31$ ,  $r^2 = 1.000$ . No se observó diferencia estadísticamente significativa en el incremento de la producción de ninguna de las citocinas (Figura 6).

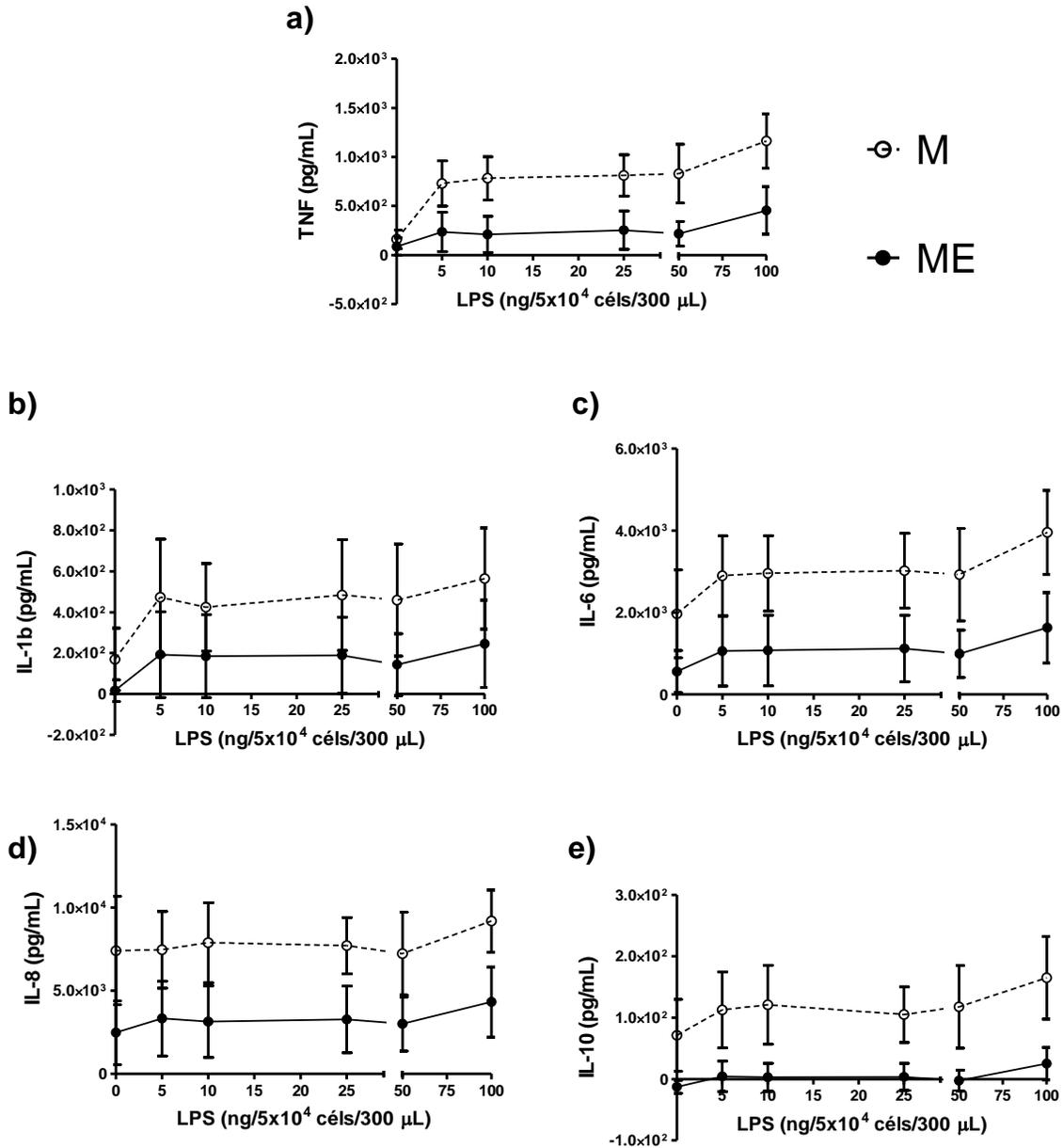


**Figura 6. CMSP, que migran a través de células endoteliales, no modifican significativamente su producción de citocinas en respuesta a un estímulo con LPS.** CMSP aisladas de concentrados leucocitarios, que migraron (ME, barras negras) o no (M, barras blancas) a través de monocapas de células endoteliales y que sólo tuvieron contacto con sobrenadante de las mismas (MS, barras rayadas). Después de incubarse con LPS (25 ng) durante 8 h, se analizó el incremento en producción de a)TNF, b)IL-1b, c)IL-6, d)IL-8, e)IL-10 y f)MCP-1 en sobrenadante. n = 3;  $\bar{I}$  = error estándar. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posteriori; p < 0.1.

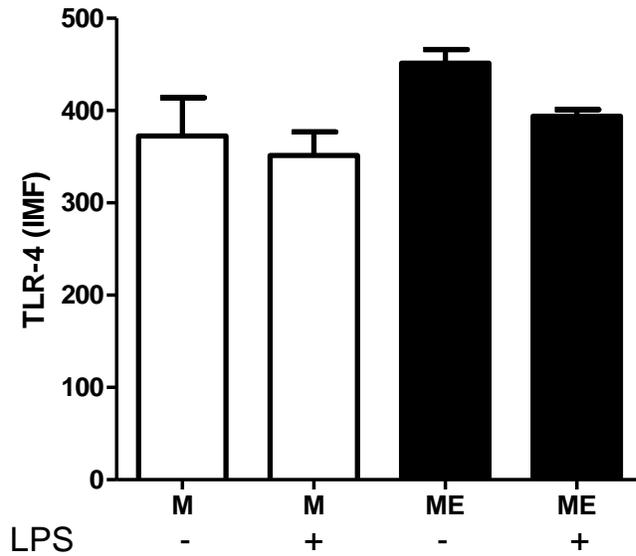
La curva dosis-respuesta a LPS, arrojó los siguientes valores en cada una de las curvas de referencia: *TNF*:  $m = 3.55$ ,  $b = 140.42$ ,  $r^2 = 1.000$ ; *IL-1 $\beta$* :  $m = 5.07$ ,  $b = 338.39$ ,  $r^2 = 1.000$ ; *IL-6*:  $m = 7.53$ ,  $b = 424.13$ ,  $r^2 = 1.000$ ; *IL-10*:  $m = 8.439$ ,  $b = 308.03$ ,  $r^2 = 1.000$ ; *IL-8*:  $m = 4.24$ ,  $b = 336.06$ ,  $r^2 = 1.000$ . En todos los casos se observó menor secreción de citocinas por parte de las células que migraron a través de células endoteliales (ME), con respecto al control de células M. Las células de ambas condiciones mostraron un comportamiento similar, con prácticamente nula secreción en ausencia de LPS; secreción constante en el intervalo de concentraciones de 5 – 50 ng LPS, con un aumento al encontrarse en presencia de la concentración más alta (100 ng LPS) (*Figura 7*).

Como un acercamiento a las posibles causas del comportamiento observado en la secreción de citocinas, se analizó la modificación del receptor tipo *Toll* – 4 (TLR-4), en la superficie de células M y ME, después de 4 horas de haber sido estimuladas o no con 25 ng de LPS; no se observó un cambio significativo en la expresión de TLR-4, como se muestra en la figura 8.

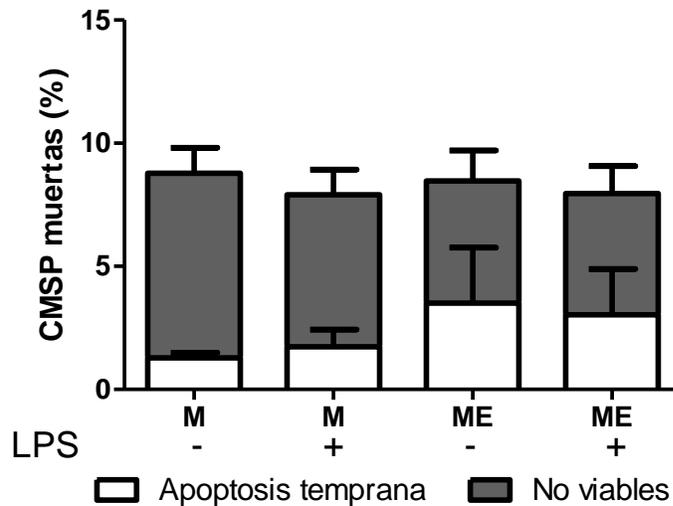
Asimismo, se determinó el mecanismo de muerte celular de células ME y células M, con y sin estímulo de LPS durante 4 horas. Los resultados muestran que la suma del porcentaje de células en apoptosis temprana y no viables se mantiene alrededor del 10% y sin diferencias significativas entre las distintas CMSP analizadas (*Figura 9*).



**Figura 7.** El contacto con las células endoteliales predispone a las CMSP a una menor producción de citocinas ante un estímulo con diferentes concentraciones de LPS. CMSP aisladas de concentrados leucocitarios, que migraron (ME, círculos abiertos y línea discontinua) o no (M, círculos cerrados y línea continua) a través de monocapas de células endoteliales. Después de incubarse o no con diferentes concentraciones de LPS (0, 5, 10, 25, 50 y 100 ng) durante 8 h, se analizó las concentraciones de a)TNF, b)IL-1b, c)IL-6, d)IL-8 y e)IL-10 en sobrenadante. n = 3; **I** = error estándar.



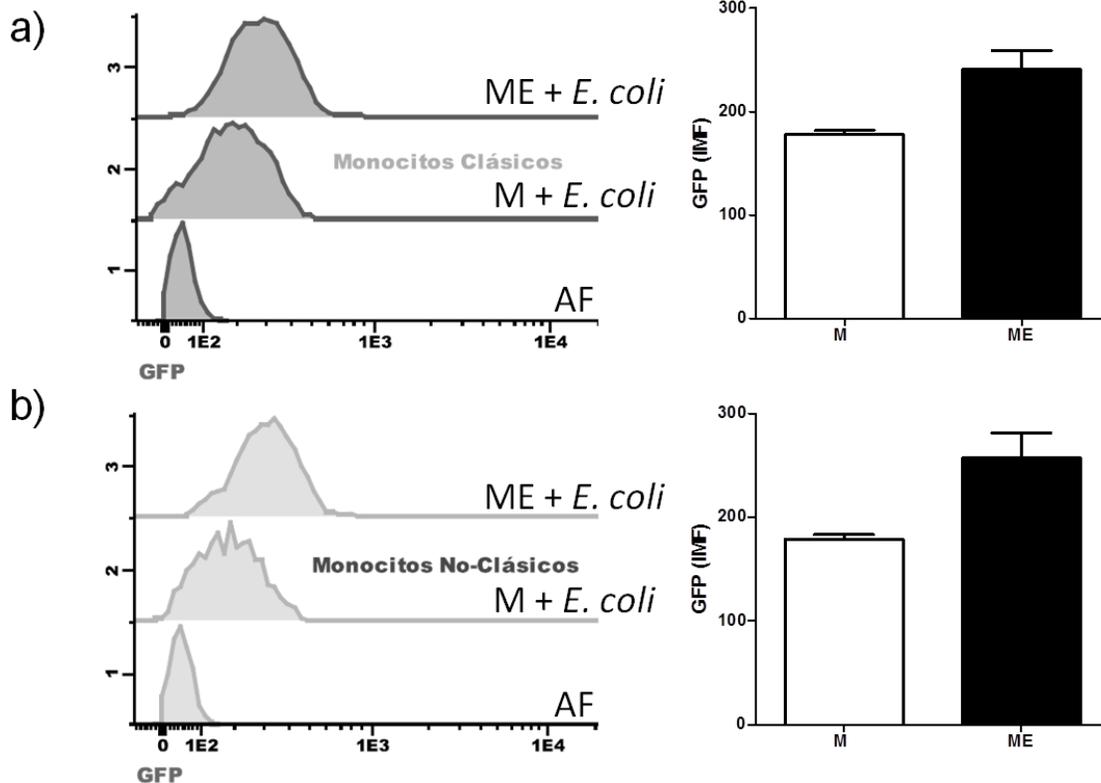
**Figura 8. La expresión de TLR-4 se mantiene en los diferentes tipos de CMSP recuperadas.** CMSP aisladas de concentrados leucocitarios, que migraron (ME, barras negras) o no (M, barras blancas) a través de monocapas de células endoteliales. Después de incubarse o no con LPS (25 ng) durante 4 h, se analizó la expresión del receptor TLR-4.  $n = 3$ ;  $\bar{I}$  = error estándar. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posterior;  $p < 0.1$ .



**Figura 9. La viabilidad de las CMSP humanas no se modifica al contacto con células endoteliales.** CMSP aisladas de concentrados leucocitarios, que migraron (ME) o no (M) a través de monocapas de células endoteliales. Después de incubarse o no con LPS (25 ng) durante 4 h, se analizó la viabilidad (segmento gris) y frecuencia de células en apoptosis (segmento blanco).  $n = 3$ ;  $\bar{I}$  = error estándar. Prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posterior;  $p < 0.1$ .

### Evaluación de la capacidad de fagocitosis.

Se realizó un ensayo para determinar la capacidad fagocítica de las diferentes poblaciones de monocitos, clásicos y no-clásicos, en las ME, con respecto al control de M. No se encontraron diferencias significativas entre la capacidad fagocítica de las células de estudio y el control; sin embargo, sí se observa un aumento en la intensidad media de fluorescencia correspondiente a GFP, como se muestra en los histogramas y las gráficas de la figura 10, cuando los monocitos tuvieron previo contacto con las células endoteliales.



**Figura 10. El contacto con las células endoteliales no modifica la capacidad fagocítica de CMSP.** A partir de  $10^5$  CMSP M y ME, fueron expuestas durante 30 min a  $10^6$  UFC de bacterias opsonizadas *E. coli* que expresan la proteína verde fluorescente (GFP). La capacidad fagocítica fue evaluada como la intensidad media de fluorescencia de células GFP<sup>+</sup> en a) monocitos clásicos (HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup>) y b) monocitos no clásicos (HLA-DR<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>). Como control (AF) se utilizaron CMSP que no fueron expuestos a la bacteria. n = 3; **I** = error estándar. Prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas; p < 0.1.

## Discusión

La inflamación es un proceso, propio de tejidos vascularizados, en respuesta a una lesión. En éste proceso el endotelio vascular tiene la capacidad de proporcionar factores de crecimiento, mediadores inflamatorios y quimiotácticos, así como colaborar en la regulación de la migración de leucocitos hacia los tejidos lesionados<sup>16</sup>. La cascada de respuestas celulares en el proceso de migración, involucra la captura, rodamiento y firme adhesión de los leucocitos a la luz de la superficie endotelial, culminando con la subsecuente diapédesis a través de esta barrera<sup>19</sup>. Todos estos pasos en los que el leucocito mantiene una estrecha relación de contacto con el endotelio son mediados por moléculas de adhesión, como las selectinas e integrinas, cuya expresión en los leucocitos depende de factores de comunicación como las quimiocinas<sup>10, 19, 80</sup>.

Además del papel que tienen las selectinas en mediar la adhesión de los leucocitos al endotelio, la interacción de las mismas con sus ligandos, en los leucocitos induce cambios en la movilización de calcio intracelular, potenciación del estallido respiratorio, y activación de vías de señalización de las MAP (Proteínas activadas por mitógenos) y JNK (Jun N-terminal) cinasas, además de la activación de  $\beta 1$  y  $\beta 2$  integrinas<sup>85</sup>. Una vez que las integrinas se encuentran en su forma de activa (alta afinidad), la interacción de las mismas con sus ligandos tiene la capacidad de inducir vías de señalización dependientes de moléculas como DAP12 y FcR $\gamma$ <sup>86</sup>, entre las que destacan las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAP) fosfolipasa C (PLC) $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>, Vav/Rac y NF- $\kappa$ B<sup>87</sup>. Tomando en cuenta que estas vías de señalización, son comunes con las descritas para la producción de citocinas inflamatorias<sup>88-92</sup>, nuestro objetivo fue entonces evaluar las modificaciones en el perfil inflamatorio de CMSP que migran a través endotelio en presencia de fMLP como quimioatrayente.

Para ello utilizamos un modelo de migración *in vitro* para el que estandarizamos el tiempo y concentración de fMLP necesaria para poder obtener suficientes células para los diferentes ensayos. En la curva de respuesta de las CMSP al gradiente quimiotáctico de los fMLP utilizamos concentraciones desde 0.048 a 467 nM, que corresponden las dosis previamente reportado en ensayos de migración de neutrófilos y macrófagos<sup>80</sup>. Como se observa en la figura 4a, el sistema se comporta de manera dosis dependiente, donde en concentraciones de 4.67 nM de fMLP se obtiene mayor

número de células que migran a través de las células endoteliales. En el mismo sistema, mientras se incrementa la concentración de fMLP en la cámara inferior, el número de células que se recuperan es inversamente proporcional a la concentración del quimioatrayente presente; esto, en parte puede deberse a diferentes mecanismos, en los que podemos mencionar que el hecho de incrementar la concentración de fMLP puede interrumpir el gradiente quimiotáctico, igualando las concentraciones del quimioatrayente en la cámara superior, considerando la capa de células endoteliales como un sistema semipermeable<sup>80</sup>.

En cuanto a la cinética de migración (*Figura 4b*) partimos de 15 minutos, en función del tiempo en que en modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se observa la infiltración de leucocitos hacia un ambiente inflamatorio<sup>48</sup>, hasta 4 horas, ya que de acuerdo con resultados previamente obtenidos en el laboratorio<sup>93</sup>, después de este tiempo el sistema no muestra mayor cantidad de leucocitos migrantes, lo cual se puede deberse a diferentes factores, como la interacción de los leucocitos que durante la diapédesis pueden polarizar las moléculas de adhesión (como  $\beta_2$  integrinas, JAM-C e ICAMs)<sup>19, 94</sup>, e inclusive a través del proceso denominado *trogocitosis*, mediante el cual los leucocitos extraen moléculas de adhesión de las células endoteliales y las incorporan a su membrana<sup>95</sup>, impidiendo a otros leucocitos utilizar éstas moléculas de adhesión para adherirse y, por ende, migrar. Otra posibilidad es la inducción de muerte celular de las células endoteliales, por leucocitos, de manera parácrina; se ha observado que las L-selectinas de neutrófilos inducen la secreción de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ <sup>96</sup>, cuyo reconocimiento por las células endoteliales las lleva a muerte por apoptosis<sup>97</sup>. Con los resultados anteriores, decidimos utilizar el tiempo de 4 horas por que fue en el que recuperamos mayor cantidad de CMSP migrantes con un porcentaje de viabilidad de al menos 90% (*Figura 9*). Así, la dosis y tiempo empleados para evaluar la funcionalidad de las CMSP ME, en los siguientes experimentos, fueron 0.457 nM y 4 horas de migración.

En cuanto a las diferencias en la capacidad de migración de las CMSP en nuestro sistema, observamos que los monocitos con fenotipo clásico (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) migran de forma más eficiente que el resto de las células (*Figura 5*), lo cual probablemente se debe a que los monocitos tienen mayor cantidad y expresan más isoformas de los

receptores para fMLP, a diferencia de los linfocitos, para los que sólo se han reportado un tipo de receptor y cuya actividad se relaciona principalmente con quimiotaxis y no migración<sup>15</sup>.

Debido a que se ha reportado previamente la activación de diferentes vías de señalización por la interacción entre los leucocitos y el endotelio<sup>86</sup>, esperábamos el incremento en la secreción de citocinas inflamatorias cuando las CMSP migrantes eran expuestas a estímulos inflamatorios como lo son el LPS, el cual es ligando de TLR-4 y es un potente estimulador de la respuesta inflamatoria<sup>1</sup>, esto aunado al hecho de que la proporción de monocitos fue mayor en las CMSP migrantes y estas células resultan mejores productores de citocinas inflamatorias que los linfocitos<sup>98</sup>. Sin embargo, como se observa en la figura 7, la concentración de las citocinas pro-inflamatorias TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 es menor respecto a CMSP que no tienen contacto con las células endoteliales, así como la producción de la quimiocina IL-8, e IL-10, citocina clásicamente anti-inflamatoria.

Encontramos que la disminución en la capacidad de secreción de citocinas no es debida a la concentración del LPS (25ng), puesto que estimulando a las células migrantes con concentraciones por arriba y por debajo de ésta, resulta en respuestas de secreción de citocinas inflamatorias disminuida en los monocitos migrantes, con respecto al control de CMSP M (*Figura 7*). Tampoco es debido a una modificación en la expresión de TLR-4 en superficie (*Figura 8*) o por que los monocitos se encuentren en procesos de apoptosis o necrosis (*Figura 9*) posterior a 4 horas de estimulación, lo que contrasta con reportes previos donde se observa que la migración de células a través de células endoteliales activadas con IL-1 $\beta$  incrementa la expresión de los transcritos de TLR-4 y genera resistencia a estímulos que llevan a apoptosis<sup>8</sup>. La discrepancia entre estos resultados puede atribuirse a diferentes aspectos, por ejemplo: en el modelo aquí presentado se mide la expresión del producto traduccional (TLR-4) en superficie, aunque probablemente de manera intracelular podrían estar desacopladas las vías de señalización; por otra parte, se ha reportado que el LPS puede inducir apoptosis en macrófagos<sup>99</sup>, sin embargo, no encontramos diferencias en la resistencia a la apoptosis por el LPS; finalmente, utilizamos fMLP como agentes quimioatrayentes, en lugar de activar directamente a las células endoteliales. Por lo tanto, la explicación para esta

secreción disminuida de citocinas puede encontrarse en otros factores, como lo son modificaciones en la expresión de moléculas accesorias para el reconocimiento del LPS, vías de señalización, factores de transcripción, etc., aspectos que aún no han sido explorados. Se sabe de la importancia de receptores asociados a inmunorreceptores basados en motivos de activación (ITAM) en la regulación de la señalización por TLRs, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos de inhibición cruzada<sup>100, 101</sup>. Se ha observado que la activación de integrinas como CD11b, encontrada en heterodímeros de proteínas transmembranales tipo I, como Mac-1 (CD11b-CD18;  $\alpha_M\beta_2$ ), que señala vía receptores asociados a ITAM, ejerce regulación negativa sobre la señalización por TLRs. El mecanismo se basa en la fosforilación de MyD88 y TRIF, moléculas adaptadoras para la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que las convierte en blanco de la ubiquitín-ligasa Cbl-b con lo que posteriormente son degradadas vía proteosoma<sup>102</sup>, así, la vía de activación de NF- $\kappa$ B se interrumpe y no permite la expresión de citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, y probablemente en tiempos más largos de estimulación IL-10.

Además de la síntesis y liberación de citocinas, el proceso inflamatorio incluye otros mecanismos como la fagocitosis, definida por algunos autores como aquel mecanismo usado por células especializadas, como macrófagos, monocitos, células dendríticas y neutrófilos, para internalizar, degradar y, eventualmente, presentar péptidos derivados de antígenos particulados<sup>103</sup>.

En el presente estudio analizamos el primer paso de éste complejo mecanismo: la internalización, específicamente de bacterias *E. coli* opsonizadas; nuestros datos no muestran diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad de internalización de monocitos que han migrado (ME) o no a través de células endoteliales (M) (*Figura 10*), aunque sí una tendencia. Es factible que *in vivo*, en presencia de otros componentes que regulan la migración, existan diferencias suficientes para observar una modificación funcional. En éste resultado podemos descartar la adhesión inespecífica de las bacterias a la superficie de los leucocitos, ya que fueron tratados con gentamicina para eliminar a las bacterias no fagocitadas, con lo que las únicas células que mostraban la marca de la proteína verde fluorescente (GFP) eran aquellas con potencial fagocítico: los monocitos. Esperábamos que los monocitos clásicos tuvieran

mayor capacidad de fagocitosis, según lo reportado anteriormente<sup>45</sup>, pero en este sistema tanto los monocitos clásicos como los no clásicos mostraron la misma capacidad de internalizar la bacteria. Sin embargo, cuando comparamos la respuesta entre los monocitos que no tienen contacto con las células endoteliales (M), respecto a las que sí (ME), las últimas tienden a incrementar la señal de GFP, lo cual puede traducirse como mayor capacidad fagocítica. Este incremento podría asociarse a que en las células migrantes, como ya se ha reportado previamente, aumenta la expresión y maduración de las integrinas Mac-1,  $\alpha_x\beta_2$  y  $\alpha_v\beta_3$ <sup>85, 104</sup>, funcionando como receptores que promueven la fagocitosis de la bacteria. Sumando la modificación en la expresión y activación de integrinas, mediada por la acción de selectinas en la interacción leucocito-endotelio, a la expresión de receptores para Fc $\gamma$ , que facilitan la fagocitosis de partículas opsonizadas por componentes del suero<sup>105, 106</sup> (como en el caso de las bacterias utilizadas en nuestro ensayo), es posible que los monocitos migrantes tuvieran una mayor capacidad de reconocer y, con ello, internalizar a la bacteria. Además, se sabe que los leucocitos que migran mediante trogocitosis sustraen moléculas como ICAM-1 o de receptores *scavenger*<sup>95</sup>, lo que también podría tener un efecto potenciador en el reconocimiento y posterior fagocitosis de bacterias. Por otro lado, la tendencia observada puede deberse a modificaciones en la maquinaria de remodelación de citoesqueleto inducida por las células endoteliales<sup>16</sup>; no obstante, estas posibilidades deben de ser exploradas más a fondo y falta determinar si el incremento en la capacidad de internalización se traduce en un aumento en la destrucción de las partículas internalizadas.

Por otra parte, la activación de la respuesta inmune en los leucocitos que migran a través del endotelio no solo está dada por la secreción de citocinas o fagocitosis, en un futuro podrían explorarse aspectos como la generación de moléculas antimicrobianas, factores de coagulación, procesamiento y presentación de antígenos, regulación de la respuesta inflamatoria, interacción intercelular o diferenciación a otras células, por ejemplo, los monocitos modificados pueden diferenciarse a macrófagos o células dendríticas, lo que podría tener implicaciones en la respuesta inmune adaptativa.

Nuestros hallazgos sugieren que el endotelio, además de mantener la fluidez sanguínea, regular el tono vasomotor, funcionar como barrera semipermeable y

controlar el tráfico leucocitario, modula la respuesta inflamatoria al disminuir la capacidad proinflamatoria de monocitos que migran a través de él. Es relevante considerar que las respuestas observadas por activación *in vitro* pueden no reflejar el proceso *in vivo*, pero analizar el mecanismo de comunicación endotelio-leucocito nos podría ayudar a entender enfermedades inflamatorias, tanto crónicas como agudas, donde se reconoce ampliamente que la migración de leucocitos y el potencial inflamatorio están relacionados. Como ejemplo de enfermedades crónicas podemos mencionar la aterosclerosis, donde el endotelio se encuentra en un estado de activación continuo y permite la infiltración de leucocitos, mayoritariamente monocitos, a las capas de los vasos sanguíneos, promoviendo el engrosamiento y endurecimiento de la pared arterial e incrementando así el riesgo de sufrir las manifestaciones clínicas propias de la enfermedad; por otro lado el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es un ejemplo de proceso inflamatorio donde la activación endotelial es uno de los marcadores más característicos de la enfermedad y la infiltración de los leucocitos hacia los tejidos puede ser determinante para la resolución o agravamiento de la misma. Futuros estudios podrían conducir a la generación de estrategias diagnósticas o terapéuticas que ayuden a combatir estos padecimientos.

## **Conclusión**

El contacto con células endoteliales no activadas, tras la migración inducida por fMLP no induce un aumento significativo de la producción de citocinas o de la fagocitosis en monocitos, lo que puede indicar que el contacto con el endotelio promueve un control de la respuesta inflamatoria ante infecciones o daño de los tejidos.

## Referencias

1. Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* **140**, 771-776 (2010).
2. Serhan, C.N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **6**, 1191-1197 (2005).
3. Woollard, K.J. & Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews. Cardiology* **7**, 77-86 (2010).
4. Dorffle, Y. *et al.* Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* **34**, 113-117 (1999).
5. Wiegand, G., Selleng, K., Grundling, M. & Jack, R.S. Gene expression pattern in human monocytes as a surrogate marker for systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Mol Med* **5**, 192-202 (1999).
6. Pober, J.S. & Sessa, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews. Immunology* **7**, 803-815 (2007).
7. Seguin, R., Biernacki, K., Rotondo, R.L., Prat, A. & Antel, J.P. Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **62**, 412-419 (2003).
8. Williams, M.R., Sakurai, Y., Zughai, S.M., Eskin, S.G. & McIntire, L.V. Transmigration across activated endothelium induces transcriptional changes, inhibits apoptosis, and decreases antimicrobial protein expression in human monocytes. *Journal of leukocyte biology* **86**, 1331-1343 (2009).
9. Foxman, E.F., Campbell, J.J. & Butcher, E.C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *The Journal of cell biology* **139**, 1349-1360 (1997).
10. Luster, A.D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine* **338**, 436-445 (1998).
11. Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B. Human chemokines: an update. *Annual review of immunology* **15**, 675-705 (1997).
12. Lukacs, N.W. *et al.* Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* **86**, 2767-2773 (1995).
13. Rollins, B.J. Chemokines. *Blood* **90**, 909-928 (1997).
14. Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N. & Matsushima, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annual review of immunology* **9**, 617-648 (1991).
15. Le, Y., Murphy, P.M. & Wang, J.M. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in immunology* **23**, 541-548 (2002).
16. Nourshargh, S. & Marelli-Berg, F.M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends in immunology* **26**, 157-165 (2005).
17. Henderson, R.B. *et al.* The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *The Journal of experimental medicine* **194**, 219-226 (2001).
18. Kadono, T., Venturi, G.M., Steeber, D.A. & Tedder, T.F. Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions. *J Immunol* **169**, 4542-4550 (2002).
19. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* **7**, 678-689 (2007).
20. Hidalgo, A., Peired, A.J., Wild, M.K., Vestweber, D. & Frenette, P.S. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* **26**, 477-489 (2007).

21. Berlin, C. *et al.* alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80**, 413-422 (1995).
22. Nourshargh, S., Hordijk, P.L. & Sixt, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 366-378 (2010).
23. Maus, U. *et al.* Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **283**, H2584-2591 (2002).
24. Campbell, J.J., Foxman, E.F. & Butcher, E.C. Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. *European journal of immunology* **27**, 2571-2578 (1997).
25. Campbell, J.J. *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381-384 (1998).
26. Shamri, R. *et al.* Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nature immunology* **6**, 497-506 (2005).
27. Laudanna, C., Kim, J.Y., Constantin, G. & Butcher, E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews* **186**, 37-46 (2002).
28. Constantin, G. *et al.* Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* **13**, 759-769 (2000).
29. Meredith, J.E., Jr. & Schwartz, M.A. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends in cell biology* **7**, 146-150 (1997).
30. Giagulli, C. *et al.* The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. *J Immunol* **177**, 604-611 (2006).
31. Schenkel, A.R., Mamdouh, Z. & Muller, W.A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature immunology* **5**, 393-400 (2004).
32. Phillipson, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2569-2575 (2006).
33. Carman, C.V. & Springer, T.A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *The Journal of cell biology* **167**, 377-388 (2004).
34. Engelhardt, B. & Wolburg, H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *European journal of immunology* **34**, 2955-2963 (2004).
35. Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N. & Lusinskas, F.W. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol* **167**, 2323-2330 (2001).
36. Muller, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology* **24**, 327-334 (2003).
37. Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F. & Dvorak, A.M. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *The Journal of experimental medicine* **187**, 903-915 (1998).
38. McMenamin, P.G., Forrester, J.V., Steptoe, R.J. & Dua, H.S. Ultrastructural pathology of experimental autoimmune uveitis. Quantitative evidence of activation and possible high endothelial venule-like changes in retinal vascular endothelium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **67**, 42-55 (1992).

39. Raine, C.S., Cannella, B., Duijvestijn, A.M. & Cross, A.H. Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **63**, 476-489 (1990).
40. Cinamon, G., Shinder, V., Shamri, R. & Alon, R. Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration. *J Immunol* **173**, 7282-7291 (2004).
41. Millan, J. *et al.* Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nature cell biology* **8**, 113-123 (2006).
42. Nieminen, M. *et al.* Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nature cell biology* **8**, 156-162 (2006).
43. Cros, J. *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**, 375-386 (2010).
44. Wong, K.L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16-31 (2011).
45. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H.W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527-2534 (1989).
46. Ziegler-Heitbrock, H.W. *et al.* The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European journal of immunology* **23**, 2053-2058 (1993).
47. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666-670 (2007).
48. Kreisel, D. *et al.* In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18073-18078 (2010).
49. Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A. & Ziegler-Heitbrock, H.W. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* **87**, 373-377 (1996).
50. Belge, K.U. *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* **168**, 3536-3542 (2002).
51. Weber, C. *et al.* Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of leukocyte biology* **67**, 699-704 (2000).
52. Seong, S.Y. & Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature reviews. Immunology* **4**, 469-478 (2004).
53. Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* **140**, 798-804 (2010).
54. Fleshner, M. Stress-evoked sterile inflammation, danger associated molecular patterns (DAMPs), microbial associated molecular patterns (MAMPs) and the inflammasome. *Brain, behavior, and immunity* **27**, 1-7 (2013).
55. Rubartelli, A. & Lotze, M.T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology* **28**, 429-436 (2007).
56. Garg, A.D. *et al.* Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et biophysica acta* **1805**, 53-71 (2010).
57. Krysko, D.V. *et al.* Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends in immunology* **32**, 157-164 (2011).
58. Aneja, R.K. *et al.* Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance. *Journal of leukocyte biology* **84**, 1326-1334 (2008).
59. Orlova, V.V. *et al.* A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin. *The EMBO journal* **26**, 1129-1139 (2007).

60. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1-5 (2007).
61. Kono, H., Chen, C.J., Ontiveros, F. & Rock, K.L. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1939-1949 (2010).
62. Rock, K.L. & Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology* **3**, 99-126 (2008).
63. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology* **11**, 136-140 (2010).
64. Asea, A. *et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of biological chemistry* **277**, 15028-15034 (2002).
65. Breloer, M. *et al.* Heat shock proteins as "danger signals": eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. *European journal of immunology* **31**, 2051-2059 (2001).
66. Scheibner, K.A. *et al.* Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* **177**, 1272-1281 (2006).
67. Saito, H. *et al.* Extracellular ATP stimulates interleukin-dependent cultured mast cells and eosinophils through calcium mobilization. *International archives of allergy and applied immunology* **94**, 68-70 (1991).
68. Kobayashi, T., Kouzaki, H. & Kita, H. Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J Immunol* **184**, 6350-6358 (2010).
69. Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104-107 (2010).
70. Iyer, S.S. *et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20388-20393 (2009).
71. McDonald, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* **330**, 362-366 (2010).
72. Adler, J. Chemoreceptors in bacteria. *Science* **166**, 1588-1597 (1969).
73. Ward, P.A. & Newman, L.J. A neutrophil chemotactic factor from human C5. *J Immunol* **102**, 93-99 (1969).
74. Snyderman, R., Phillips, J. & Mergenhagen, S.E. Polymorphonuclear leukocyte chemotactic activity in rabbit serum and Guinea pig serum treated with immune complexes: evidence for c5a as the major chemotactic factor. *Infection and immunity* **1**, 521-525 (1970).
75. Ward, P.A., Lepow, I.H. & Newman, L.J. Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. *The American journal of pathology* **52**, 725-736 (1968).
76. Schiffmann, E. *et al.* The isolation and partial characterization of neutrophil chemotactic factors from Escherichia coli. *J Immunol* **114**, 1831-1837 (1975).
77. Marasco, W.A. *et al.* Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **259**, 5430-5439 (1984).
78. Carp, H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *The Journal of experimental medicine* **155**, 264-275 (1982).
79. Prossnitz, E.R. & Ye, R.D. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics* **74**, 73-102 (1997).
80. Schiffmann, E., Corcoran, B.A. & Wahl, S.M. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1059-1062 (1975).

81. Durstin, M., Gao, J.L., Tiffany, H.L., McDermott, D. & Murphy, P.M. Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **201**, 174-179 (1994).
82. Christophe, T. *et al.* The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH<sub>2</sub> specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *The Journal of biological chemistry* **276**, 21585-21593 (2001).
83. Rao, R.M. *et al.* Elastase release by transmigrating neutrophils deactivates endothelial-bound SDF-1 $\alpha$  and attenuates subsequent T lymphocyte transendothelial migration. *The Journal of experimental medicine* **200**, 713-724 (2004).
84. Starkey, P.M., Barrett, A.J. & Burleigh, M.C. The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochimica et biophysica acta* **483**, 386-397 (1977).
85. Waddell, T.K., Fialkow, L., Chan, C.K., Kishimoto, T.K. & Downey, G.P. Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *The Journal of biological chemistry* **270**, 15403-15411 (1995).
86. Means, T.K. & Luster, A.D. Integrins limit the Toll. *Nature immunology* **11**, 691-693 (2010).
87. Hamerman, J.A., Ni, M., Killebrew, J.R., Chu, C.L. & Lowell, C.A. The expanding roles of ITAM adapters FcR $\gamma$  and DAP12 in myeloid cells. *Immunological reviews* **232**, 42-58 (2009).
88. Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et biophysica acta* **1754**, 253-262 (2005).
89. Ribeiro, C.M. The role of intracellular calcium signals in inflammatory responses of polarised cystic fibrosis human airway epithelia. *Drugs in R&D* **7**, 17-31 (2006).
90. Schmid, M.C. *et al.* PI3-Kinase  $\gamma$  Promotes Rap1a-Mediated Activation of Myeloid Cell Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, Leading to Tumor Inflammation and Growth. *PLoS one* **8**, e60226 (2013).
91. Adamzik, M. *et al.* The NFKB1 promoter polymorphism (-94ins/delATTG) alters nuclear translocation of NF- $\kappa$ B1 in monocytes after lipopolysaccharide stimulation and is associated with increased mortality in sepsis. *Anesthesiology* **118**, 123-133 (2013).
92. Creagh, E.M. & O'Neill, L.A. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in immunology* **27**, 352-357 (2006).
93. Mancilla Herrera, I. (En proceso).
94. Woodfin, A. *et al.* The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nature immunology* **12**, 761-769 (2011).
95. Ahmed, K.A., Munegowda, M.A., Xie, Y. & Xiang, J. Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses. *Cellular & molecular immunology* **5**, 261-269 (2008).
96. Laudanna, C. *et al.* Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *The Journal of biological chemistry* **269**, 4021-4026 (1994).
97. Hebert, M.J., Gullans, S.R., Mackenzie, H.S. & Brady, H.R. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1 $\beta$ -dependent paracrine loop. *The American journal of pathology* **152**, 523-532 (1998).
98. Kloppenburg, M. *et al.* The tetracycline derivative minocycline differentially affects cytokine production by monocytes and T lymphocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**, 934-940 (1996).
99. Xaus, J. *et al.* LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- $\alpha$ . *Blood* **95**, 3823-3831 (2000).
100. Mocsai, A. *et al.* Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature immunology* **7**, 1326-1333 (2006).

101. Wang, L. *et al.* Indirect inhibition of Toll-like receptor and type I interferon responses by ITAM-coupled receptors and integrins. *Immunity* **32**, 518-530 (2010).
102. Han, C. *et al.* Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nature immunology* **11**, 734-742 (2010).
103. Niedergang, F. & Chavrier, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Current opinion in cell biology* **16**, 422-428 (2004).
104. Zhang, Y. & Wang, H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology* **135**, 268-275 (2012).
105. Mold, C., Gresham, H.D. & Du Clos, T.W. Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs. *J Immunol* **166**, 1200-1205 (2001).
106. Bharadwaj, D., Mold, C., Markham, E. & Du Clos, T.W. Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* **166**, 6735-6741 (2001).