



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**PAPEL DE IL-17 EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE
SUPERFICIE EN MONOCITOS HUMANOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

MÓNICA DANIELA MORA RUÍZ



MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: PÉREZ TAPIA SONIA MAYRA

VOCAL: Profesor: MARTÍNEZ ÁLVAREZ JULIO CÉSAR

SECRETARIO: Profesor: CHÁVEZ SÁNCHEZ LUIS

1er. SUPLENTE: Profesor: PÉREZ MONTESINOS GIBRAN

2° SUPLENTE: Profesor: OLVERA GARCÍA GUSTAVO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA, UNIDAD DE ALTA ESPECIALIDAD DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA “DR. SILVESTRE FRENK FREUND”, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA:

DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ.

SUSTENTANTE:

MÓNICA DANIELA MORA RUÍZ

Este trabajo fue financiado en parte con el apoyo del proyecto de Investigación Científica Básica con número 177669 de la convocatoria 2012 del Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y con el apoyo del programa del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número FIS/IMSS/PROT/G13/1221. Así como con el apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica con número 226292 de la convocatoria 2013 del CONACYT.

Tabla de contenido

Abreviaturas.....	I
Índice de figuras.....	III
Introducción.....	1
Marco Teórico.....	2
Diferenciación de células Th17	2
Interleucina-17 y su receptor	4
Señalización del complejo IL-17RA e IL-17RC por la IL-17	5
Participación de interleucina-17 en la enfermedad.....	6
La IL-17 en la defensa del huésped	8
El monocito.....	9
Papel de la IL-17 en los monocitos	13
Planteamiento del problema.....	14
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivo particular.....	15
Hipótesis.....	16
Diseño experimental	17
Tipo de estudio	17
Población de estudio.....	17
Criterios de inclusión.....	17
Criterios de Exclusión	17
Criterios de Eliminación.....	17
Variables independientes.....	18

VARIABLES DEPENDIENTES	19
METODOLOGÍA	22
Obtención de células mononucleares	22
Purificación de monocitos	22
Determinación de la expresión de moléculas de superficie en monocitos	22
Citometría de flujo	23
Análisis estadístico.....	23
Diagrama de flujo	24
Resultados	25
Expresión de CD11b en monocitos	25
Capacidad de activación de monocitos a la IL-17 en la expresión de CD11b	25
Efecto de IL-17 en la expresión de CD11b y CCR2 en monocitos	26
Efecto de la IL-17 en la expresión de CD14 y TLR4 en monocitos	27
Efecto de la IL-17 en la expresión de CD16 y CD36 en monocitos	28
Efecto de IL-17 en la expresión de CD86 y HLA-DR en monocitos	29
Discusión	31
Conclusión.....	34
Perspectivas.....	35
Referencias	36

Abreviaturas.

APC	Alofococianina
CCR	Receptor de quimiocinas
CD	Grupo de diferenciación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
HLA	Antígeno de leucocitos humanos
IFN- γ	Interferón- γ
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NF κ B	Factor nuclear κ -B
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células asesina naturales T

PAMP	Patrones asociados a membranas de patógenos
PBS	Regulador de fosfato salina
PE	Ficoeritrina
ROR γ t	Del inglés, “RAR-Related Orphan Receptor γ t”
Rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor de células T
Th	Célula T cooperadora
TGF- β	Factor de crecimiento transformante- β
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α

Índice de figuras.

Figura 1.	Diferenciación de células Th17.....	3
Figura 2.	Familia de receptores de IL-17.....	5
Figura 3.	Representación esquemática de las vías de señalización del complejo IL-17RA/IL-17RC.....	7
Figura 4.	Funciones de IL-17 e IL-22 durante una infección pulmonar de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
Figura 5.	Moléculas de superficie de monocitos.....	12
Figura 6.	Expresión de CD11b en los monocitos.....	25
Figura 7.	Cinética de expresión de CD11b en monocitos.....	26
Figura 8.	Expresión de CD11b y CCR2 en monocitos.....	27
Figura 9.	Expresión de CD14 y TLR4 en monocitos.....	28
Figura 10.	Expresión de CD16 y CD36 en monocitos.....	29
Figura 11.	Expresión de CD86 y HLA-DR en monocitos.....	30

Introducción.

Los linfocitos T cooperadores 17 juegan un papel esencial en la respuesta inmune, secretando citocinas como la interleucina-17 (IL-17) y colaborando con otras células en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, así como en la defensa del huésped contra infecciones por patógenos.

Algunos de los efectos de la IL-17 se han explorado en monocitos y se ha demostrado una reducción de CCR2 y CXCR4, lo que sugiere un efecto proinflamatorio. Sin embargo, se desconoce la actividad biológica de la IL-17 en otras moléculas de superficie de la respuesta inmune en los monocitos.

Los monocitos de sangre periférica en humanos representan aproximadamente el 10% del total de las células mononucleares, permanecen en circulación y migran a los tejidos donde se diferencian en macrófagos o en células dendríticas. Los monocitos expresan en la superficie diversas moléculas como: CD16 considerado un receptor de baja afinidad para anticuerpo IgG; HLA-DR, la cual es indispensable para la presentación de antígeno; receptores de quimiocinas que incluye a CCR2, el cual participa en la migración a diversos tejidos; también expresan CD86 que está involucrado en la co-estimulación de linfocitos T; además de moléculas de adhesión críticas para la migración de monocitos como CD11b; así como receptores involucrados en el reconocimiento de PAMPs como LPS (CD14, TLR4) y LDLox (CD36).

Hasta la fecha se desconoce si la IL-17 afecta de manera diferencial la expresión de las moléculas: CD14, CD16, HLA-DR, CD86, CCR2, CD11b, TLR4 y CD36 en monocitos al estímulo de la IL-17 y si así fuera cuales serían las posibles consecuencias inmunes.

Por lo que el proyecto se dirige a contestar la siguiente pregunta: ¿Cuál es la relación del efecto biológico de la IL-17 en la expresión de moléculas de superficie involucradas en activación celular, presentación de antígeno, co-estimulación y activación en monocitos humanos?

Marco Teórico

Diferenciación de células Th17

Los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel importante en la regulación de diversas respuestas en el sistema inmunológico. Los linfocitos T *naïve* al ser estimulados a través del receptor de células T (TCR) y en conjunto con un microambiente de citocinas determinado, se pueden diferenciar en distintos linajes, entre estos, incluye a los linfocitos T cooperadores (Th) 1 y Th2, los cuales se diferencian al estímulo de citocinas como IL-12 e IL-4, respectivamente. Los linfocitos Th1 se caracterizan por la producción de interferón (IFN)- γ y juegan un papel importante en la protección contra patógenos intracelulares, mientras tanto los linfocitos Th2 producen interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9 e IL-13 y están involucrados en la respuesta contra parásitos [1-3].

Existe otra estirpe de linfocitos T CD4⁺, conocida como Th17. La diferenciación de linfocitos Th17 en humanos, se induce por citocinas que incluye al factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), IL-6, IL-21 e IL-1 (figura 1). El impacto de la IL-6 e IL-21 en la diferenciación de células Th17 no es muy claro. Sin embargo, el TGF- β en combinación con la IL-6 o TGF- β más IL-21 inducen la expresión del factor de transcripción ROR γ t que es característico del linaje de linfocitos Th17. El ROR γ t es esencial para disparar la expresión del receptor de IL-23. A su vez la IL-23 estabiliza el compromiso de desarrollar células del linaje Th17, a través de la supervivencia y expansión de las células Th17 [2-7].

Los linfocitos Th17 son productores de citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- α , IL-6, IL-26 y GM-CSF [1,5,8]. Se ha demostrado que las células Th17 cuentan con una plasticidad que les permite secretar citocinas como IFN- γ e IL-4, las cuales se asocian con un perfil Th1 y Th2, respectivamente [4-6,8,9].

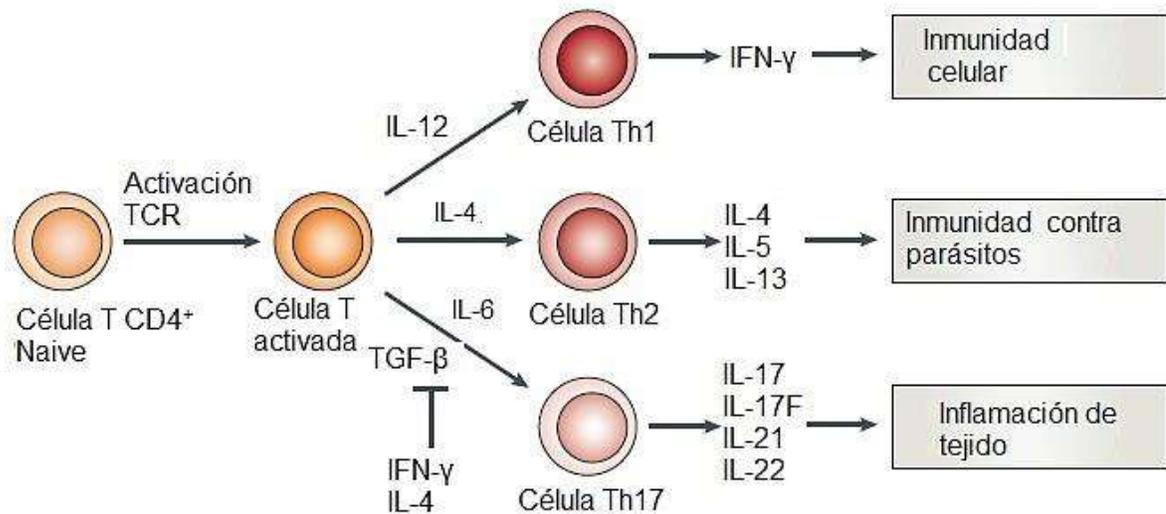


Figura 1. Diferenciación de células Th17. Las células T CD4⁺ *naive*, después de la activación por la señalización a través del TCR y de moléculas coestimuladoras, puede diferenciarse en uno de los linajes de células T efectoras, Th1, Th2 o Th17. Estas células producen diferentes citocinas y tienen distintas funciones inmunoreguladoras. El IFN- γ producido por las células Th1, es importante para la inmunidad celular en respuesta a patógenos intracelulares. Las células Th2 productoras de IL-4, IL-5 e IL-13 regulan la inmunidad contra parásitos y son mediadores de las enfermedades alérgicas. Las células Th17 secretan citocinas como IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22 y regulan las respuestas inflamatorias [modificado de 10].

Interleucina-17 y su receptor

Las células Th17 producen diversas citocinas, la más estudiada es la IL-17A (IL-17), la cual también es secretada por macrófagos, células dendríticas, células NK, células NKT y células T $\gamma\delta$ [11].

Actualmente se conoce que existen 6 moléculas de la familia IL-17: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F, estas moléculas se presentan como homodímeros, además del heterodímero IL-17A/F. El producto del gen de la IL-17A humano es una proteína de 150 aminoácidos con un peso molecular de 15 kDa y se secreta como un homodímero unido por puentes disulfuro de 30 a 35 kDa [16]. El homodímero A, es quién tiene una mayor actividad, seguido por el heterodímero A/F. Esta familia de citocinas, provee una nueva vía de comunicación entre la inmunidad innata y adaptativa [3,5,12-16].

Los efectos biológicos de la IL-17 son mediados por la interacción con su receptor, el cual es una glicoproteína transmembranal de tipo I, que se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y neutrófilos [1,4,12,14-19]. Hasta la fecha se han descrito cinco miembros de receptores para la familia de la IL-17 e incluye al receptor para IL-17 (IL-17RA), y los receptores IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE (figura 2) [20,21].

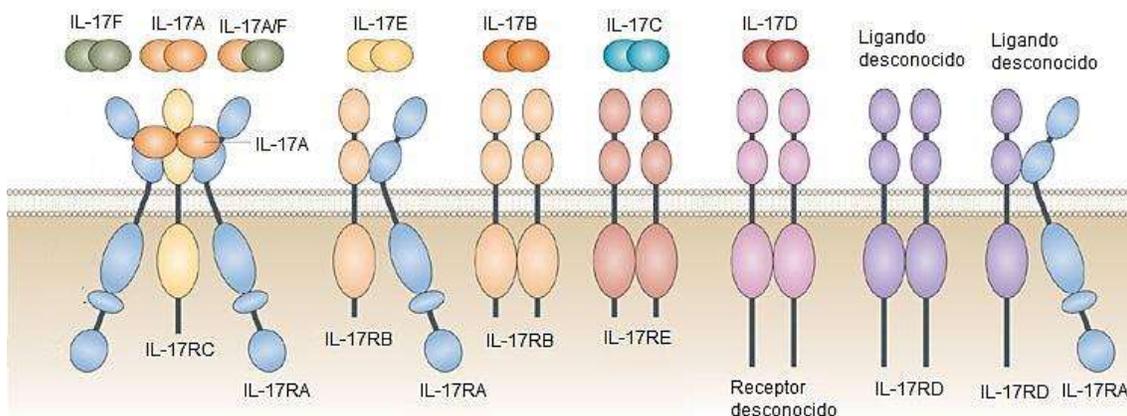


Figura 2. Familia de receptores de IL-17. Se han identificado seis miembros de la familia de citocinas de IL-17 (IL-17A a la IL-17F) y cinco receptores de la familia de la IL-17 (IL-17RA al IL-17RE). Los receptores forman complejos a través de los cuales reconocen sus ligandos. El receptor para IL-17D se desconoce, así como los ligandos para para el IL-17RD o para el complejo conformado por el IL-17RD/IL-17RA [modificado de 22].

Señalización del complejo IL-17RA e IL-17RC por la IL-17

La IL-17 induce la activación de un complejo heterodimérico conformado por los receptores IL-17RA e IL-17RC. Posteriormente, en el dominio intracelular SEFIR y TIR de los receptores de IL-17, se recluta Act1 que actúa como una molécula adaptadora que se asocia a TRAF6, entonces la auto-poliubiquitinación de TRAF6 permite la asociación con el complejo TAK1 (TAK1-TAB2-TAB3), activando el complejo IKK para la activación de NF- κ B. TRAF6 es también requerido para la activación de JNK inducido por la IL-17. La señalización de NF- κ B por la IL-17 suprime la expresión de miR-23b para detener su efecto supresor sobre sus blanco TAB2 y TAB3, ocasionando un incremento en la activación de NF- κ B. También, se requiere de Act1 para la activación de C/EBP. Act1 señala de manera independiente de TRAF6 pero dependiente de TRAF2 y TRAF5 y se denomina la vía dependiente para la

estabilización de mRNA de múltiples genes. En condiciones normales SF2 se une al mRNA provocando su degradación. Sin embargo, la estimulación de IL-17 induce el reclutamiento de SF2 al complejo Act1/TRAF5/TRAF2 induciendo la liberación y estabilización del mRNA. La cinasa IKKi media la asociación de Act1 o TRAF5 a través de la fosforilación directa de la serina 311 de Act1 [23]. La activación de esta vía de señalización induce la producción de moléculas pro-inflamatorias como CXCL1 e IL-1 [24]. Por otro lado, la señalización de IL-17RA/IL17RC por la IL-17 es desregulada por la proteína HSP90, la cual interactúa con Act1, lo que ocasiona una desregulación de la activación de la vía de señalización de complejo IL-17RA/IL17RC por la IL-17 [23]. Otro mecanismo de regulación se induce a través del receptor soluble IL-17RA inhibe selectivamente la actividad de IL-17, mientras que el receptor soluble IL-17RC inhibe a IL-17F (figura 3) [1,11,13,15,25].

Participación de interleucina-17 en la enfermedad

En las enfermedades inflamatorias y autoinmunes en humanos y modelos animales se ha establecido que la IL-17 es uno de los principales actores en la respuesta inflamatoria. En este sentido, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta las arterias, particularmente cardíacas, cerebrales y renales [26]. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de placas ateroscleróticas que consisten en núcleos necróticos, acumulación de lípidos modificados, células espumosas, así como células endoteliales y leucocitos activados [27]. En este contexto, se ha descrito la presencia de linfocitos Th17 en las placas aterosclerosas de humanos [28]. Inclusive, el incremento de la frecuencia de linfocitos Th17 correlaciona con la severidad y la progresión de la aterosclerosis en ratones y humanos [28,29]. Además, el número de linfocitos Th17 en sangre periférica se encuentran elevados en pacientes con infarto agudo del miocardio y se ha descrito una asociación entre los niveles de IL-17 y la severidad de la enfermedad cardiovascular [28-31].

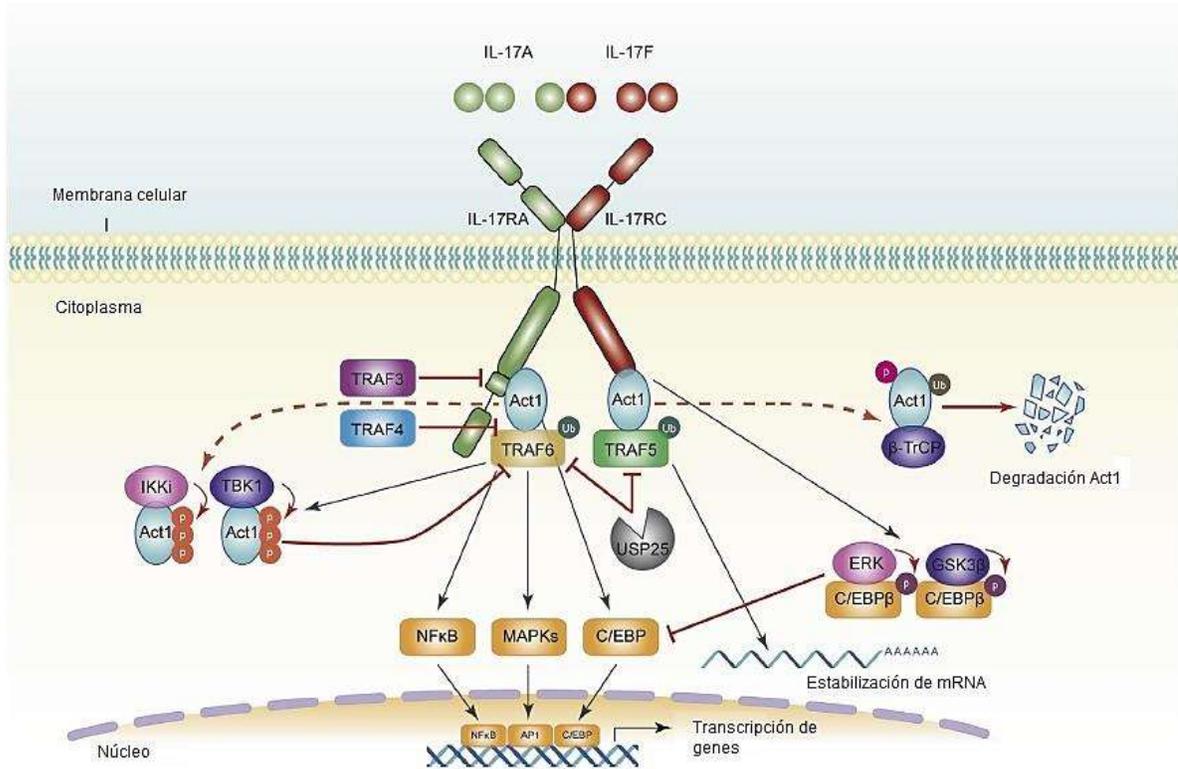


Figura 3. Representación esquemática de las vías de señalización del complejo IL-17RA/IL-17RC. La señalización del complejo IL-17RA/IL-17RC se inicia cuando reconocen a la IL-17. El complejo IL-17RA/IL-17RC señala a través de la vía dependiente de TRAF6 e inician una compleja señalización la cual involucra diversas proteínas, resultando en la activación de NF- κ B lo que genera la expresión de citocinas pro-inflamatorias. También, el complejo IL-17RA/IL-17RC señala a través de una vía independiente de TRAF6 pero dependiente de TRAF2 y TRAF5 lo cual desencadena la estabilización de mRNA de múltiples genes (Act1: activador 1; TRAF: factor asociado al receptor TNF- α ; IKKi: cinasa de I κ B; I κ B: Inhibidor del factor nuclear kappa.B; NF- κ B: Factor nuclear κ B; TBK1: cinasa de unión a TANK 1; USP25: proteasa específica de ubiquitina 25; MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos; c/EBP: proteína de unión a promotor CCAAT; β -TrCP: proteína que contiene β -transducina repetida; ERK: cinasa regulada por señal extracelular; GSK3 β : glucógeno sintasa cinasa 3 β) [modificado de 23].

En el modelo animal de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) que se utiliza para el estudio de la esclerosis múltiple (EM) de humanos, se ha demostrado en ratones con EAE deficientes de la señalización de IL-17, una atenuación en la severidad de la enfermedad al compararse con los ratones silvestres. En el mismo sentido, la deficiencia de Act1 atenúa la severidad de la EAE, confirmando el papel patogénico de la IL-17 en la EM [17]. Más aún, estudios clínicos están utilizando la terapia con un anticuerpo anti-IL17A (secukinumab) el cual neutraliza a la IL-17. Estos estudios han demostrado una reducción en el número de nuevas lesiones en la esclerosis múltiple. Además, estudios *in vitro* han demostrado que el secukinumab disminuye la producción de IL-6 por astrocitos humanos [31,32].

Otra enfermedad autoinmune sistémica crónica es el lupus eritematoso sistémico (LES), el cual se caracteriza por la producción de anticuerpos contra antígenos nucleares, resultando en la inflamación y daño a múltiples órganos [33]. Al igual que en artritis reumatoide, los niveles de IL-17 se encuentran elevados en el suero de pacientes con LES. La IL-17 interrumpe el paso de células B a través de los ganglios linfáticos, lo cual puede promover la generación de células autoreactivas y aumentar la producción de anticuerpos. Además se ha descubierto que la IL-17 en sinergismo con BAFF, puede proteger a las células B de la apoptosis, aumentando el número de células productoras de auto-anticuerpos [14].

La IL-17 en la defensa del huésped

Las células productoras de IL-17 se encuentran en gran proporción en mucosas y juegan un papel importante en la defensa del huésped contra bacterias, como lo es *Klebsiella pneumoniae*, causante de neumonías (figura 4) [34]. La señalización de IL-17 a través de su receptor es crucial para la producción de G-CSF y el reclutamiento de neutrófilos durante la infección de éste patógeno extracelular. Los ratones deficientes de IL-17RA, muestran una respuesta carente de G-CSF y granulopoyesis, aumentando la susceptibilidad de adquirir

una infección, además de que encuentran una disminución de CXCL1, afectando el reclutamiento de neutrófilos. Aquellos ratones deficientes en IL-17RA también son susceptibles a infecciones por *Toxoplasma gondii* y *Candida albicans* [31,34].

Los efectos biológicos de la IL-17 puede ejercerlos directamente en distintos blancos celulares entre los que destacan células del sistema inmune innato como los monocitos [1,4,13,15,25].

El monocito

Los monocitos son células mieloides del sistema fagocítico mononuclear y representan el 10% del total de las células mononucleares de sangre periférica en humanos. Los monocitos son células del sistema inmune innato y juegan un papel central en diversas condiciones patofisiológicas como un componente de la respuesta inflamatoria, como en las infecciones bacterianas, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras [35,36]. Los monocitos pueden migrar a tejidos y son precursores de diferentes tipos de células efectoras, entre las que se encuentran los macrófagos y las células dendríticas, cumpliendo con diversas funciones como es la secreción de citocinas, transporte de antígenos y polarización de células T [36].

Los monocitos expresan en su superficie celular receptores de quimiocinas (CCR) esenciales para el reclutamiento a tejidos, receptores de reconocimiento de patrón requeridos para el reconocimiento de microorganismos, moléculas de coestimulación, moléculas de presentación de antígeno, así como receptores de citocinas [36,37]. De acuerdo con lo anterior, los monocitos expresan CCR2 cuyo ligando son CCL2, CCL7 y CCL8, entre otros. Este receptor se relaciona con el proceso de adhesión y migración de los monocitos a los tejidos y juega un papel crucial en procesos inflamatorios, en enfermedades inflamatorias crónicas como la aterosclerosis [38-40].

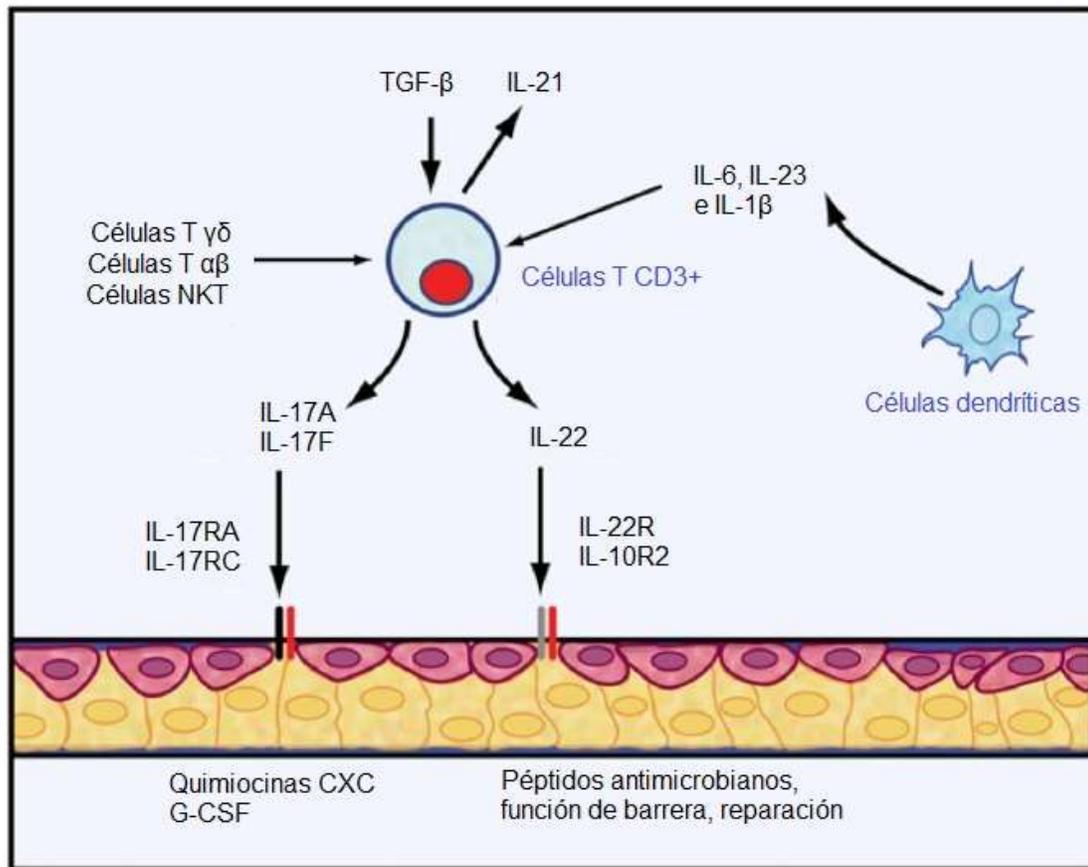


Figura 4. Funciones de IL-17 e IL-22 durante una infección pulmonar de *Klebsiella pneumoniae*. IL-17 e IL-22 son inducidas rápidamente en una neumonía experimental y son producidas por varias poblaciones de células T en pulmón, incluyendo las células T $\gamma\delta$ y las células NKT, así como las células T CD4⁺ efectoras de memoria $\alpha\beta$. IL-17 regula la señalización de granulopoyesis, a través de la regulación de G-CSF, así como el reclutamiento de neutrófilos, a través de la regulación de quimiocinas CXC por las células epiteliales. IL-22 e IL-17 inducen péptidos antimicrobianos de éstas mismas células y la IL-22 puede aumentar la reparación epitelial. Esta inducción cooperativa del reclutamiento de neutrófilos y aumento en la producción de péptidos antimicrobiano en la barrera epitelial son esenciales para la defensa del huésped de la mucosa contra la neumonía bacteriana [modificado de 34].

También, los monocitos expresan CD11b que se asocia no covalentemente con la integrina $\beta 2$ (CD18) para formar el receptor de complemento 3. Funcionalmente, CD11b regula la adhesión y migración de leucocitos hacia los tejidos donde se está montando la respuesta inflamatoria [41-43]. Los monocitos se caracterizan por expresar altos niveles de CD14, el cual es una glicoproteína de membrana glicosilfosfatidilinositol. Además, los monocitos expresan TLR4, el cual es un receptor transmembranal de tipo I. Tanto CD14 y TLR4 se han descrito que son receptores para LPS. Conjuntamente, estos receptores son cruciales en la inmunidad innata brindando protección por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). En presencia de LPS el CD14 colabora con TLR4 disparando la secreción de citocinas pro-inflamatorias, así como la regulación positiva de moléculas de adhesión en monocitos [41,44-47]. Por otro lado, CD36 es una glicoproteína de membrana integral, actúa como receptor basurero multi-ligando, el cual se expresa en monocitos. Funcionalmente, CD36 reconoce a ácidos grasos de cadena larga, lipoproteína de baja densidad oxidada, colágeno tipo I, IV y V, así como a células en apoptosis [48,49]. Asimismo, los monocitos expresan CD16, esta molécula se conoce como el receptor de baja afinidad de IgG (Fc γ RIII) y tiene la capacidad de unir IgG en forma de agregados o en complejos IgG-antígeno. CD16 está involucrado en la fagocitosis y la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC). CD16 se expresa en células NK, monocitos y macrófagos, entre otros [50,51]. También, los monocitos expresan HLA-DR, el cual pertenece al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Esta molécula es crítica para la presentación de antígeno y activación de linfocitos a través de complejo CD3/TCR, así como de la molécula CD4 [41,52,53]. Otra molécula esencial en la activación del linfocito T es CD86, el cual pertenece a la familia de B7 y se denomina como B7-2, la cual interacciona con CD28 desencadenando señales co-estimuladoras que inducen la proliferación celular y producción de citocinas en linfocitos T. En contraste la unión de CD86 con CTLA-4 inhibe estas funciones [54,55].

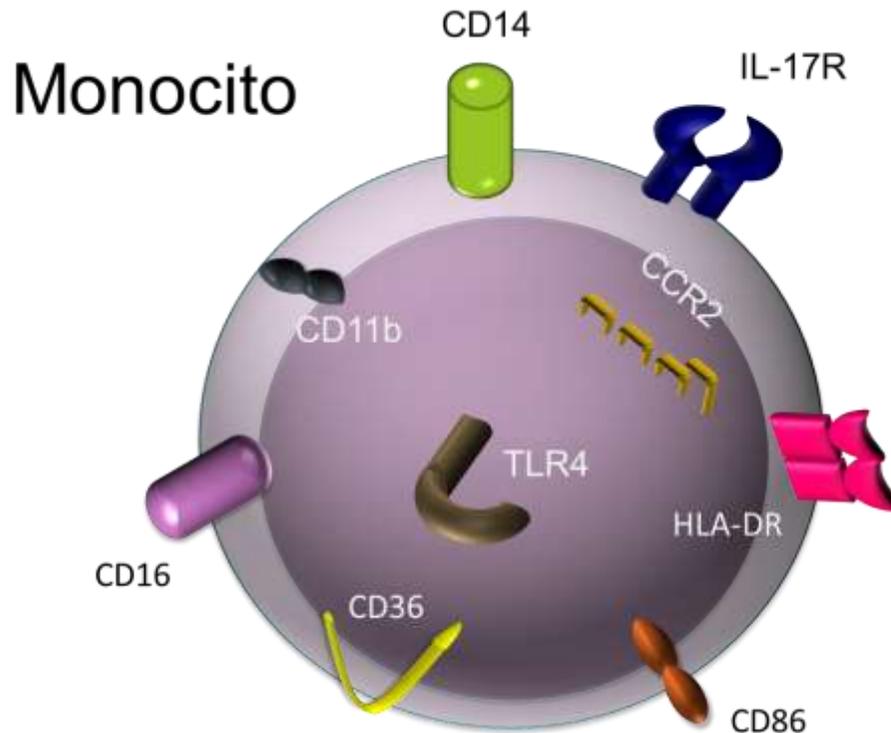


Figura 5. Moléculas de superficie de monocito. Los monocitos expresan en la superficie diversas moléculas como: CD14, el cual es un receptor de LPS; CD16 considerado un receptor de baja afinidad para anticuerpo IgG; HLA-DR, la cual es indispensable para la presentación de antígeno; receptores de quimiocinas que incluyen a CCR2 que al unirse con su ligando (CCL2), media la adhesión y la migración a diversos tejidos; también expresan CD86 que está involucrado en la co-estimulación de linfocitos T; además de moléculas de adhesión críticas para la migración de monocitos como CD11b; así como TLR4 que es el receptor para LPS y CD36, receptor de LDLox.

Papel de la IL-17 en los monocitos

Diversos estudios han establecido que la IL-17 es un mediador pro-inflamatorio que afecta a monocitos y macrófagos. En este contexto, se ha demostrado que monocitos y macrófagos derivados de pacientes con artritis reumatoide producen la metaloproteinasa de matrix 9 al estímulo de la IL-17 [56], en el mismo sentido la IL-17 induce la secreción de IL-1 β en macrófagos humanos [57]; interesantemente la IL-17 disminuye la expresión de CCR2 en monocitos humanos e inhibe la migración de monocitos de ratón [58]. También, se ha explorado el papel de la IL-17 como un factor quimiotrayente, al respecto estudios *in vitro* han demostrado que la IL-17 induce la migración de monocitos derivados de ratón y de pacientes con artritis reumatoide [59,60], cuyo proceso de migración por la IL-17 activa las vías de p38, ERK, JNK y AKT, siendo la vía de p38 la responsable del proceso de migración de los monocitos [60]. Estas evidencias sugieren que IL-17 participa en la respuesta inmune induciendo un fenómeno inflamatorio, más aún IL-17 tiene la capacidad de activar a los monocitos humanos provocando la secreción de citocinas inflamatorias. A pesar de las evidencias existentes no se tiene evidencia del efecto de la IL-17 en moléculas de superficie involucradas en la activación del monocito; por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál será el efecto de la IL-17 en los monocitos humanos en la expresión de CD14, CD16, HLA-DR 7 y CD86, entre otras moléculas?

Planteamiento del problema

La respuesta inmune contra patógenos o en enfermedades inflamatorias, involucra diversos mediadores inflamatorios en lo particular citocinas. Múltiples evidencias han demostrado que la IL-17 juega un papel en la respuesta inmune en la activación de monocitos y macrófagos induciendo la migración y producción de citocinas para la eliminación de hongos y bacterias patógenas. Cabe destacar que la IL-17 dispara la producción de citocinas pro-inflamatorias entre las que se incluye a la IL-1 β , estas evidencias establecen que la IL-17 es capaz de disparar la activación de monocitos. A pesar de las evidencias demostradas, no se conoce el efecto de la IL-17 en la expresión de moléculas de superficie de monocitos; por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál es el papel que juega la IL-17 en la expresión de CD14, CD16, HLA-DR, CD86, CCR2, CD11b, TLR4 y CD36 en monocitos?

Objetivos

Objetivo general

Determinar la expresión de diferentes moléculas de superficie en monocitos humanos en respuesta a la IL-17.

Objetivo particular

- Determinar la expresión de las moléculas CD14, CD16, HLA-DR, CD86, CCR2, CD11b, TLR4 y CD36 en monocitos de sujetos sanos al estímulo de la IL-17.

Hipótesis

La IL-17 afectará de manera diferencial la expresión de las moléculas CD14, CD16, HLA-DR, CD86, CCR2, CD11b, TLR4 y CD36 en monocitos de sujetos sanos.

Diseño experimental

Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental.

Población de estudio

Se incluyeron a 8 donadores sanos que ingresaron en forma consecutiva al Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Criterios de inclusión

1. Donadores masculinos, mayor de 20 años y menor de 30 años.
2. Sujetos normolipidémicos.
3. Sin factores de riesgo cardiovascular.
4. Clínicamente sin aparente enfermedad aterosclerosa.
5. Ausencia de infecciones en la última semana.
6. Firma de consentimiento informado por escrito de su aceptación al presente estudio.

Criterios de Exclusión

1. Donadores que cursen con síndrome anémico.
2. Donadores con antecedentes de enfermedad inflamatoria crónica o proceso infeccioso activo.
3. Antecedentes de tratamiento previo con anti-inflamatorios o inmunosupresores.

Criterios de Eliminación

1. Negativa a firmar consentimiento informado.
2. Donadores en los que no se logre obtener el número de monocitos necesarios para los experimentos.

El estudio fue aprobado por el comité de ética e investigación médica del Instituto Mexicano del Seguro Social y se condujo de acuerdo a las Guías de Declaración de Helsinki.

VARIABLES INDEPENDIENTES

I. Células provenientes de los donadores: Sujetos sanos.

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal

II. Interleucina 17 (IL-17).

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

Definición conceptual: Citocina pro-inflamatoria secretada por células Th17 como dímeros que inducen la producción local de citocinas y el reclutamiento de granulocitos a los sitios de inflamación.

Definición operacional: Citocina recombinante humana derivada de *Escherichia coli*, utilizada para estimular a los monocitos durante 18 horas a 37°C a una concentración de 60 ng/ml.

III. Interferón gamma (IFN- γ)

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

Definición conceptual: Citocina producida por células T y células NK, tiene actividades pro-inflamatorias, induciendo la producción de citocinas, así como regular la expresión de moléculas de leucocitos.

Definición operacional: Citocina recombinante humana derivada de *Escherichia coli*, utilizada para estimular a los monocitos durante 18 horas a 37°C a una concentración de 50 ng/ml.

VARIABLES DEPENDIENTES

I. Molécula CD14.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de Variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: CD14 actúa como receptor de LPS.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-CD14 por citometría de flujo.

II. Molécula CD16.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: Receptor de baja afinidad para anticuerpos de clase IgG.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-CD16 por citometría de flujo.

III. Molécula HLA-DR.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: Molécula involucrada en la presentación de antígeno.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-HLA-DR por citometría de flujo.

IV. Molécula CCR2.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: Receptor de quimiocinas, involucrado en la adhesión y migración a diversos tejidos.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-CCR2 por citometría de flujo.

V. Molécula CD11b.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa

Definición conceptual: Participa en la adhesión a tejidos.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-CD11b por citometría de flujo.

VI. Molécula CD86.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: Participa en la co-estimulación de células T.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-CD86 por citometría de flujo.

VII. Molécula CD36.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: Receptor de LDLox.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-CD36 por citometría de flujo.

VIII. Molécula TLR4.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: Receptor para LPS.

Definición operacional: Molécula analizada a través de anticuerpos anti-TLR4 por citometría de flujo.

Metodología

Obtención de células mononucleares

Se obtuvieron 50 ml de sangre venosa en tubos con EDTA, de sujetos sanos, la cual se diluyó en una proporción 1:2 con solución salina isotónica. Posteriormente, la sangre se colocó sobre 12 ml de Lymphoprep (Axis-Shield, Cambridgeshire, UK) en tubos de 50 ml, se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos. Después, se recuperó la interfase formada entre el plasma y el Lymphoprep, las células obtenidas se lavaron dos veces con solución salina a 1200 rpm durante 15 minutos y 900 rpm, 10 minutos, respectivamente.

Purificación de monocitos

Se realizó la purificación de monocitos, mediante selección negativa utilizando el kit "Pan Monocyte Isolation Kit, human" (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Por cada 10^7 células mononucleares, las células se resuspendieron en 30 μ L de MACS buffer (PBS 1x pH 7.4, BSA 0.5%, EDTA 2mM), adicionando 10 μ L de anticuerpo bloqueador de FcR y 10 μ L de coctel de anticuerpo biotinilado dirigidos a linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, granulocitos, eritrocitos y plaquetas, se incubó durante 5 minutos a 4°C en oscuridad. Finalizada la incubación, se adicionaron 30 μ L de MACs buffer y 20 μ L de anticuerpos anti-biotina unido a una perla magnética, incubando 10 minutos a 4°C. Se lavaron las células con 1 mL de buffer, centrifugando a 1500 rpm por 5 minutos. El paquete celular se resuspendió nuevamente en 1 ml de buffer para pasar las células por una columna LS (Miltenyi Biotec) acoplada a un campo magnético, se recuperó la fracción negativa, correspondiente a los monocitos totales.

Determinación de la expresión de moléculas de superficie en monocitos

De los monocitos puros, se colocaron 200 000 células por pozo en placas de 96. Posteriormente, se estimularon bajo las siguientes condiciones: IL-17 (60 ng/mL), IFN- γ (50 ng/mL), IL-17/IFN- γ , todas recombinantes humanas de la marca "R&D systems" y como control negativo los monocitos se cultivaron solo con medio de cultivo RPMI al 10% de SFB, durante 18 horas a 37°C y 5% de

CO₂. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con FACS buffer (PBS 1x pH 7.4, BSA 0.5%, ázida de sodio 0.01%, EDTA 2mM) para la tinción de moléculas de superficie con anticuerpos anti-humanos: anti-CD14-APC, anti-CD16-FITC, anti-HLA-DR-PECy7, anti-CD86-PE, anti-CD11b-PECy7, anti-TLR4-PECy7 (eBioscience), anti-CCR2-PE y anti-CD36-FITC (R&D System). Se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Después, se lavaron las células con FACS buffer a 1500 rpm por 5 minutos. Las células se resuspendieron en FACS buffer para su evaluación en el citómetro de flujo

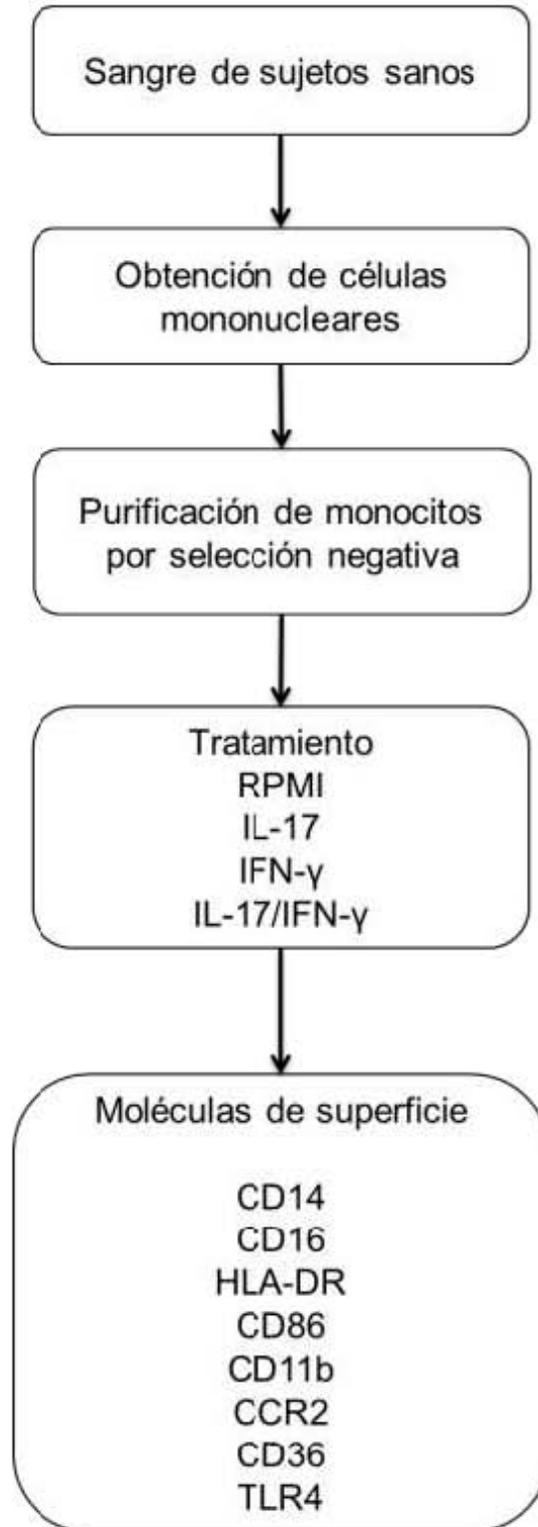
Citometría de flujo

Todas las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo “FACs Canto II”, el análisis de los datos obtenidos se realizó con el software FlowJo versión 7.6.5 (Tree Star, Inc).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de Mann–Whitney. El nivel de significancia en todos los casos fue de una $p \leq 0.005$. El análisis fue realizado utilizando el programa de cómputo GraphPad Prism 6.

Diagrama de flujo



Resultados

Expresión de CD11b en monocitos

Los monocitos se purificaron por selección negativa (obteniendo purezas mayores al 95%), posteriormente se cultivaron 24 horas en medio de cultivo y se les determinó la expresión de CD11b. El análisis de citometría de flujo fue utilizado para evaluar la expresión de las distintas moléculas propuestas en los posteriores experimentos.

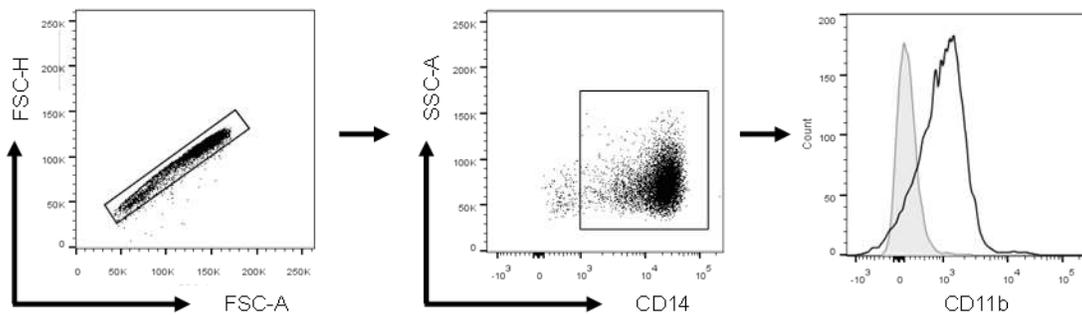


Figura 6. Expresión de CD11b en los monocitos. A partir de una gráfica de singletes se realizó una gráfica de puntos de complejidad contra la expresión de CD14, de la cual se realizó una segunda ventana que permitió identificar a los monocitos positivos para CD11b.

Capacidad de activación de monocitos a la IL-17 en la expresión de CD11b

Para determinar la capacidad biológica de activación de la IL-17, se estandarizó la activación de monocitos con la IL-17 de manera temporal a las 6, 12, 18 y 24 horas. Se encontró que la IL-17 aumenta los niveles de expresión de CD11b de manera temporal hasta las 18 horas, posteriormente a las 24 horas la IL-17 disminuye la expresión de CD11b (figura 7). Con base en la curva obtenida, se decidió utilizar el tiempo de 18 horas para evaluar las diferentes moléculas propuestas en los posteriores ensayos. A los cultivos celulares se les determinó la viabilidad celular por exclusión de azul tripano obteniendo siempre una viabilidad mayor al 90%.

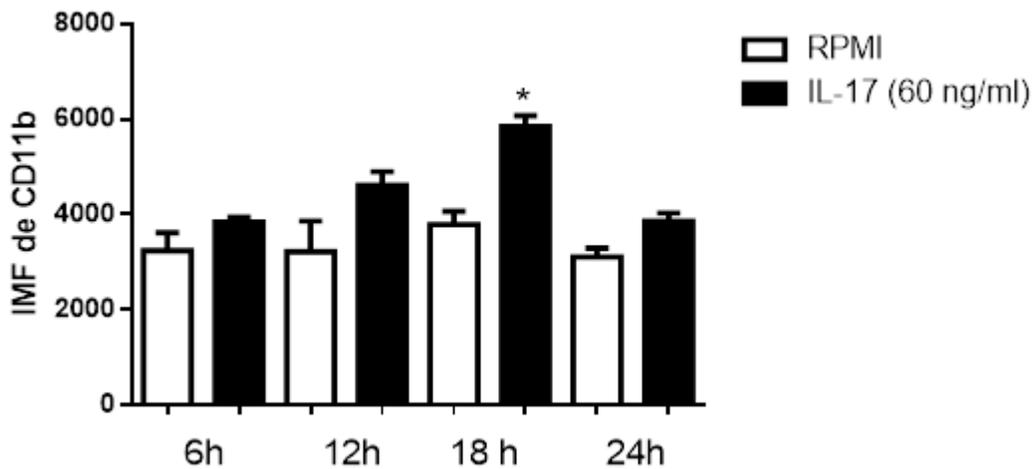


Figura 7. Cinética de expresión de CD11b en monocitos. Los monocitos se cultivaron con medio de cultivo RPMI como control negativo y con 60 ng/ml de IL-17 a las 6, 12, 18 y 24 horas. En cada tiempo se evaluó la expresión de CD11b por citometría de flujo. Datos representativos de 8 experimentos. IMF: Intensidad media de fluorescencia (* $p < 0.05$).

Efecto de IL-17 en la expresión de CD11b y CCR2 en monocitos

Inicialmente, se determinó la expresión de CD11b en población de monocitos al estímulo de la IL-17, por lo que los monocitos purificados se estimularon con la IL-17 a una concentración de 60 ng/ml durante 18 horas. Al analizar la región de monocitos CD14⁺ se determinó que la IL-17 incrementa la expresión de CD11b con respecto a los monocitos cultivados únicamente con medio de cultivo, el estímulo de IFN- γ aumentó aún más los niveles de CD11b con respecto a la IL-17, la combinación de IL-17/ IFN- γ indujo niveles similares de CD11b que el estímulo de IFN- γ (figura 8A). Por otro lado, el estímulo de la IL-17 provocó una reducción en la expresión de CCR2 en relación a los monocitos cultivados solo con medio de cultivo, mientras tanto el estímulo de IFN- γ o el de IL-17/ IFN- γ mantuvieron niveles similares de CCR2 a los determinados en los monocitos cultivados solo con medio de cultivo (figura 8B).

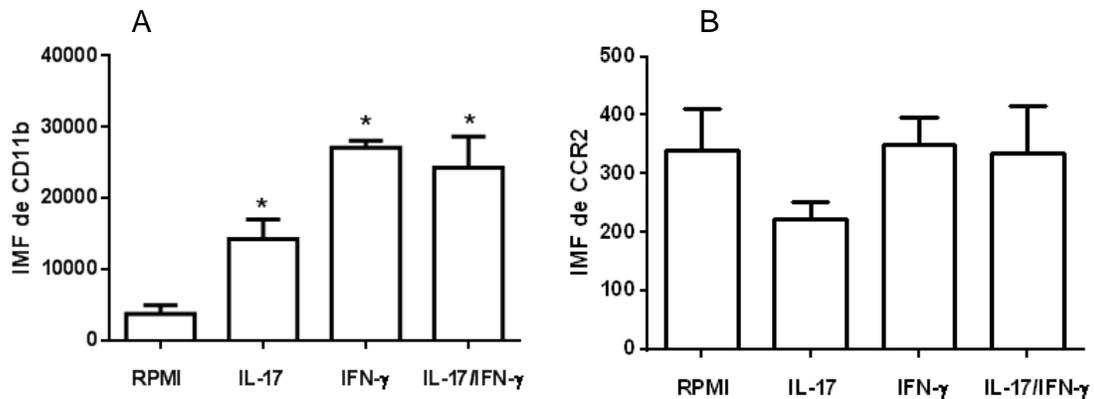


Figura 8. Expresión de CD11b y CCR2 en monocitos. Los monocitos se cultivaron con IL-17 (60 ng/ml), con medio de cultivo RPMI como control negativo, con IFN- γ (50 ng/mL) como control positivo y con la combinación IL-17 (60 ng/mL) /IFN- γ (50 ng/ml) durante 18 horas. La expresión de CD11b y CCR2 se evaluaron por citometría de flujo. Datos representativos de 8 experimentos. IMF: Intensidad media de fluorescencia (* $p < 0.05$).

Efecto de la IL-17 en la expresión de CD14 y TLR4 en monocitos

Posteriormente, evaluamos si la expresión de CD14 y TLR4 se afecta en los monocitos al estímulo de la IL-17. Determinamos que la IL-17 induce un incremento significativo en los niveles de CD14 con respecto a los monocitos cultivados solo con medio de cultivo. Sin embargo, el estímulo de IFN- γ y la combinación de IL-17/IFN- γ redujo la expresión de CD14 al compararse con el estímulo de IL-17 o con los monocitos cultivados solo con medio de cultivo (figura 9A). Al determinar la expresión de TLR4 tanto la IL-17 e IFN- γ tienden a incrementar ligeramente los niveles de TLR4 al compararse con la expresión de TLR4 en los monocitos cultivados solo con medio de cultivo (figura 9B).

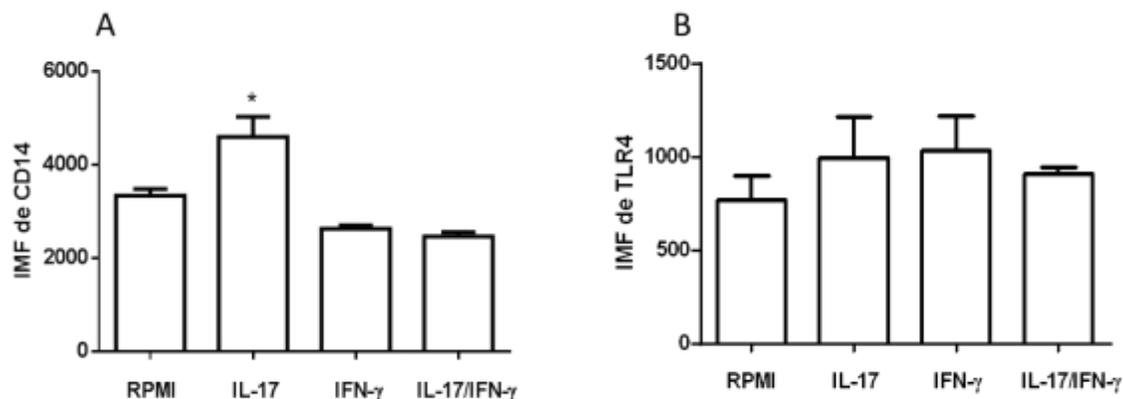


Figura 9. Expresión de CD14 y TLR4 en monocitos. Los monocitos se cultivaron con IL-17 (60 ng/ml), con medio de cultivo RPMI como control negativo, con IFN- γ (50 ng/mL) como control positivo y con la combinación IL-17/IFN- γ durante 18 horas. La expresión de CD14 y TLR4 se evaluaron por citometría de flujo. Datos representativos de 8 experimentos. IMF: Intensidad media de fluorescencia (* $p < 0.05$).

Efecto de la IL-17 en la expresión de CD16 y CD36 en monocitos

Los monocitos fueron tratados con IL-17 para determinar la expresión de CD16 y CD36. La IL-17 no afecta la expresión de CD16 o CD36, los niveles de expresión de ambas moléculas son similares a las expresadas en los monocitos cultivados solo con medio de cultivo, en el mismo sentido el estímulo de IFN- γ o la combinación de IL-17/IFN- γ no afectan la expresión de CD16 (figura 10 A) o CD36 (figura 10 B).

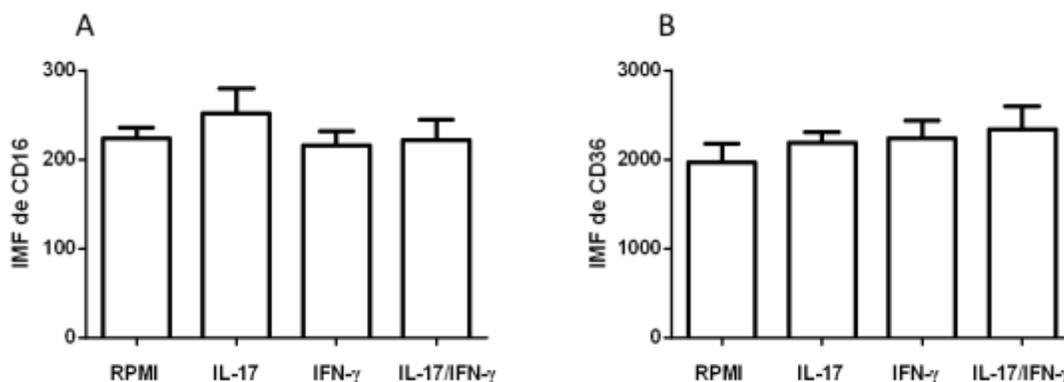


Figura 10. Expresión de CD16 y CD36 en monocitos. Los monocitos se cultivaron con IL-17 (60 ng/ml), con medio de cultivo RPMI como control negativo, con IFN- γ (50 ng/mL) como control positivo y con la combinación IL-17/IFN- γ durante 18 horas. La expresión de CD16 y CD36 se evaluó por citometría de flujo. Datos representativos de 8 experimentos. IMF: Intensidad media de fluorescencia.

Efecto de IL-17 en la expresión de CD86 y HLA-DR en monocitos

Finalmente, se evaluó la participación de la IL-17 en la expresión de CD86 y de HLA-DR en monocitos. Los monocitos humanos fueron tratados con IL-17 durante 18 horas. La IL-17 no afecta los niveles de HLA-DR, en contraste el tratamiento de IFN- γ aumenta significativamente los niveles de HLA-DR, en este sentido el estímulo de IL-17/IFN- γ muestra un efecto aditivo en la expresión de HLA-DR (figura 11A). Los monocitos muestran un incremento en la expresión de CD86 al estímulo de IL-17 al compararse con la expresión de CD86 con los monocitos cultivados solo con medio de cultivo, de manera similar el estímulo de IFN- γ o de la combinación IL-17/IFN- γ indujo niveles similares de CD86 (figura 11B).

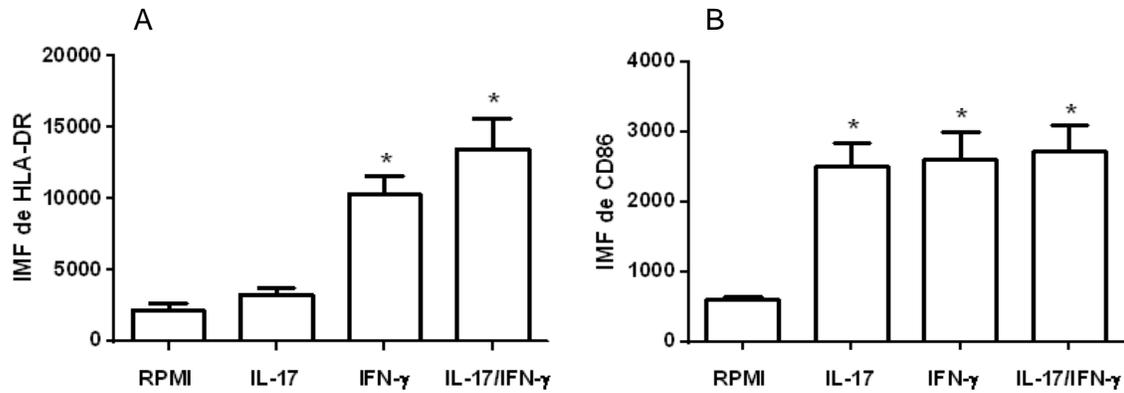


Figura 11. Expresión de CD86 y de HLA-DR en monocitos. Los monocitos se cultivaron con IL-17 (60 ng/ml), con medio de cultivo RPMI como control negativo, con IFN- γ (50 ng/mL) como control positivo y con la combinación IL-17 /IFN- γ durante 18 horas. La expresión de CD86 y de HLA-DR se evaluaron por citometría de flujo. Datos representativos de 5 experimentos. IMF: Intensidad media de fluorescencia (* $p < 0.05$).

Discusión

Los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel importante en la regulación de diversas respuestas en el sistema inmunológico. En este contexto, los linfocitos Th17 participan en la inmunidad celular a través de la eliminación de patógenos durante la defensa del hospedero, así como en diversas enfermedades inflamatorias [31,33,34]. Las células Th17 ejercen sus efectos biológicos a través de diversas citocinas entre las que se incluye a la IL-17, la cual induce la producción de citocinas, quimiocinas pro-inflamatorias y péptidos antimicrobianos [1,13,25]. Más aún la IL-17 dispara la secreción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos [57], los cuales junto con los monocitos son células cruciales del sistema inmune innato [61].

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la IL-17 induce un incremento en la expresión de CD11b en monocitos; lo que sugiere que la IL-17 dispara la activación de los monocitos, así mismo, el incremento en la expresión de CD11b se ha asociado como un marcador de activación, además de que juega un papel en la adhesión firme de monocitos y neutrófilos circulantes a la pared de los vasos sanguíneos [62,63].

En sitios de daño o de lesión del tejido, son reclutadas células del sistema inmune innato y en estos sitios son susceptibles al efecto biológico de citocinas [61]. En este sentido, al evaluar la expresión de CCR2, los resultados demuestran que la IL-17 induce una reducción de CCR2 en los monocitos. Estos resultados concuerdan con lo publicado en la literatura, donde el estímulo de IL-17 en monocitos derivados de ratón disminuyó la expresión de CCR2, lo cual se tradujo en una reducción de la capacidad de migración de los monocitos hacia la CCL2 [56]. La pérdida de CCR2 y de la migración de los monocitos en presencia de IL-17, podría favorecer la acumulación de monocitos, los cuales dispararían el proceso inflamatorio.

Los monocitos expresan en superficie celular CD14 y TLR4, receptores esenciales en la activación del monocito por productos bacterianos [64]. Al evaluar la expresión de CD14 en monocitos estimulados con la IL-17

interesantemente determinamos un incremento en los niveles de CD14, evidencias recientes han demostrado que la IL-17 aumenta el transcrito para CD14 en monocitos [65]; otras citocinas como el GM-CSF también aumentan la expresión de CD14 [66]. Los datos obtenidos sugieren que el tratamiento de la IL-17 podría aumentar la respuesta funcional a ligandos de CD14. Por otro lado, los resultados de la expresión de TLR4 reflejan que la IL-17 tiende a aumentar ligeramente los niveles de TLR4, en el mismo sentido el GM-CSF aumenta los niveles de TLR2 y TLR4 [66].

Los monocitos fagocitan microorganismos o células a través de diversos receptores entre los que se incluye a CD16 y CD36 (receptor gamma III de baja afinidad para Fc) [67-69]. Al evaluar el efecto de la IL-17 en la expresión de CD16 y CD36 no encontramos cambios en la expresión de ambos receptores, lo que sugiere que la IL-17 no afecte la activación de los monocitos a través de estos receptores.

Los monocitos juegan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune específica como células presentadoras de antígeno. La activación de monocitos con LPS o citocinas como el IFN- γ incrementan la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86, así como de HLA-DR esenciales para la activación de linfocitos T [70-72].

Al explorar el efecto de la IL-17 en la expresión de CD86 y HLA-DR determinamos que la IL-17 aumenta considerablemente los niveles de CD86 en los monocitos, lo que concuerda con evidencias previas que han demostrado que la IL-17 induce un incremento de CD86 [73], sugiriendo que la IL-17 contribuye a la respuesta pro-inflamatoria de monocitos. Por otro lado, determinamos que la IL-17 tiende a incrementar ligeramente los niveles de HLA-DR, en el mismo sentido se ha demostrado que altas concentraciones de IL-17 inducen un incremento en la expresión de HLA-DR en monocitos [73] En el mismo contexto, determinamos un efecto aditivo de la IL-17 e IFN- γ en la expresión de HLA-DR. Evidencias recientes han reportado un efecto aditivo de

la IL-17 y LPS en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α [65], el efecto aditivo en la expresión de HLA-DR podría contribuir de manera más eficiente en la presentación de antígeno por el monocito [74].

Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la IL- incrementa la expresión de CD14, CD86, CD11b, así como de un efecto aditivo en la expresión de HLA-DR junto con IFN- γ . Además, de la disminución de CCR2.

Perspectivas

Con base en estos resultados se propone analizar como la IL-17 afecta la expresión de CD14, CD86, CD11b y HLA-DR en monocitos clásicos, no clásicos e intermedios.

Referencias

1. S. Q. Crome, A. Y. Wang and M. K. Levings. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2009; 159: 109-119.
2. G. Huang, Y. Wang and H. Chi. Regulation of Th17 cell differentiation by innate immune signals. *Cell Mol Immunol* 2012; 9 (4): 287-295.
3. K. Hirota, B. Martin and M. Veldhoen. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 3-16.
4. Y. Kurebayashi, S. Nagai, A. Ikejiri and S. Koyasu. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes to cells* 2013; 18: 247-265.
5. E. de Jong, T. Suddason and G. M. Lord. Translational Mini-Review on Th17 Cells: Development of mouse and human T helper 17 cells. *Clin Exp Immunol* 2009; 159: 148-158.
6. F. Annunziato, L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi and S. Romagnani. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008; 20 (11): 1361-1368.
7. N. Yosef, A. K. Shalek, J. T. Gaublomme, H. Jin, Y. Lee, A. Awasthi, et al. Dynamic regulatory network controlling Th17 cell differentiation. *Nature* 2013; 496: 461-468.
8. F. Annunziato, L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi and S. Romagnani. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends in immunology* 2012; 33 (10); 505-512.
9. F. Annunziato, L. Cosmi, V. Santarlaschi, L. Maggi, F. Liotta, F. Frosali, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; 204 (8): 1849-1861.
10. C. Dong. Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 337-348.
11. D. J. Cua and C. M. Tato. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 479-489.

12. C. S. Weaver, R. D. Hatton, P. R. Mangan, and L. E. Harrington. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 821-852.
13. B. W. Kirkham, A. Kavanaugh and K. Reich. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology* 2013; 141: 133-142.
14. R. M. Onishi and S. L. Gaffen. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010; 129: 311-321.
15. S. H. Chang and C. Dong. Signaling of Interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cell Signal* 2011; 23 (7): 1069-1075.
16. S. Liu, X. Song, B. Chrnyk, S. Shanker, L. R. Hoth, E. S. Marr and M. C. Griffor. Crystal structures of interleukin 17-A and its complex with IL-17 receptor A. *Nature Communications* 2013; doi:10.1038/ncomms2880
17. C. Gu, L. Wu and X. Li. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 2013; 64 (2): 477-485.
18. S. Ge, B. Hertel, N. Susnik, S. Rong, A. M. Dittrich, R. Schmitt, et al. Interleukin 17 receptor A modulates monocyte subsets and macrophage generation in vivo. *Plos One* 2014; 9 (1): e85461. doi:10.1371/journal.pone.0085461.
19. F. Fossiez, O. Djoussou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183 (6): 2593-2603.
20. D. Ron, R. Fuchs and D. S. Choev. Know thy self: a novel class of feedback antagonists of receptor tyrosine kinase signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40 (10): 2040-2052.
21. M. Mallett. P. Atzei, A. Horgan, E. Hams, T. Floss, W. Wurst, et al. Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nature Communications* 2012; doi:10.1038/ncomms2127.

22. S. L. Gaffen. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol* 2009; 9 (8): 556-567.
23. X. Song and Y. Qian. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* 2013; 62: 175-182.
24. K. Bulek, C. Liu, S. Swaidani, L. Wang, R. C. Page, M. F. Gulen, et al. The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation. *Nat Immunol* 2011; 12: 844-852.
25. S. L. Gaffen. An overview of IL-17 Function and Signaling. *Cytokine* 2008; 43 (3): 402-407.
26. A. Nicoletti, G. Caligiuri and G. K. Hansson. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *Journal of Internal Medicine* 2000; 247: 397-405.
27. E. Galkina and K. Ley. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 165-197.
28. R. E. Eid, D. A. Rao, J. Zhou, S. L. Lo, H. Ranjbaran, A. Gallo, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2009; 119: 1424-1432.
29. Z. Liu, F. Lu, H. Pan, Y. Zhao, S. Wang, S. Sun, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication. *Atherosclerosis* 2012; 221: 232-241.
30. X. Cheng, X. Yu, Y. Ding, Q. Fu, J. Xie, T. Tang, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol* 2008; 127: 89-97.
31. P. Miossec and J. K. Kolls. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 763-776.
32. G. Elain, K. Jeanneau, A. Rutkowska, A. K. Mir and K. Dev. The selective anti-IL-17A monoclonal antibody secukinumab (AIN457) attenuates IL-

- 17A-induced levels of IL-6 in human astrocytes. *Glia* 2014; 62 (5): 725-735.
33. L. A. Tesmer, S. K. Lundy, S. Sarkar and D. A. Fox. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223: 87-113.
34. W. Ouyang, J. K. Kolls and Y. Zheng. The biological functions of T helper 17 cells effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28 (4): 454-467.
35. G. Lauvau, L. Chorro, E. Spaulding and S.M Soudja. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell Immunol* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.07.007>
36. H. Xiong and E. G. Pamer. Monocytes and infection: modulator, messenger and effector. *Immunobiology* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.08.007>
37. C. Auffray, MH. Sieweke and F. Geissmann. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 669-692.
38. L. Wong, S. J. Myers, C. Tsou, M. Gosling, H. Arai and I. F. Charo. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem* 1997; 272 (2): 1038-1045.
39. C. Papadopoulou, V. Corrigan, P. R. Taylor and R. N. Poston. The role of the chemokines MCP-1, GRO- α , IL-8 and their receptors in the adhesion of monocytic cells to human atherosclerotic plaques. *Cytokine* 2008; 43: 181-186.
40. S. Volpe, E. Cameroni, B. Moepps, S. Thelen, T. Apuzzo and M. Thelen. CCR2 acts as a Scavenger for CCL2 during monocyte chemotaxis. *Plos One* 2012; 7 (5): e37208.
41. L. W. M. M Terstappen, Z. Hollander, H. Meiners, and M. R. Loken. Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. *J Leuk Biol* 1990; 48: 138-148.

42. M. Stewart, M. Thiel and N. Hogg. Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7 (5): 690-696.
43. H. R. Petty and R. F. Tod III. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today* 1996; 17 (5): 209-212.
44. S. D. Wright, R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch and J. C. Mathison. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433.
45. L. A. J. O'Neill, D. Golenbock and A. G. Bowie. The history of Toll-like receptors redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 453-460.
46. N. J. Gay, M. Gangloff and A. N. R. Weber. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (9): 693-698.
47. S. Akira, S. Uematsu and O. Takeuchi. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124 (4): 783-801.
48. D. E. Greenwalt, R. H. Lipsky, C. F. Ockenhouse, H. Ikeda, N. N. Tandon and G. A. Jamieson. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction and transfusion medicine. *Blood* 1992; 80 (5): 1105-1115.
49. G. Endemann, L. W. Stanton, K. S. Madden, C. M. Bryant, R. T. White and A. A. Protter. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993; 268 (16): 11811-11816.
50. H. B. Fleit, S. D. Wright and J. C. Unkeless. Human neutrophil Fc γ receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 279: 3275-3279.
51. U. Wirthmueller, T. Kurosaki, M. S. Murakami and J. V. Ravetch. Signal transduction by Fc γ RIII (CD16) is mediated through the γ chain. *J Exp Med* 1992; 175 (5): 1381-1390.
52. L. J. Stern and J. M. Calvo-Calle. HLA-DR: Molecular insights and vaccine design. *Curr Pharm Des* 2009; 15 (28): 3249-3261.
53. J. A. Edwards, B. M. Durant, D. B. Jones, P. R. Evans and J. L. Smith. Differential expression of HLA class II antigens in fetal human spleen:

- relationship of HLA-DP, DQ and DR to immunoglobulin expression. *J Immunol* 1986; 137 (2): 490-497.
54. C. H. June, J. A. Bluestone, L. M. Nadler and C. B. Thompson. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; 15 (7): 321-331.
55. K. S. Hathcock and R. J. Hodes. Role of the CD28-B7 costimulatory pathways in T cell-dependent B cell responses. *Adv Immunol* 1996; 62: 131-166.
56. D. V. Jovanovic, J. Martel-Pelletier, J. A. Di Battista, F. Mineau, F. Jolicoeur, M. Benderdour and J. Pelletier. Stimulation of 92-k gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2000; 43 (5): 1134-1144.
57. D. V. Jovanovic, J. A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol.* 1998; 160 (7): 3513-3521.
58. M. Troitskaya, A. Baysa, J. Vaage, K. L. Sand, A. A. Maqazachi, G. Valen. Interleukin-17 (IL-17) expression is reduced during acute myocardial infarction: role on chemokine receptor expression in monocytes and their in vitro chemotaxis towards chemokines. *Toxins* 2012; 4: 1427-1439.
59. S. Serqjeva, S. Ivanov, J. Lotvall and A. Lindén. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33 (3): 248-253.
60. S. Shahrara, S. R. Pickens, A. Dorfleitner and R. M. Pope. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2009; 182 (6): 3884-3891.
61. L. Chávez-Sánchez, J. E. Espinosa-Luna, K. Chávez Rueda, M. V. Legorreta-Haquet, E. Montoya-Díaz and F. Blanco-Favela. Innate immune system cells in atherosclerosis. *Archives of Medical Research* 2014; 45 (1): 1-14.

62. M. A. Arnaout. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990; 75 (5): 1037-1050.
63. E. Dadfar, J. Lundahl and S. H. Jacobson. Monocyte adhesion molecule expression in interstitial inflammation in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 (3): 614-622.
64. N. J. Gay, M. F. Symmons, M. Gangloff and C. E. Bryant. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 546-558.
65. C. Erbel, M. Akhavanpoor, D. Okuyucu, S. Wangler, A. Dietz, L. Zhao, et al. IL-17A influences essential functions of the monocyte/macrophage lineage and is involved in advanced murine and human atherosclerosis. *J Immunol* 2014; doi:10.4049/jimmunol.1400181.
66. E. A. Kurt-Jones, L. Mandell, C. Whitney, A. Padgett, K. Gosselin, P. E. Newburger and R. W. Finberg. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 2002; 100 (5): 1860-1868.
67. D. C. Dale, L. Boxer and W. C. Liles. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; 112 (4): 935-945.
68. M. Picozza, L. Battistini and G. Borsellino. Mononuclear phagocytes and marker modulation: when CD16 disappears, CD38 takes the stage. *Blood* 2013; 122 (3): 456-457.
69. R. L. Silverstein and M. Febbraio. C36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2009; 2 (72): re3. doi:10.1126/scisignal.272re3.
70. K. Wolk, W. D. Docke, V. von Baehr, H. D. Volk and R. Sabat. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 2000; 96 (1): 218-223.
71. J. Fleischer, E. Soeth, N. Reiling, E. Grage-Griebenow, H. D. Flad and M. Ernst. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-

- 2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* 1996; 89 (4): 592-598.
72. T. Y. Basham and T. C. Merigan. Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J Immunol* 1983; 130 (4): 1492-1494.
73. O. Zhao, X. Xiao, Y. Wu, Y. Wei, L. Y. Zhu, J. Zhou and D. M. Kuang. Interleukin.17-educated monocytes suppress cytotoxic T-cell function through B7-H1 in hepatocellular carcinoma patients. *Eur J Immunol* 2011; 41 (8): 2314-2322.
74. G. J. Randolph, C. Jakubzick and C. Qu. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr Opin Immunol* 2008; 20 (1): 52-60.