



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

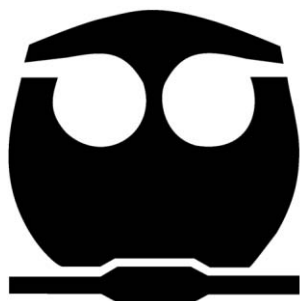
EVALUACIÓN DEL PÉPTIDO
ANTIINFLAMATORIO CDIP-2 COMO
MODULADOR DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN
DE NFkB Y MAPK, EN CÉLULAS
MONONUCLEARES ESTIMULADAS CON LPS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

SANDRA GUZMÁN VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

2015



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: ENRIQUE ORTEGA SOTO

VOCAL: JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SECRETARIO: EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA

1er SUPLENTE: GIBRAN PEREZ MONTESINOS

2do SUPLENTE: GUSTAVO OLVERA GARCÍA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Eduardo A. García Zepeda

SUSTENTANTE:

Sandra Guzmán Vázquez

ÍNDICE

Índice.....	2
1 Introducción.....	3
2 Antecedentes.....	27
3 Justificación.....	31
4 Planteamiento del problema.....	32
5 Hipótesis.....	33
6 Objetivos.....	33
7 Metodología Experimental.....	34
8 Resultados.....	41
9 Discusión.....	53
10 Conclusiones.....	58
11 Apéndices.....	59
12 Bibliografía.....	68

1 INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA INMUNE

El sistema inmune es un conjunto de células efectoras y moléculas que de manera conjunta se encargan de proteger al cuerpo de agentes infecciosos y daño mediante una red de procesos dinámica y compleja.¹

Para proteger efectivamente a un individuo, el sistema inmune debe completar 4 tareas principales. La primera es el reconocimiento inmunológico, la presencia de una infección debe ser detectada. La segunda es contener la infección y si es posible eliminarla por completo. La tercera es la contención de la respuesta para que no dañe el cuerpo; la regulación inmune es una característica importante cuya falla contribuye a condiciones como alergia o autoinmunidad. Y la cuarta tarea es proteger en contra de enfermedades recurrentes de un mismo patógeno. Una característica única del sistema inmune es que es capaz de generar memoria inmunológica, así que al ser expuesto una vez a un agente infeccioso, esa persona tendrá una respuesta fuerte e inmediata en contra de cualquier exposición subsecuente a él.¹

1.1.1 INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

El sistema inmune se compone de dos tipos de respuesta, respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa, las cuales trabajan en conjunto y de manera regulada para eliminar cualquier agente extraño que pueda dañar al individuo.

Para la identificación de patógenos, tanto la inmunidad innata como la adaptativa pueden distinguir entre lo propio y lo extraño, pero difieren en la manera de hacerlo. La inmunidad innata depende de un número limitado de receptores que se encuentran codificados en la línea germinal y que reconocen características comunes a una amplia variedad de patógenos. En contraste, la inmunidad adaptativa utiliza procesos somáticos de reordenamiento de genes para generar

un repertorio enorme de receptores a antígenos que son capaces de distinguir pequeñas diferencias entre moléculas estrechamente relacionadas.² La respuesta innata es normalmente corta, sin embargo, antes de terminar su actividad, la respuesta inmune innata induce moléculas coestimuladoras clave para la inmunidad adaptativa. La intervención subsecuente de la respuesta adaptativa aporta ventajas, como una nueva vía de defensa y la memoria inmunológica.³ Estas y otras características se resumen en la Tabla 1^{1 2 4}.

Tabla 1. Características de la Inmunidad Innata y Adaptativa

	Inmunidad Innata	Inmunidad Adaptativa
Discriminación de lo propio	Perfecta	Imperfecta
Reconocimiento	Patrones moleculares conservados	Detalles de estructura molecular
Distribución	No clonal. Todas las células de la misma clase son idénticas	Clonal. Las células son distintas en cada clase
Diversidad	Limitada, codificada en línea germinal	Muy amplia, los receptores son producidas por recombinación somática de segmentos de genes
Memoria	No	Si
Barreras químicas y celulares	Piel, epitelio mucoso, moléculas antimicrobianas	Linfocitos en el epitelio, anticuerpos secretados en las superficies epiteliales
Proteínas sanguíneas	Complemento, citocinas, quimiocinas.	Anticuerpos
Células	Monocito-Macrófago Polimorfonucleares Células NK Células Dendríticas (CD) Mastocitos	Linfocitos
Tiempo de acción	Inmediata (minutos)	Retardada (horas-días)

Modificada de Abbas, 2012

1.2 INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo, su sistema de defensa se apoya en un número limitado de receptores invariables que reconocen microorganismos. Estos pueden expresarse en la superficie celular, en compartimientos intracelulares o secretados en el torrente sanguíneo y otros fluidos, y se les conoce como receptores de reconocimiento a patógenos (PRR). Los encontramos en células como monocitos, linfocitos, peitelio, neutrófilos y células dendríticas y reconocen moléculas simples y patrones moleculares estructurales conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Tabla 2⁴). Las funciones principales de los PRR incluyen opsonización, activación del complemento y la cascada de coagulación, fagocitosis, activación de vías de señalización proinflamatorias e inducción de la apoptosis.²

Tabla 2. Moléculas de Reconocimiento a Patógenos en el Sistema Inmune Innato

PRR asociados a células	Localización	Ejemplos	Ligandos (PAMP/DAMP)
Receptores tipo Toll (TLR)	Membrana plasmática y endosomal de fagocitos, linfocitos B, CD, etc.	TLRs 1-9	Moléculas microbianas: LPS, peptidoglicano y ácidos nucleicos virales
Receptores tipo NOD (NLR)	Citoplasma de células fagocíticas, epiteliales, etc.	NOD1/2 Familia NALP (inflamomas)	Peptidoglicanos de pared bacteriana, Flagelina, Muramil dipeptidasa, LPS; Cristales de urea, etc.
Receptores tipo RIG	Citoplasma de células	RIG-1, MDA-5	RNA viral

(RLR)	fagocíticas, etc.		
Receptores tipo lectina-C	Membrana plasmática de fagocitos	Receptor de manosa Dectina	Carbohidratos de superficie microbiana con manosa y fructosa terminal, Glucanos presentes en pared celular de hongos
Receptores scavenger	Membrana plasmática de fagocitos	CD36	Diacilgliceridos microbianos
Receptores N-formil met-leu-phe	Membrana plasmática de fagocitos	FPR y FPRL1	Péptidos con residuos N-formilmetionil
Moléculas de reconocimiento soluble	Localización	Ejemplos	Ligandos (PAMP, DAMP)
Pentraxinas	Plasma	Proteína C reactiva	Fosforilcolina y fosfatidiletanolamina microbianas
Colectinas	Plasma	Lectina de unión a manosa Proteínas surfactantes SP-a y SP-D	Carbohidratos con manosa y fructosa terminal Varias estructuras microbianas
Ficolinas	Plasma, alveolos.	Ficolina	N- Acetilglucosamina y componentes acido lipoteicoicos de pared celular en bacterias Gram positivas
Complemento	Plasma	C3	Superficies microbianas
Anticuerpos naturales	Plasma	IgM	Fosforilcolina en membranas bacterianas y membranas de células apoptóticas.

1.2.1 RECEPTORES TIPO TOLL

Los receptores tipo Toll (TLR) son una importante familia de PRRs que están presentes en los macrófagos y otras células del sistema inmune, que son capaces de unir diferentes componentes microbianos.¹ Hasta la fecha se han identificado 10 TLR humanos (TLR1-TLR10) y 12 murinos (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13)⁵, cada uno cuenta con una serie de ligandos específicos que puede detectar. Algunos TLR son receptores de superficie celular, pero otros están localizados intracelularmente en las membranas endosomales en donde detectan patógenos o sus componentes que han sido internalizados por fagocitosis, endocitosis mediada por receptor o macropinocitosis.¹ Los receptores de superficie reconocen principalmente componentes de membrana como lípidos y proteínas, mientras que los intracelulares reconocen ácidos nucleicos.⁵ Estas características se especifican en Tabla 3^{1 6}.

Los TLR son proteínas transmembranales con una región extracelular compuesta de 18-25 copias de repeticiones ricas en leucina (LRR). Estos LRR múltiples dan a la proteína una forma de herradura que es adaptable a la unión del ligando y reconocimiento en ambas superficies.¹ La señalización de los TLR es mediada por dominios TIR (Receptor Toll-IL1) citoplásmicos, que interactúan con proteínas adaptadoras después de la estimulación del ligando. La mayoría de los TLR señalizan vía MyD88, con la excepción de TLR3 que utiliza TRIF; y TLR4 que señala por ambos.⁷

A partir del reconocimiento de su ligando los TLR pueden inducir citocinas inflamatorias, moléculas de coestimulación, interferones tipo I (IFNs) y quimiocinas. La habilidad de los TLR de facilitar la activación y la inducción de citocinas inmunomodulatorias de células presentadoras de antígeno (APCs) como CD y macrófagos, es una acción crítica no sólo para la respuesta innata sino también para inducir la respuesta inmune adaptativa.⁶

Tabla 3. Características de los TLR humanos

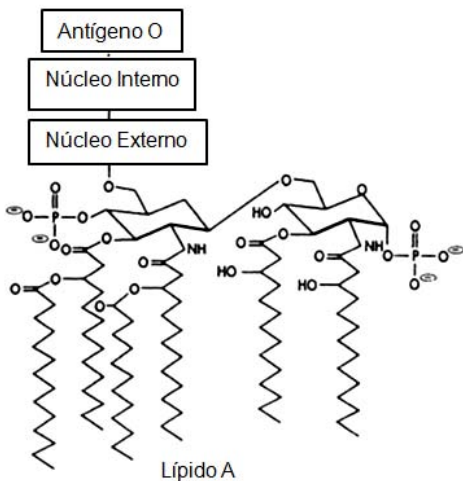
TLR	Ligando	Localización Celular	Distribución Celular
Heterodímero TLR1-TLR2	Lipomananas (micobacterias) Diacil y triacil lipopéptidos	Superficie celular	Monocitos, CD, mastocitos, eosinófilos, basófilos
Heterodímero TLR1-TLR6	Peptidoglicano (bacterias Gram+) B-glucanos de pared celular (hongos) Zymosan (hongos)		
TLR3	ARN doble cadena (virus)	Intracelular	Células NK
TLR4	LPS (bacterias Gram-)	Superficie celular	Monocito/macrófago, CD, mastocitos, eosinófilos
TLR5	Flagelina (bacterias)	Superficie celular	Epitelio intestinal
TLR7	RNA de cadena simple (virus)	Intracelular	CD, células NK, eosinófilos, células B
TLR8	RNA de cadena simple (virus)	Intracelular	Células NK
TLR9	CpG no metilado (bacteria y virus)	Intracelular	CD, eosinófilos, células B, basófilos
TLR10	Desconocido	Superficie celular	CD, eosinófilos, células B, basófilos

Modificado Janeway, 2011

1.2.2 RECEPTOR TIPO TOLL -4 (TLR4)

De los TLR, este es el más estudiado, el cual más allá de estar formado sólo por el receptor, el reconocimiento y su activación se lleva a cabo por una serie de componentes entre ellos CD14.

TLR4 se encarga del reconocimiento de Lipopolisacáridos (LPS), que son componentes de la membrana exterior de las bacterias Gram-. El LPS está compuesto por polisacáridos hidrofílicos y lípido A hidrofóbico. El LPS puede estimular APCs para producir citocinas proinflamatorias, como TNF, causante principal del shock anafiláctico que tiene una alta tasa de mortalidad.³



Existe una amplia variabilidad entre los LPS de diferentes cepas bacterianas, por lo que para proveer una respuesta a el amplio espectro de bacterias Gram-, el complejo receptor de LPS está dirigido hacia el motivo conservado del lípido A, que es el fragmento que activa la respuesta celular.⁸ (Figura 1.1⁹)

El LPS es transferido a las células blanco por la proteína de unión a LPS (LBP), esta es una glicoproteína sérica de 58-60KDa, que consiste de 452 residuos de aa de forma madura, y se une ávidamente a LPS entre los residuos 1-197.⁸ La LBP tiene como función unir y transferir LPS a CD14, proteína componente del receptor a LPS.³

Figura 1.1. Estructura del Lipopolisacárido.

CD14 además es un antígeno marcador mielóide, la proteína madura se expresa en la superficie de las células mieloides vía una cola de glicosilfosfatidil inositol (GPI), que ancla la proteína a la membrana sin un segmento transmembranal.⁹ CD14 es crítico para retener LPS, aunque no puede traducir las señales por sí

sola. Además otra proteína llamada MD-2 también es necesaria para la traducción de la señal, esta es una pequeña proteína secretada que interactúa con el ectodominio de TLR4 y permite, junto con CD14 y TLR4 la activación de la señal por LPS.^{3 10}

1.2.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE TLR4

La señalización por medio de TLR4 induce diversas respuestas intracelulares que juntas resultan en la producción de citocinas inflamatorias, quimiocinas, péptidos antimicrobianos, IFN tipo I, etc. La señalización mediada por TLR a través de la activación de diferentes vías de señalización lleva a su vez a la activación de diferentes factores de transcripción, ya sea NFκB, miembros de IRF o el activador de proteína 1 (AP-1).¹ Esto lo logra mediante la activación de dos vías una dependiente y la otra independiente de MyD88.⁷

1.2.3.1 VÍA DEPENDIENTE DE MYD88

Después de la unión del ligando, la proteína cinasa IRAK4 es reclutada a MyD88. IRAK4 entonces forma un complejo con las cinasas IRAK1, IRAK2, TRAF6 y UBC13. TRAF6 y UBC13 catalizan la formación de cadenas poliubiquitinadas en TRAF6 e IRAK1.⁷

TRAF6 e IRAK1 interactúan con TAK1 y dos proteínas de unión a TAK1, TAB1 y TAB2. La fosforilación de TAK1 y TAB2 ocurre al iniciar la disociación del complejo TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 y la degradación de IRAK1. TAK1 es subsecuentemente activo y puede fosforilar blancos corriente abajo. Tras este paso la señal se bifurca para activar las proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y el inhibidor de NFκB, IKK^{11 12} (Figura1.2⁷)

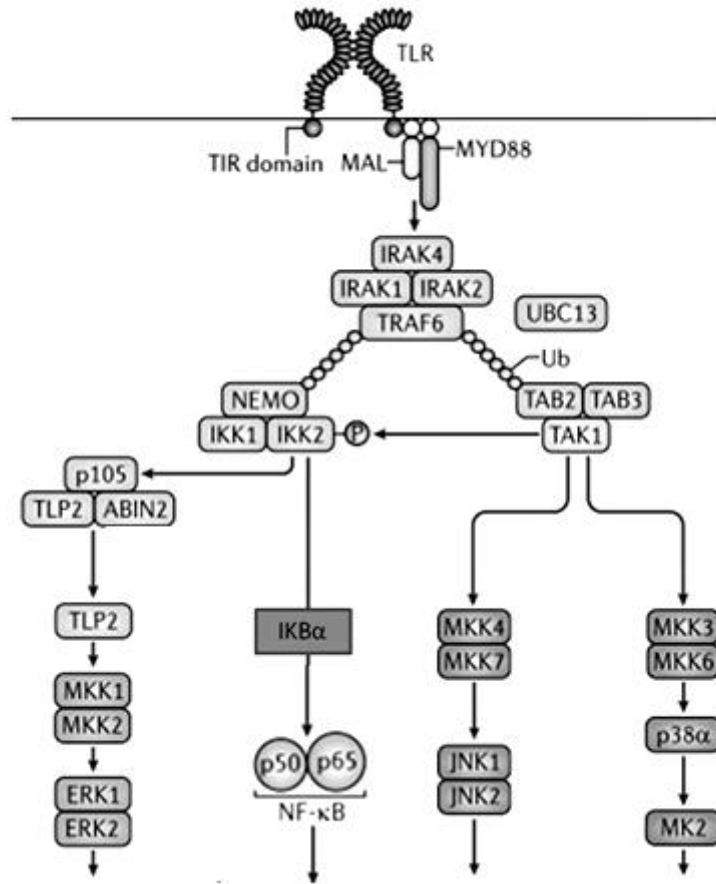


Imagen1.2. Vías de señalización activadas en TLR4 dependientes de MyD88.

1.2.3.1.1 SEÑALIZACIÓN POR NFκB

Una vez iniciada la vía de TLR y la activación de TAK1, se forma un complejo llamado IKK compuesto por IKK1, IKK2 y NEMO. ⁶ Este complejo media la fosforilación de IκB-α, una proteína inhibidora de NFκB, la cual después de su fosforilación, ubiquitinación y degradación, libera el complejo NFκB lo que permite su translocación al núcleo. En el núcleo NFκB se une a secuencias específicas de ADN que promueven la transcripción de los genes blanco. ^{11 13}

NFκB es una proteína dimérica compuesta por homo o heterodímeros. La familia de factores de transcripción de NFκB consiste en 5 miembros: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, and RelB; codificados por NFKB1, NFKB2, RELA, REL, y RELB, respectivamente. Estos comparten un dominio homólogo a Rel (RHD) en el extremo N terminal, que es el responsable de la unión a ADN y la homo y

heterodimerización de los factores de transcripción. Para que estos ejerzan una regulación positiva de la expresión de genes es necesario que uno de ellos contenga un dominio de activación de la transcripción (TAD), los cuales se encuentran en p65, c-Rel, y RelB. Como p50 y p52 carecen de TAD estos reprimen la transcripción mientras no estén asociados con alguno de los otros factores.^{14 15}

1.2.3.1.2 SEÑALIZACIÓN POR MAPK

Las MAPK están formadas por 5 subgrupos: ERK1/2, ERK5, JNK, p38 y ERK6. De estas ERK1/2, JNK y p38 son parte de la activación de los TLR.

La cascada de las MAPK es modular ya que comprende tres eventos subsecuentes de fosforilaciones; esto significa que cada MAPK es fosforilada por una o dos MKK, que a su vez son activadas por MKK cinasas (MAP3K) corriente arriba.¹⁶

Así la MAP3K TAK1 activa las MKK que activan p38 y JNK; MKK4 y MKK7 para JNK, y MKK3 y MKK6 para p38.¹⁷ Por otro lado MKK1 y MKK2, que activan ERK1/2, son activadas por la MAP3K TPL2, que se encuentra formando un complejo con la subunidad precursora de NFκB p105, que tras la activación de IKK es fosforilada y degradada.⁷ Así la activación corriente abajo de las MAPK lleva a la inducción de factor de transcripción AP-1.¹⁸

1.2.3.2 VÍA INDEPENDIENTE DE MYD88

La señalización por la vía independiente de MyD88 comienza después de la activación de la vía dependiente, cuando el complejo TLR4-MD2-CD14-LPS es internalizado y retenido en un endosoma temprano, en donde activa una señal secundaria al reclutar los adaptadores TRAM y TRIF.¹¹

TRAM se asocia con TRIF, que posteriormente recluta TRAF3. TRAF3 se asocia con las proteínas TANK, TBK1 e IKKi, lo que promueve la señalización corriente abajo, que lleva a la dimerización de IRF3 quien activa la transcripción de genes IFN tipo I, así como otros factores como NFκB.^{11 18}

TRIF también puede activar NFκB y AP-1 por una vía alternativa. El extremo carboxilo terminal de TRIF contiene un motivo RHIM el cual al asociarse con la proteína RIP1, que interactúa y activa el complejo TAK1, llevando a la activación de la vía de MAPK y NFκB. ^{5 19} (Figura1.3¹⁸)

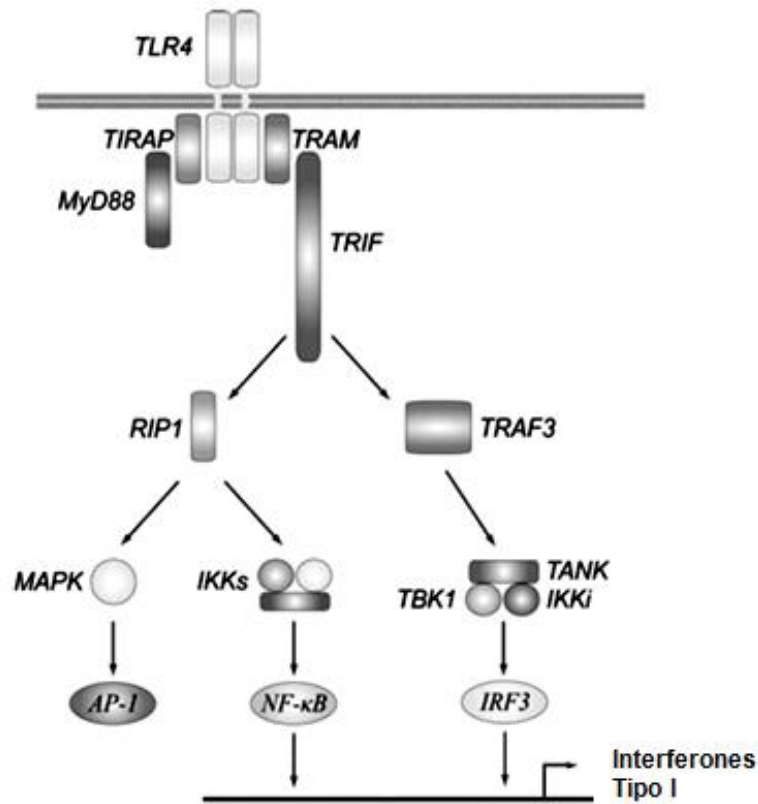


Figura1.3 Vías de señalización activadas en TLR4 independientes a MyD88.

1.3 RESPUESTA INFLAMATORIA

El daño a tejidos causado por una herida o por un patógeno invasor, induce una secuencia compleja de eventos conocida como respuesta inflamatoria, la que puede ser iniciada por un componente microbiano como LPS al interactuar con su receptor, lo que lleva a la liberación de citocinas, quimiocinas y otros mediadores que crean un estado de inflamación en el tejido.

La inflamación tiene 3 roles esenciales. El primero es llevar moléculas efectoras y células adicionales de la sangre al sitio de infección. El segundo es inducir la coagulación local, que provee una barrera para evitar la propagación de la infección. El tercero es promover la reparación del tejido.²⁰

La inflamación es descrita clínicamente por calor, dolor, rubor y tumor. Cada una de estas características refleja un efecto de citocinas y otros mediadores inflamatorios en los vasos sanguíneos locales. El calor, rubor y tumor son resultado de la dilatación y aumento de permeabilidad de los vasos durante la inflamación, llevando al aumento del flujo de sangre y fuga de fluido y proteínas a los tejidos. Las citocinas proinflamatorias producen cambios en las propiedades adherentes de las células endoteliales, causando que los leucocitos circulantes se peguen al endotelio y migren entre él hacia los sitios de infección, al que son atraídos por quimiocinas. La migración de las células al tejido y sus acciones locales ocasionan el dolor.

El tipo celular principal en la etapa inicial de la respuesta inflamatoria son los macrófagos y neutrófilos, por lo que a ambos se les conoce como células inflamatorias. El flujo de neutrófilos es seguido poco tiempo después por un aumento en la entrada de monocitos, que rápidamente se diferencian a macrófagos, reforzando y sosteniendo la respuesta inmune innata. Después, si la inflamación continúa, los eosinófilos también migran a los tejidos inflamados y contribuyen a la destrucción de los microorganismos invasores. Además, la inflamación aumenta el flujo de linfocitos y de células presentadoras de antígeno del tejido infectado a tejido linfóide cercano, donde activan linfocitos e inician la respuesta inmune adaptativa. Una vez que la respuesta inmune adaptativa se ha activado, la inflamación también recluta componentes efectoras del sistema inmune, como anticuerpos y células T efectoras al sitio de infección.¹

Cabe mencionar que la inflamación es un proceso benéfico cuando es controlado, pero en los últimos años se ha incrementado la incidencia de enfermedades

inflamatorias, las cuales se dan por una falta de control de la respuesta inflamatoria o una activación continua de la misma.

1.4 CITOCINAS

Citocina es un nombre general para cualquier proteína secretada por las células que afecte el comportamiento de las células adyacentes que tengan los receptores apropiados.¹ Las citocinas son pequeñas proteínas no estructurales, con un peso molecular que varía de los 8 a los 40 KDa. Casi todos los tipos celulares son capaces de sintetizarlas y responder a ellas.²¹

Las citocinas, son un grupo grande y heterogéneo de proteínas, que median y regulan aspectos de la inmunidad innata y adaptativa. El genoma humano contiene aproximadamente 180 genes que pueden codificar proteínas con las características de una citocina. Las citocinas generalmente no se encuentran almacenadas como moléculas preformadas, sino que su síntesis es más bien iniciada como resultado de la activación celular. Esta activación celular es transitoria, y el mRNA para citocinas es generalmente inestable y degradado con rapidez, por lo que su síntesis también es transitoria. La producción de algunas citocinas también puede ser regulada y procesada por mecanismos postraduccionales. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan con rapidez, resultando en una explosión al liberarse cuando se necesitan.⁴ En la Tabla 4¹⁰ se resumen las características funcionales generales de las citocinas.

1.4.1 CITOCINAS EN INFLAMACIÓN

La activación de las células por un proceso inflamatorio lleva a la secreción de múltiples citocinas, a continuación se ejemplifican algunas de las citocinas participantes en este proceso (Tabla 5⁴), así como características y funciones de algunas de las citocinas más importantes durante la inflamación.

Tabla 4. Características funcionales de las citocinas

Pleiotropia	Las citocinas tienen múltiples células blanco y acciones
Redundancia	Diferentes citocinas pueden tener acciones similares
Sinergismo /antagonismo	La exposición de las células a dos más citocinas puede llevar a diferentes respuestas cualitativamente
Cascada	Una citocina puede aumentar o disminuir la producción de otra
Transmodulación de receptores	Una citocina puede aumentar o disminuir la expresión de receptores de otra citocina o factor de crecimiento.
Trans-señalización de receptores	Una citocina puede aumentar o disminuir la señalización por receptores para otra citocina.

Modificada de Cytokine Handbook, 2003

Tabla 5. Características generales de algunas citocinas

Citocina	Tamaño	Principal fuente celular	Principales blancos celulares y efectos biológicos
TNF	17kDa 51kDa homotrimerico	Monocito/Macrófagos, Linfocitos T	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación) Neutrófilos: activación Hipotálamo: fiebre Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Musculo, grasa: catabolismo (caquexia)

IL-1	17kDa madura 33kDa precursor	Monocito/Macrófagos, células endoteliales, algunas células epiteliales	Células endoteliales: activación Hipotálamo: fiebre Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda
Quimiocinas	8-15kDa	Leucocitos, células endoteliales, fibroblastos y plaquetas	Leucocitos: quimiotaxis, activación, migración
IL-12	35kDa heterodímero 40kDa subunidades	Monocito/Macrófagos, DC	Células T. diferenciación a Th1 NK y células T: síntesis de IFNg, aumento de actividad citotóxica
INF tipo I (α y β)	Alfa 15-21kDa Beta 20- 25kDa	Monocito/Macrófagos, Fibroblastos	Nk: activación Otros: aumento de expresión de MHC I
IL-10	34-40kDa homodímero 18kDa subunidades	Monocito/Macrófagos, células T (Treg principalmente)	Macrófagos, DC: inhibición de la producción de IL-12 y expresión de coestimuladores y MHC II
IL-6	19-26kDa	Monocito/Macrófagos, células endoteliales, células T	Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Células B: proliferación de células productoras de anticuerpos
IL-15	13kDa	Monocito/Macrófagos	NK: proliferación Células T: proliferación (CD8 memoria)
IL-18	17kDa	Monocito/Macrófagos	NK y T: síntesis IFNg

Modificado de Abbas, 2012

IL-6. Es una glicoproteína que consiste en 212 aa incluyendo una señal hidrofóbica de 28 aa. Es producida por células linfoides y no linfoides y regula la reactividad inmune, la respuesta de fase aguda, inflamación, oncogénesis y hematopoyesis. Sus efectos son sinérgicos con IL-1 y TNF. Es un mediador esencial en la respuesta inflamatoria durante la inflamación localizada y es un componente esencial de la respuesta febril a IL-1 y LPS. Su producción mejora con LPS en monocitos y fibroblastos. Muchos elementos de control transcripcional potenciales han sido identificados en la región conservada del promotor de IL-6: GRFs, AP-1, CRE, NFkB, entre otros.

IL 10. Es producida por linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos/macrófagos, mastocitos y queratinocitos. Los monocitos activados por LPS producen altos niveles de IL-10 en una manera dosis dependiente. Durante el curso de infecciones severas y condiciones de estrés, citocinas, hormonas y derivados del ácido araquidónico son liberados y aumentan la síntesis de IL-10 en monocitos, macrófagos y células T. Tiene actividad autoregulatoria al inhibir la síntesis de mRNA IL-10.

Es una citocina antiinflamatoria y entre su repertorio de acciones se encuentran: Inhibir la actividad de IKK y la unión de NFkB a DNA, así como la activación de ERK1/2 mediada por CD40. También inhibe la inducción del receptor a IL-1 y la expresión de COX2. Inhibe proliferación y producción de citocinas inflamatorias. Su regulación es inhibida por IL-1, TNF, señalización por LPS, SOCS1 y SOCS3.

IL1. Es inicialmente sintetizada como un precursor sin péptido señal. Después del procesamiento y corte de los aminoácidos N-terminal por una proteasa específica, resultan los péptidos llamados maduros. El precursor de 31KDa es biológicamente inactivo y requiere la escisión por una cisteína proteasa, dando como resultado la forma madura de IL-1b de 17.5KDa.

La fuente principal de IL-1 son los monocitos en sangre, macrófagos tisulares y CD. Casi todos los productos microbianos inducen IL-1 β vía TLRs. La síntesis de mRNA maduro requiere la activación de un paso para sobreponerse a la inhibición

intrínseca para procesar el mRNA. Esta disociación entre transcripción y traducción es característica de IL-1 y TNF. Sin traducción la mayoría del mRNA es degradado. Sin embargo el añadir una endotoxina bacteriana aumenta la traducción, una posible explicación es que la estabilización de la región no traducida rica en AU3' toma lugar en células estimuladas con LPS.

La región promotora del gen contiene una caja TATA. Su región reguladora se encuentra distribuida varias miles de bases, corriente arriba del sitio de inicio. El promotor requerido para la transcripción tiene dos regiones potenciadores independientes (-2782 a -2729) y (-2896 a -2846), que parecen actuar cooperativamente. El último contiene un elemento de respuesta a cAMP el elemento NFIL-6 que es responsivo a LPS. El fragmento de 80pb es necesario para la transcripción y contiene en adición a este elemento un sitio tipo NFkB. Sitios tipo AP-1 también participan en la expresión de IL-1b inducido por endotoxina.

Es primariamente una citocina proinflamatoria por su habilidad de estimular la expresión de genes asociados con la inflamación. Su propiedad más relevante es la iniciación de la COX2, fosfolipasa A e iNOS sintasa. También aumenta la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1. Esta propiedad aumenta la infiltración de células inflamatorias e inmunocompetentes en el espacio extravascular.

TNF. Es una citocina pleiotropica que provoca efectos biológicos múltiples. Es sintetizado como precursor transmembranal tipo II de 26KDa, con el extremo N-terminal en el citoplasma y el C-terminal expuesto al espacio extracelular. Este precursor es cortado proteolíticamente entre una alanina (-1) y valina (+1), para dar un TNF maduro de 17KDa que forma trímeros en solución.

TNF se produce por varios estímulos, como LPS en monocitos. TNF es un gen de expresión temprana, y una variedad de estímulos inducen altos niveles de mRNA en 15-30min sin requerimiento de síntesis de novo de proteína, sugiriendo que los

factores necesarios para la inducción de la expresión de TNF preexisten en células sin estimular.

A nivel de transcripción TNF está regulado tanto por activadores como represores. A parte de un promotor caja TATA localizado 20 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, otras secuencias regulatorias incluyen 3 sitios para NFκB designados κ1,2 y3, un elemento de respuesta a AMPc, el factor activador de transcripción-2 (ATF-2), un AP-1, un AP-2, entre otros.¹⁰

Se ha implicado el aumento en la síntesis de TNF en varias enfermedades de inflamación sistémica, como sepsis, artritis y enfermedad de Crohn. Por lo que hay un gran interés en desarrollar inhibidores para atenuar su actividad y controlar la inflamación.

1.5 QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son una familia de pequeñas moléculas solubles de 8-15KDa, estructuralmente relacionadas con actividad quimioatrayente.²² Son secretadas como proteínas básicas que se unen a glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs se encuentran generalmente unidos a proteínas en la superficie celular o en la matriz extracelular, formando estructuras llamadas proteoglicanos. Así cuando son liberados por células endoteliales u otras células parenquimales, las quimiocinas tienden a permanecer concentradas e inmovilizadas en los tejidos.²³

Las quimiocinas son producidas por una amplia variedad de tipos celulares en respuesta a estímulos externos y tienen un rol crucial tanto en homeostasis como durante la enfermedad. Su rol en la homeostasis incluye la maduración y tráfico de leucocitos, desarrollo, organización y reparación de tejido, y angiogenesis. Como moduladores en la enfermedad, las quimiocinas tienen roles en una amplia variedad de respuestas inmunes e inflamatorias: migración celular, activación de leucocitos, actividad antimicrobiana y regulación del proceso inflamatorio.²⁴

Uno de los roles esenciales de la inflamación es la de llevar moléculas efectoras al sitio de daño o infección, rol de las quimiocinas al ser reguladoras del proceso inflamatorio y la migración celular. La migración comienza con el reclutamiento de

leucocitos circulantes de los vasos sanguíneos a sitios extravasculares.⁴
(Figura 1.4¹)

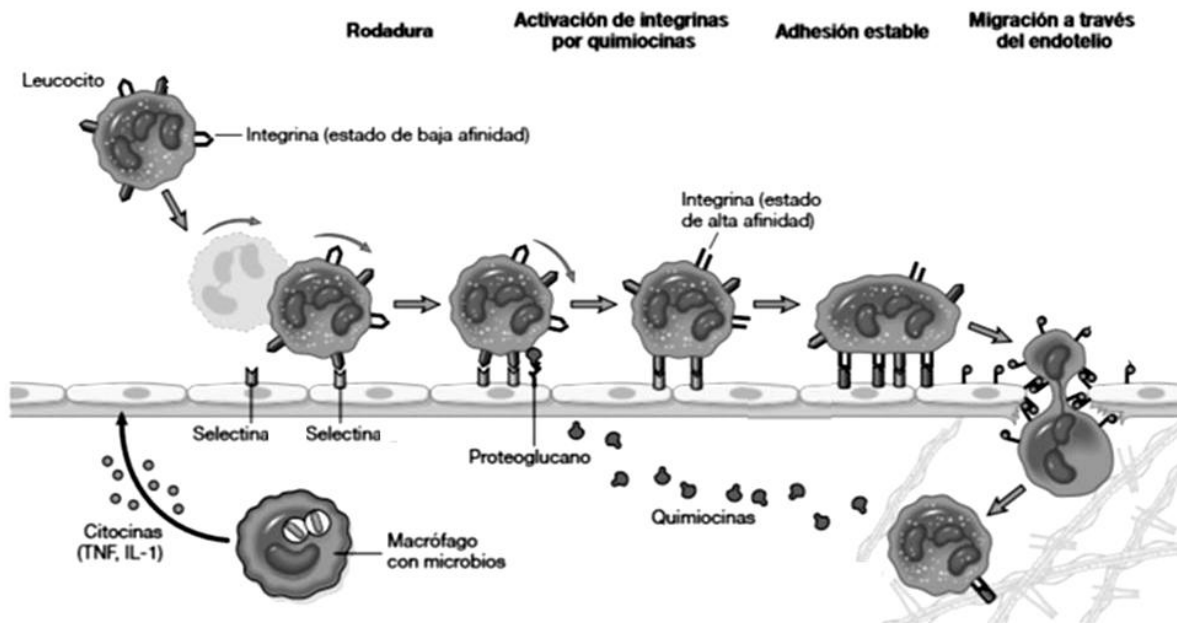


Figura 1.4. Eventos durante la migración leucocitaria de los vasos sanguíneos a sitios extravasculares.

Inicialmente el epitelio es activado por señales como citocinas y los leucocitos son marginados hacia el endotelio,¹ en donde selectinas, una familia de moléculas de adhesión, interactúan con receptores de mucina en los leucocitos por interacciones lábiles, causando un comportamiento de rodamiento del leucocito en la superficie vascular.²⁵

Posteriormente las quimiocinas secretadas en respuesta a la señales de citocinas, se unen a GAGs en la superficie endotelial. La concentración localizada de quimiocinas provee señales de dirección a las células. La unión de las quimiocinas con sus receptores en los leucocitos provoca señales intracelulares que resultan en la firme adhesión de las células mediante integrinas.²⁵ Las integrinas se expresan normalmente en la membrana de los leucocitos en forma de baja afinidad y no se adhieren a sus ligandos apropiados hasta que son activados por las quimiocinas. Cuando los leucocitos se encuentran con las

quimiocinas mostradas, las células se activan y sus integrinas sufren cambios en su conformación y se agrupan, convirtiéndose en una forma de gran afinidad.²⁶ Después los leucocitos migran a través del endotelio, en un proceso llamado diapédesis y migran hacia los sitios de infección o lesión a lo largo de un gradiente quimiotáctico.¹

1.5.1 FAMILIAS DE QUIMIOCINAS

Se han descrito aproximadamente 50 quimiocinas humanas y 20 receptores, estas se encuentran clasificados en 4 familias según la posición de 2 residuos de cisteína conservados cercanos al dominio amino terminal: CC, CXC, CX₃C, XC; la X representa la presencia de un aminoácido cualquiera entre las dos cisteínas (Figura 1.5²⁷).^{23 28}

- 1) Familia CC. Promueve principalmente la migración de células mononucleares. Es la familia más amplia y sus efectos se observan principalmente en procesos inflamatorios, ya que inducen la activación del endotelio y controlan el reclutamiento celular.

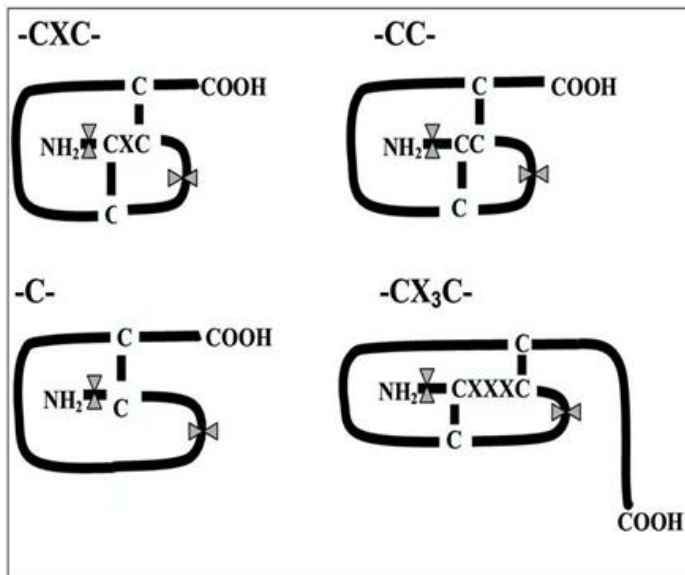


Figura 1.5. Familias de quimiocinas

- 2) Familia CxC. Promueve principalmente la migración de granulocitos. Se subdivide en dos grupos de acuerdo a la presencia o ausencia del motivo ELR (Glu-Leu-Arg)

- 3) Familia CX₃C. Conformada por CX₃XL1 mejor conocida como fractalina, la cual se puede encontrar anclada a la membrana plasmática.

- 4) Familia XC. Conformada únicamente por XCL1 y XCL2. Ambas difieren únicamente por dos aminoácidos (aa).

Además de la clasificación por su estructura, se ha propuesto otra basada en su actividad funcional. Esta agrupa a las quimiocinas en tres categorías: proinflamatorias, homeostáticas y mixtas.²⁴ Las proinflamatorias se expresan durante condiciones de inflamación y están involucradas en el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación. Las homeostáticas se expresan constitutivamente y están involucradas en la migración celular en condiciones fisiológicas como el homing de linfocitos. Y las quimiocinas que se expresan en ambos casos corresponden a las mixtas.²⁹

En el 2000 un nuevo sistema de nomenclatura para las quimiocinas fue introducido, en donde cada ligando y receptor es identificado por la familia a la que pertenece y un número de identificación.²⁵ Anteriormente las quimiocinas eran nombradas en base a su función o las circunstancias en las que fueron descubiertas, en la Tabla 6²⁴, se muestran las quimiocinas mostrando su nombre con la nomenclatura actual y convencional.

Tabla 6. Nomenclatura de Quimiocinas

Quimiocina	Nombre convencional	Quimiocina	Nombre convencional
	Familia CC		Familia CXC
CCL1	TCA3	CXCL1	GRO α
CCL2	MCP-1	CXCL2	GRO β
CCL3	MIP-1 α	CXCL3	GRO γ
CCL4	MIP-1 β	CXCL4	PF4
CCL5	RANTES	CXCL5	ENA-78
CCL7	MCP-3	CXCL6	GCP-2
CCL8	MCP-2	CXCL7	NAP-2
CCL11	Eotaxina	CXCL8	IL-8
CCL13	MCP-4	CXCL9	MIG
CCL14	HCC-1	CXCL10	IP10
CCL15	HCC-2	CXCL11	I-TAC
CCL16	HCC-4	CXCL12	SDF-1
CCL17	TARC	CXCL13	BCA-1
CCL18	DC-CK1	CXCL14	BRAX
CCL19	MIP-3 β	CXCL16	SR-PSOX
CCL20	MIP-3 α	CXCL17	DMC

CCL21	6Ckine	Familia XC	
CCL22	MDC	XCL1	Linfotaxina
CCL23	CKB8	XCL2	SCM-1 β
CCL24	Eotaxina-2	Familia CX3C	
CCL25	TECK	CX3CL1	Fractalina
CCL26	Eotaxina-3		
CCL27	CTACK		
CCL28	MEC		
Modificado de Blanchet, 2012			

1.5.2 RECEPTORES DE QUIMIOCINA Y SEÑALIZACIÓN

Las quimiocinas realizan sus acciones mediante receptores de 7 dominios transmembranales acoplado a proteínas G (GPCRs) y tienen una alta afinidad por sus receptores ($k_a > 10^9$).²⁰ El dominio N-terminal y 3 bucles se encuentran en la parte extracelular, mientras el dominio C-terminal y 3 bucles se encuentran en el citoplasma.²⁵

Un rasgo general de las quimiocinas es la promiscuidad de unión de quimiocinas a sus receptores. La mayoría de los receptores interactúan con más de un ligando, y algunos ligandos reconocen múltiples receptores,²² encontrando una señalización y respuesta distinta a los diferentes ligandos.³⁰

Se ha propuesto un modelo de dos pasos para la unión de la quimiocina a su receptor; la sección N terminal y los bucles extracelulares están involucrados en la unión al dominio central de la quimiocina, mientras que la N terminal de la quimiocina penetra directamente el complejo helicoidal, induciendo así cambios en la conformación del receptor y con esto su activación.³¹

La red de señalización activada por quimiocinas es compleja, permitiendo múltiples resultados funcionales incluyendo quimiotaxis, adhesión, proliferación y control de la expresión génica.³²

La unión de la quimiocina al receptor modifica su estructura, permitiendo la activación de la proteína G.²³ En respuesta, la proteína G activa convierte GDP

en GTP y se disocia.²⁸ Los receptores de quimiocina se pueden acoplar a diferentes isotipos de G α , lo que permite la activación de las distintas vías y por tanto respuestas biológicas (Figura 1.6³³).³⁴

Ya libres las subunidades de la proteína G pueden regular positiva o negativamente enzimas y efectores. La regulación de estos segundos mensajeros modula los niveles de mediadores intracelulares como cAMP, Ca²⁺ y DAG; que a su vez activan o inhiben efectores como PKA, PKC, PI3K, ERK y AKT que en última instancia conducen a una respuesta biológica.²⁹

Los flujos de calcio, causantes de la migración, son usualmente inducidos vía activación directa de la PLC o GTPasas Rho por la subunidad $\beta\gamma$,²³ causando en la primera un incremento en el IP₃ y DAG intracelular, llevando a la liberación de calcio de su almacén intracelular.³² Y en las GTPasas Rho, la activación de Cdc42, que interviene en la direccionalidad de la migración.²⁸

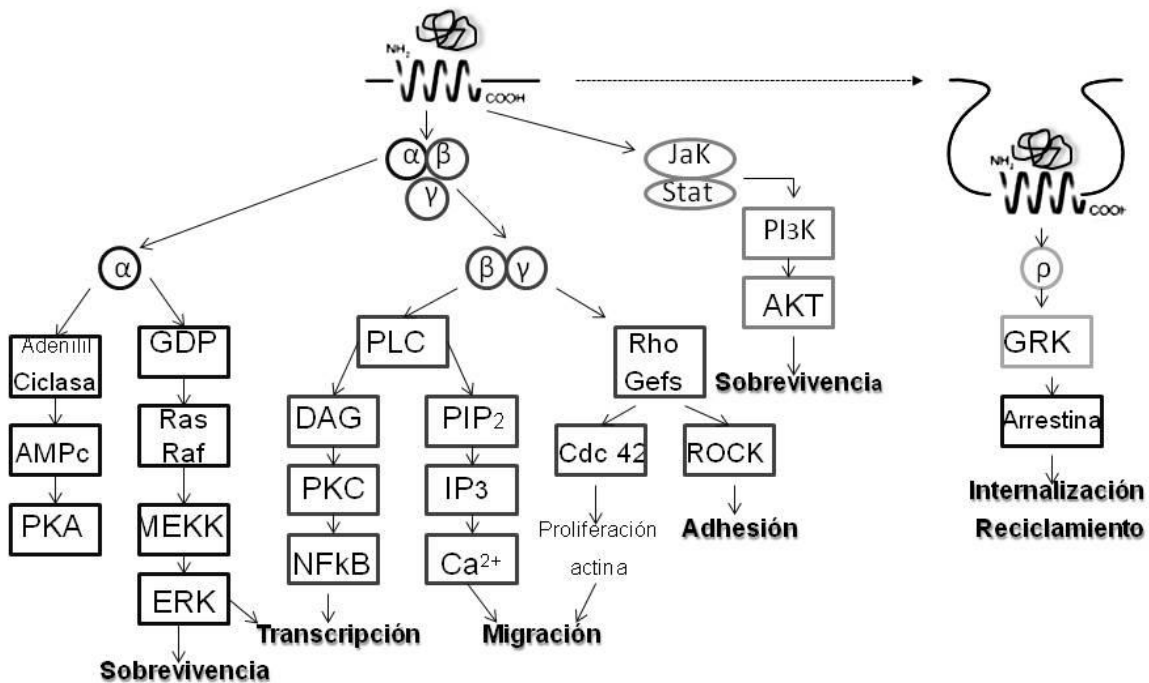


Figura 1.6. Vías paralelas de señalización activadas por quimiocinas. Modificada de Wong, 2008.

Después de la unión del ligando el receptor es internalizado por dos rutas principales. La primera involucra la unión a β -arrestina del receptor, que resulta en el movimiento del receptor a pozos recubiertos por clatrina. El segundo involucra caveolas.³⁵

La vía dependiente de clatrina es la mejor conocida, y es considerada la opción por defecto. Esta comienza minutos después de la activación con la desensibilización del receptor, causado por impedimento estérico a la activación de la proteína G debido a la fosforilación en el carboxilo terminal del receptor por cinasas de GPCR (GRK).²⁵ La fosforilación del receptor promueve la unión a β -arrestina,²⁸ la cual comienza el proceso de internalización al unirse a clatrina. Este complejo es secuestrado en pozos de clatrina, que por la acción de dinamina se convierten en vesículas.³⁵

La habilidad del receptor de quimiocina de interactuar con β -arrestina puede influir en su destino ya que, primero la fuerza y la estabilidad de la interacción es crítica para determinar si el receptor es internalizado; y segundo la afinidad de la interacción determina si el receptor ya internalizado es enviado a degradación o es secuestrado intracelularmente antes de regresar a la superficie celular.³⁰

Las caveolas son microdominios en la membrana plasmática de aproximadamente 50-100nm. Están involucradas en varias funciones celulares como endocitosis, señalización por calcio y transporte de colesterol. Estas pueden internalizarse de manera regulada bajo condiciones bien definidas.³⁵ Los receptores internalizados por esta vía, al igual que con clatrina, pueden reciclarse a la membrana plasmática después de la defosforilación, o ser degradados.

2 ANTECEDENTES

2.1 QUIMIOCINAS COMO BLANCOS DE AGENTES TERAPÉUTICOS

La inflamación aguda es la respuesta normal de los tejidos vascularizados al daño e infección, esta es una respuesta fisiológica que rápidamente recluta células y moléculas de la respuesta inmune innata a sitios potenciales de infección. La ola inicial de reclutamiento de neutrófilos es seguida por el reclutamiento de monocitos que se diferencian en macrófagos.³²

El reclutamiento de neutrófilos y monocitos a tejidos inflamados es dirigido principalmente por dos subfamilias de quimiocinas, la CXC y la subfamilia CC de proteínas quimiotrayentes de monocitos (MCP).²³

Las quimiocinas juegan un rol importante en la respuesta inflamatoria, pero a pesar de la habilidad que esto atrae al controlar infecciones, también puede ser perjudicial en algunas enfermedades inflamatorias como asma, aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (epoc), obesidad y enfermedad inflamatoria intestinal;²⁸ en donde la sobreexpresión de quimiocinas recluta células a los tejidos causando un infiltrado inflamatorio que resulta en daño al tejido,³⁶ y la acumulación patológica de leucocitos.²³

En estos desordenes, se ha sugerido que las quimiocinas y sus receptores pueden utilizarse como blancos terapéuticos para controlar la inflamación, mediante el desarrollo de fármacos que modulen la actividad de quimiocinas y sus receptores.

2.2 PÉPTIDOS DE QUIMIOCINA

Modificar la quimiocina blanco es una opción para crear antagonistas, ya que cambiar la estructura molecular lleva a un diferente patrón de unión y respuesta del receptor.²⁴

La N-terminal de las quimiocinas es un dominio señal clave, ya que es crucial para la señalización del receptor,²⁴ y su eliminación o modificación resulta en variantes, que en algunos casos no inducen señalización pero frecuentemente mantienen

una alta afinidad al receptor. Por ejemplo la delección de 7 residuos del N-terminal de CCL2 resulta en un antagonista a CCR2.²⁵

Modular la actividad de las quimiocinas truncando el dominio N-terminal es un mecanismo regulatorio natural. Las quimiocinas sufren proteólisis postraduccional por varias proteasas, incluyendo CD26/dipeptidil peptidasa IV, que puede cortar los dos aa N terminal en quimiocinas con prolina, hidroxiprolina o alanina en la posición 2 N terminal;²⁸ y metaloproteinasas de matriz (MMPs).

Los productos de la escisión pueden diferir de la quimiocina en su afinidad al receptor, su especificidad al receptor y su habilidad de señalizar por el receptor.

Las MCPs (CCL2, 7, 8, 11 y 13), son todas específicamente cortadas in vitro por al menos un miembro de la familia MMPs. En todos los casos, los productos resultantes mantienen la habilidad de unirse a sus respectivos receptores, pero los productos de escisión de CCL7, 8 y 13 funcionan como antagonistas en la migración celular. Además, otros estudios han demostrado que los productos de CCL2, 7 y 13 reducen significativamente la inflamación inducida por carragenina en modelos murinos.²⁵ Estos resultados se muestran en la Tabla 7²⁵.

Los GPCRs, en contraste a moléculas de adhesión y receptores de citocinas, pueden ser bloqueados por pequeñas moléculas agonistas.²³ Por lo que esta estrategia puede ser adoptada, tomando en cuenta los resultados obtenidos en quimiocinas truncadas, con péptidos derivados de quimiocina para interferir en el sistema de quimiocina para intentar bloquear el reclutamiento de leucocitos en enfermedades inflamatorias.

Tabla 7. Propiedades de péptidos de quimiocina por escisión de MMPs.

Quimiocina	Enzima	Forma procesada (aa)	Propiedades
CCL7/MCP-3	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-13 MMP-14	5-76	-Unión a CCR1/ 2/3 con pérdida de función -Antagonista de quimiotaxis -Disminuye la inflamación mediada por CCL7
CCL2/MCP-1	MMP-1 MMP-3	5-76	-Pérdida parcial de función agonista -Antiinflamatorio en modelos murinos de inflamación
CCL8/MCP-2	MMP-3	5-76	-Unión a CCR2 con pérdida de función -Antagonista de quimiotaxis
CCL13/MCP-4	MMP-1 MMP-3	4-75 5-75 8-75	-Unión a CCR2 y 3 con pérdida de función -Antagonista de quimiotaxis -Antiinflamatorio en modelos murinos de inflamación
CXCL8/IL-8	MMP-9	6-77 7-77	-Aumento de actividad, principalmente a través de CXCR1
CXCL12/SDF-1	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-9 MMP-13 MMP-14	5 – 67 (SDF-1 α) 5 – 72 (SDF-1 β)	-Pérdida de unión a CXCR4

Modificado de Allen, 2007

2.3 CDIP-2, PÉPTIDO DERIVADO DE CCL13

La quimiocina CCL13 es una MCP miembro de la familia de quimiocinas CC, las cuales comparten entre ellas más de un 60% de identidad. En humanos se han descrito 4 MCP: CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3) and CCL13 (MCP-4). CCL13 se une a los receptores CCR1 y CCR2 y al igual que otras MCP, es quimioatrayente de monocitos, células T y CD. Es la única MCP que se une a CCR3, siendo así un importante quimiotrayente de eosinófilos.³⁷ En adición a la quimiotaxis CCL13 también induce la degranulación de eosinófilos, la liberación de

histamina de basófilos y la expresión de moléculas de adhesión y secreción de citocinas proinflamatorias en epitelios.³⁸ Esta quimiocina se ve aumentada en varias enfermedades inflamatorias como asma, artritis, esclerosis múltiple y aterosclerosis.³⁹

CCL13 mRNA es expresado constitutivamente en intestino delgado, timo, colon, corazón y pulmón, pero no en bazo, próstata, testículos, ovarios o leucocitos de sangre periférica. La proteína inmadura tiene 98 aa, y su forma madura 75 aa, con una glicina que se conserva en la familia MCP.^{37 38}

Productos de la escisión por MMPs de CCL13 han presentado, por ejemplo, función antagonista en la migración celular;²⁵ además que péptidos derivados de esta quimiocina han presentado también actividad biológica, como se ejemplifica en la Tabla 8.

Tabla 8. Péptidos derivados de CCL13 con actividad biológica

Péptido	Origen	Actividad
CDCP-1	Escisión por Cruzipaina	Antagonista de quimiotaxis
CDIP-2	Sintético	Antiinflamatoria in vivo
CDAP-4	Sintético	Antimicrobiana
4-75.5-75.8-75	Escisión por MMPs	Antagonista de quimiotaxis

Modificado de Méndez, 2013³⁸

Este trabajo estudia el péptido CDIP-2; este es un péptido sintético antagonista que abarca una pequeña región del amino terminal y parte de la región β -plegada de CCL13.³⁹ Consta de 19 aa: 19-KISLQRLKSYVITTSRCPQ-37 y tiene un peso molecular de 2,221.66g/Mol.

En trabajos anteriores en el laboratorio se ha reportado que CDIP-2, presenta actividad parcial antagonista en migración, derivado de su acción sobre los flujos de calcio (Figura 1.7A). Esto también se ha observado en ensayos *in vivo* en donde disminuyó el número de células en el lavado broncoalveolar en un modelo

murino de asma, así como una disminución en la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF e IL-4(Figura 1.7B).³⁹

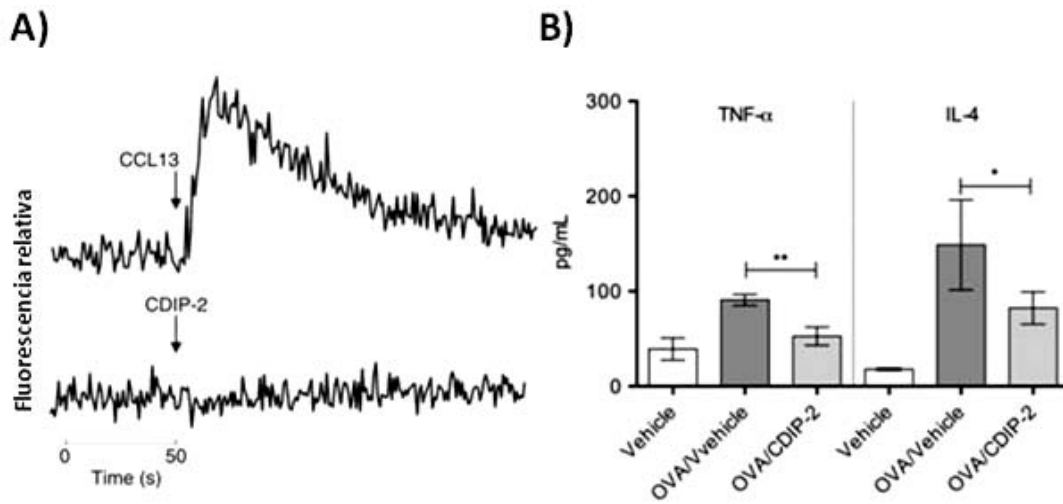


Figura 1.7. Ejemplos del efecto de CDIP-2 obtenidos anteriormente. A) Ensayo de flujo de calcio donde células THP-1 fueron estimuladas con el péptido y la quimiocina por 50 seg. B) Efecto de CDIP-2 sobre la expresión de TNF- α e IL-4 en un modelo murino de asma, medidos por ELISA.³⁹

3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades inflamatorias son un problema de salud prevalente, por lo que han generado distintos ejes de investigación. El eje quimiocina/receptor de quimiocina participa en la patofisiología de estas enfermedades, convirtiendo a las quimiocinas y sus receptores en blancos terapéuticos para su tratamiento.

Los tratamientos actuales presentan desventajas, por lo que se ha desarrollado la búsqueda de terapias alternativas como lo son los péptidos de quimiocina. Estos pueden presentar ventajas y complementar los tratamientos utilizados, por lo que su función y acción es un tema de estudio que requiere investigación.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con los resultados obtenidos anteriormente, en los que CDIP-2 presenta una acción antagonista al disminuir la migración celular y la expresión de $TNF\alpha$, se plantea investigar como CDIP-2 afecta la activación de TLRs por LPS en células mononucleares; debido a que se desconoce si el péptido tendrá algún efecto sobre la señalización por TLRs tras el estímulo, así como en la expresión de citocinas inflamatorias como $TNF\alpha$.

5 HIPÓTESIS

La activación de las vías de señalización de MAPK y NFκB, inducidas por LPS, serán moduladas por el tratamiento con el péptido CDIP-2, lo que se verá reflejado en la disminución de la expresión de TNFα en células mononucleares.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del péptido CDIP-2 sobre la activación de las vías de señalización de MAPK y NFκB, en células mononucleares de sangre periférica tras el estímulo con lipopolisacárido.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Determinar el efecto del péptido CDIP-2 sobre la expresión de citocinas participes en la inflamación.
- ◆ Analizar el efecto de CDIP-2 sobre la activación de las vías de NFκB y MAPK en pasos claves de la señalización.
- ◆ Estudiar el efecto de CDIP-2 en la expresión en membrana de TLR4.

7 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES SANOS Y SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC).

Se obtuvieron entre 7 y 10mL de sangre venosa de voluntarios sanos en tubos Vacutainer® con EDTA, puncionando en la región antecubital del brazo. A continuación se realizó la separación de las células mononucleares utilizando Histopaque 1077 siguiendo el protocolo indicado por el fabricante; se recuperaron las células y contabilizaron mediante el uso de una Cámara de Neubauer modificada revisando su viabilidad con azul de tripano. Por último se resuspendieron en medio RPMI para su uso en los ensayos posteriores.

7.2 DETERMINACIÓN DE CITOCINAS CON UN ENSAYO DE PERLAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO (CBA).

Para conocer si hay diferencias entre citocinas participantes en los procesos inflamatorios con el tratamiento con CDIP-2, se utilizó una placa de 24 pozos, en la que se colocaron las PBMC, a una densidad de 1×10^6 células/mL, con un millón de células por ensayo. Los ensayos fueron: sin estímulo, LPS 5ug/mL, CDIP-2 10 y 100ug/mL, y la combinación de ambos estímulos. Se realizó un pretratamiento a los ensayos con CDIP-2 de 45min, pasado este tiempo se añadió el estímulo de LPS. Se dejó la placa en incubación por 18hrs a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se analizó la concentración de citocinas mediante el Kit para CBA de citocinas humanas proinflamatorias BD® siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, y se analizó en el citómetro Accuri C6 tm BD®.

Con el software del fabricante se obtuvo la concentración de cada ensayo, realizado por duplicado en cada una de las 3 repeticiones, y se calculo el promedio buscando las diferencias entre los tratamientos.

7.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PARA NFkB SUBUNIDAD p65

El factor de transcripción NFkB se transloca al núcleo tras su activación por lo que su localización nos puede indicar la activación de la vía de señalización en la que participa. Para analizarlo inicialmente se preparan los cubreobjetos para que estos estén limpios y estériles; se sumergen en EtOH absoluto por 30min y se dejan secar al aire, después se colocan sobre una caja petri y se exponen a la luz UV por 15min. Después se colocan en una placa de 24 pozos tomándolos con pinzas estériles y colocando uno por pozo, se recubren con fibronectina a una concentración de 20ug/mL y se incuban por 60min a 37°C. Pasado este tiempo se elimina el excedente de fibronectina, y se traspasan los cubreobjetos a una nueva placa, cuidando de colocar la cara cubierta con fibronectina hacia arriba.

Ya tratados los cubreobjetos se prosigue a la estimulación de las células, primero se colocan de $2.5-3.5 \times 10^5$ células por pozo y dejan adherir, en este caso por 1hr. Después de que ha pasado el tiempo de adhesión se retira el medio por vacío, se adiciona 500uL de RPMI y se procede a colocar los estímulos, 10 ug/mL de CDIP-2 por 45min y/o posteriormente 1ug/mL de LPS por 30min⁴⁰.

A continuación proseguimos a la tinción. Primero se realiza la fijación 1:1 con PFA al 7.4% por 4min a TA en agitación, al termino se lava dos veces con PBS1x (5min TA con agitación). Proseguimos a la permeabilización incubando por 20min a TA en agitación con 200uL Tritón 0.1%, al termino lavar 1 vez. Continuar con el bloqueo agregando 300uL de PBS-SFB 2% e incubar en agitación por 10min. Incubar el anticuerpo primario α -p65, dilución 1:150 preparado en PBS-SFB2%, ON a 4°C. Lavar 2 veces e incubar con el anticuerpo secundario Alexa 555 dilución 1:2000 durante 1hr a TA en agitación y oscuridad. Lavar 3 veces. Teñir el núcleo con DAPI 300nM, por 1min a TA en oscuridad y agitación y lavar 3 veces.

Por último se realiza el montaje colocando una gota de DAKO como medio de montaje en el portaobjetos y sobre esta se coloca el cubreobjetos con las células hacia el medio de montaje, sellar con barniz y almacenar en oscuridad a 4°C hasta su análisis. Las laminillas se observaron con el microscopio LAS AF de Leica Microsystems.

7.4 WESTERN BLOT DE FRACCIONES PROTEICAS PARA EL ANÁLISIS DE LA SUBUNIDAD P65 DE NFκB

La localización nuclear de NFκB nos indica la activación de la vía de señalización, por lo que para su análisis se observará la presencia de esta proteína en la fracción nuclear de las células mononucleares.

7.4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES Y CITOPLASMÁTICAS

Primero se realizó la separación de las fracciones proteicas. Para ello se utilizó una placa de 24 pozos, en la que se colocaron las PBMC, a una densidad de 5×10^6 células/mL, con 10 millones de células por ensayo. Los ensayos fueron: sin estímulo, LPS 1ug/mL, CDIP-2 10 y 100ug/mL, y la combinación de ambos estímulos. Se realizó un pretratamiento a los ensayos con CDIP-2 de 45min, pasado este tiempo se añadió el estímulo de LPS por 30min. La incubación se realizó a 37°C y 5% de CO₂. Recuperar el botón celular en tubos eppendorf. Después resuspender el botón celular en 1mL de PBS1x frío para lavar las células y centrifugar a 1,500 rpm por 5min a 4°C y decantar el sobrenadante. Congelar el botón celular en baño de EtOH-hielo seco por 3min⁴⁰ y posteriormente resuspender en 30uL de solución hipotónica. Checar si logró la ruptura de la membrana citoplasmática al observar la integridad de los núcleos por su observación al microscopio con azul de tripano. Centrifugar a 3,500 rpm por 10min a 4°C y recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo ya que este corresponde a la fracción citoplasmática. Agregar 100uL de solución baja en sales al botón nuclear y mezclar suavemente por 30min a 4°C. Centrifugar a 14,000 rpm por 20min a 4°C. Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo, este corresponde a las proteínas nucleares. Diluir con 20uL de solución alta en sales.⁴¹ Almacenar ambas fracciones a -20°C para su análisis posterior.

7.4.2 ELECTROFORESIS DE FRACCIONES PROTEICAS

Ya obtenidas las fracciones proteicas de los distintos tratamientos se realizará el Western Blot para observar si hay diferencias en la presencia de NFκB subunidad p65. Primeramente tomar 15uL de la solución de las fracciones

proteicas y tratar con 15uL de Laemmli 2x con agitación y calentamiento. Posteriormente en geles de poliacrilamida al 10%, cargar los 30uL de las muestras en los carriles, así como 5uL del marcador de proteínas en el primer carril. Realizar la electroforesis dejando correr por 2hrs a 100V.

Posteriormente realizar una transferencia semihúmeda, utilizando membranas de PVDF, por 1hr a 10V. Después bloquear la membrana con leche sin grasa al 7% en TBS-T, por 1hr a TA. Realizar 2 lavados (15min, 25mL TBS-T en agitación a TA), y dejar en incubación con el anticuerpo primario α -p65, dilución 1:1000 en TBS-T, ON a 4°C. Al otro día realizar 2 lavados e incubar con el anticuerpo secundario dilución 1:10,000 en TBS-T por 1hr a TA en agitación. Realizar 2 lavados y revelar en placas fotográficas.

Posterior al revelado, se realizó un stripping de los anticuerpos, colocando las membranas con 30mL del amortiguador para stripping por 30min en agitación a TA. Después se repiten los pasos a partir del bloqueo de la membrana, utilizando los anticuerpos para control de α -Actina o α - α Tubulina, ambos dilución 1:1000 por 1hr.

Ya obtenidos los resultados, las placas fueron escaneadas y analizadas por densitometría con el programa de MacBiophotonics ImageJ.

7.5 CITOMETRÍA DE FLUJO PARA TINCIÓN INTRACELULAR DE PERK Y P38

Para analizar la activación de las MAPK se estudió las diferencias en la fosforilación de dos de las vías que la componen, ERK1/2 y p38. En primer lugar se colocó un millón de PBMC, a una densidad de 1×10^6 células/mL, por tratamiento en una placa de 24 pozos. Posteriormente se realizaron los distintos tratamientos: LPS 5ug/mL, CDIP-2 10 ó 100ug/mL y ambos, tratando con CDIP-2 por 45 minutos y después se estimularon con LPS por 30 minutos; terminando el estímulo se fijaron con PFA por 10min a TA a una concentración final de 1.5% para después realizar la tinción intracelular.

Se recupero el botón celular y se resuspendió con agitación vigorosa en vortex después de añadir 500uL de MetOH absoluto frío para su permeabilización, se incubaron por lo menos 10min a 4°C o se almacenaron a -20°C.⁴² A continuación se lavaron las células dos veces en buffer de FACS (PBS-SFB 2%), posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios ya sea α-pERK ó α-pP38 a una dilución 1:100 en PBS por 30min a TA, se lavaron 2 veces y después se incubaron en oscuridad por 30min a TA con el anticuerpo secundario FITC dilución 1:200 en PBS. Se realizaron 2 lavados y resuspendieron en buffer de FACS. Posteriormente se analizaron las células con los distintos tratamientos en el citómetro ATTUNE de Applied Biosystems. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa FlowJo y obteniendo la media de fluorescencia se analizó el aumento relativo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Aumento relativo} = \left(\frac{MF_{\text{experimento}} - MF_{\text{control secundario}}}{MF_{\text{basal}} - MF_{\text{control secundario}}} \right)$$

7.6 WESTERN BLOT DE LISADO COMPLETO DE PBMC PARA EL ANÁLISIS DE PERK Y P38

ERK1/2 y p38 son parte de la vía de las MAPK, su fosforilación nos indica su activación, por medio de un Western Blot se analizará si el tratamiento con CDIP-2 afecta esta activación en distintos periodos temporales de estimulación con LPS. Para ello se utilizó una placa de 24 pozos, en la que se colocaron las PBMC, a una densidad de 1×10^6 células/mL, con 1 millón de células por ensayo. Los ensayos fueron: sin estímulo, LPS 5ug/mL por 5, 15 y 30min, CDIP-2 10ug/mL, y la combinación de ambos estímulos. Se realizó un pretratamiento a los ensayos con CDIP-2 de 45min, pasado este tiempo se añadió el estímulo de LPS por 5, 15 o 30min. La incubación se realizó a 37°C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo se recuperó el botón celular en tubos eppendorf y se trató cada muestra con 100uL de Laemmli1x con agitación y calentamiento.

Posteriormente en geles de poliacrilamida al 10%, se cargaron 20uL de las muestras en los carriles, así como 5uL del marcador de proteínas en el primer

carril. Se realizó la electroforesis dejando correr por 2hrs a 100V. Posteriormente se realizó una transferencia semihúmeda, utilizando membranas de PVDF, por 1hr a 10V.

Después se bloqueó la membrana con leche sin grasa al 7% en TBS-T, por 1hr a TA. Realizar 2 lavados (15min, 25mL TBS-T en agitación a TA), y dejar en incubación con el anticuerpo primario α -pERK o α -pP38, ambos a una dilución 1:1000 en TBS-T, ON a 4°C. Al otro día realizar 2 lavados e incubar con el anticuerpo secundario dilución 1:10,000 en TBS-T por 1hr a TA en agitación. Realizar 2 lavados y revelar en placas fotográficas.

Posterior al revelado, se realizó un stripping de los anticuerpos, colocando las membranas con 30mL del amortiguador para stripping por 30min en agitación a TA. Después se repiten los pasos a partir del bloqueo de la membrana, utilizando el anticuerpos de control de carga α -Actina dilución 1:1000.

Ya obtenidos los resultados, las placas fueron escaneadas y analizadas por densitometría con el programa de MacBiophotonics ImageJ.

7.7 CITOMETRÍA DE FLUJO TINCIÓN EXTRACELULAR PARA TLR4

La expresión en membrana de TLR4 es importante para la activación por LPS, por lo que se analizará su presencia por medio de citometría de flujo. Primero se realizó el tratamiento colocando 5×10^5 células por tratamiento en placas de 24 pozos a una densidad de 1×10^6 células/mL. Se trataron las células con 10 o 100ug/mL de CDIP-2 por 45 minutos, después de este tiempo se añadió un estímulo de LPS de 100ng/mL o 1ug/mL y se incubó 30min a 37°C 5% CO₂. Al finalizar la incubación se recuperaron las células en tubos Eppendorf de 1.5mL para continuar con la tinción.⁴³

Se resuspendieron las células en 500uL de buffer de FACS y se incubaron 20min en hielo para su bloqueo. Después se centrifugaron y a continuación se resuspendieron con el anticuerpo primario α -TLR4 dilución 1:50 en PBS y se

incubaron por 30min en hielo. Se lavaron dos veces las células con buffer de FACS y resuspendieron en el anticuerpo secundario estreptavidina APC dilución 1:300 en PBS, incubando por 20min en hielo cubiertos de la luz. Pasado este tiempo se lavaron dos veces y finalmente se resuspendieron en buffer de FACS con PFA a una concentración final de 2%. Se analizaron las muestras en el citómetro FACS Calibur^{BD}® y posteriormente con el programa FlowJo obteniendo la media de fluorescencia y analizando el porcentaje de expresión mediante la siguiente ecuación:

$$\%Expresión = \left(\frac{MF_{experimento} - MF_{control\ secundario}}{MF_{basal} - MF_{control\ secundario}} \right) \times 100$$

7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados por medio de un análisis de ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey con el programa GraphPad5.0 de Prisma.

8 RESULTADOS

8.1 CDIP-2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE TNF-ALFA SIGNIFICATIVAMENTE TRAS EL ESTIMULO CON LPS.

Se determinó el efecto de CDIP-2 sobre la expresión de citocinas participes en la inflamación, después de un estímulo con LPS, mediante citometría de flujo con un ensayo de perlas de citocina. Se utilizaron PBMCs estimuladas por 18hrs con 5ug/mL LPS, previo tratamiento por 45min con CDIP-2, se recuperó el sobrenadante y analizó la concentración de citocinas. El experimento se realizó por duplicado con 3 sujetos, encontrando que los niveles de concentración presentados en cada uno fueron muy variables, pero con el mismo comportamiento en los tratamientos entre los 3 sujetos. Debido a esto se presentan como representativos los resultados de uno de los sujetos. Los resultados se muestran en la Figura 8.1

Se encontró que, el estímulo con LPS aumenta la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 en relación al basal, siendo mayor para TNF- α e IL-1. El péptido por sí sólo no ocasiona un aumento importante de ninguna de las citocinas comparado con el basal.

Tras el tratamiento con CDIP-2 y LPS, hay una disminución de aproximadamente el 50% en la concentración de TNF- α , observando en este modelo el efecto antes visto de CDIP-2; así como la disminución en la concentración de IL-8 e IL-1 de aproximadamente un 50% en los tratamientos con 100ug/mL de CDIP-2 y un aumento importante en la expresión de IL-10.

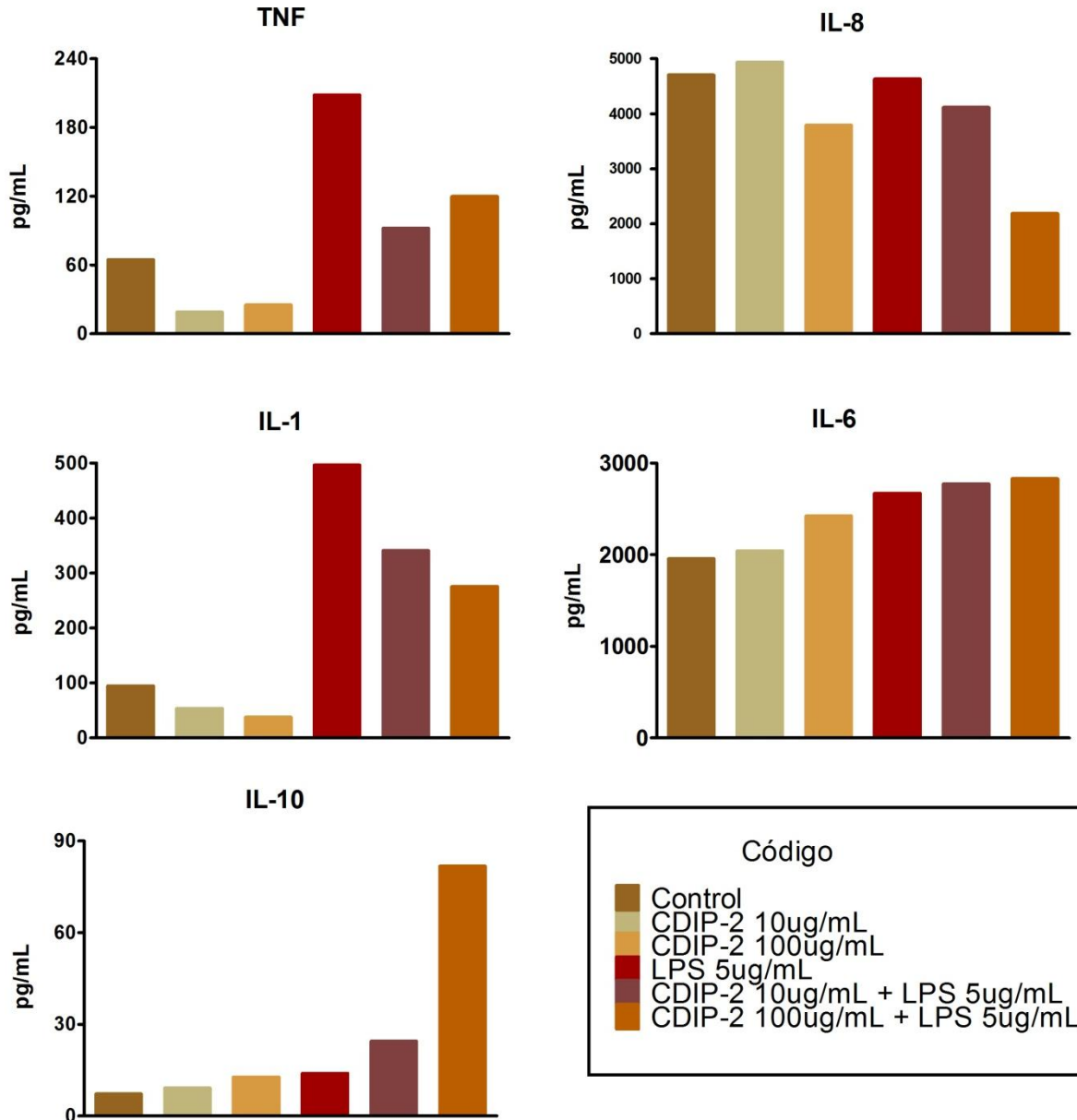


Figura8.1 CDIP-2 disminuye los niveles de TNF- α e IL-1 tras el estímulo con LPS. PBMC fueron estimuladas con LPS 5ug/ml por 18 hr con o sin un pretratamiento con el péptido CDIP-2, se analizó en el sobrenadante la concentración de citocinas participes de la inflamación. Se muestran los resultados representativos de uno de los sujetos analizados. (n=3)

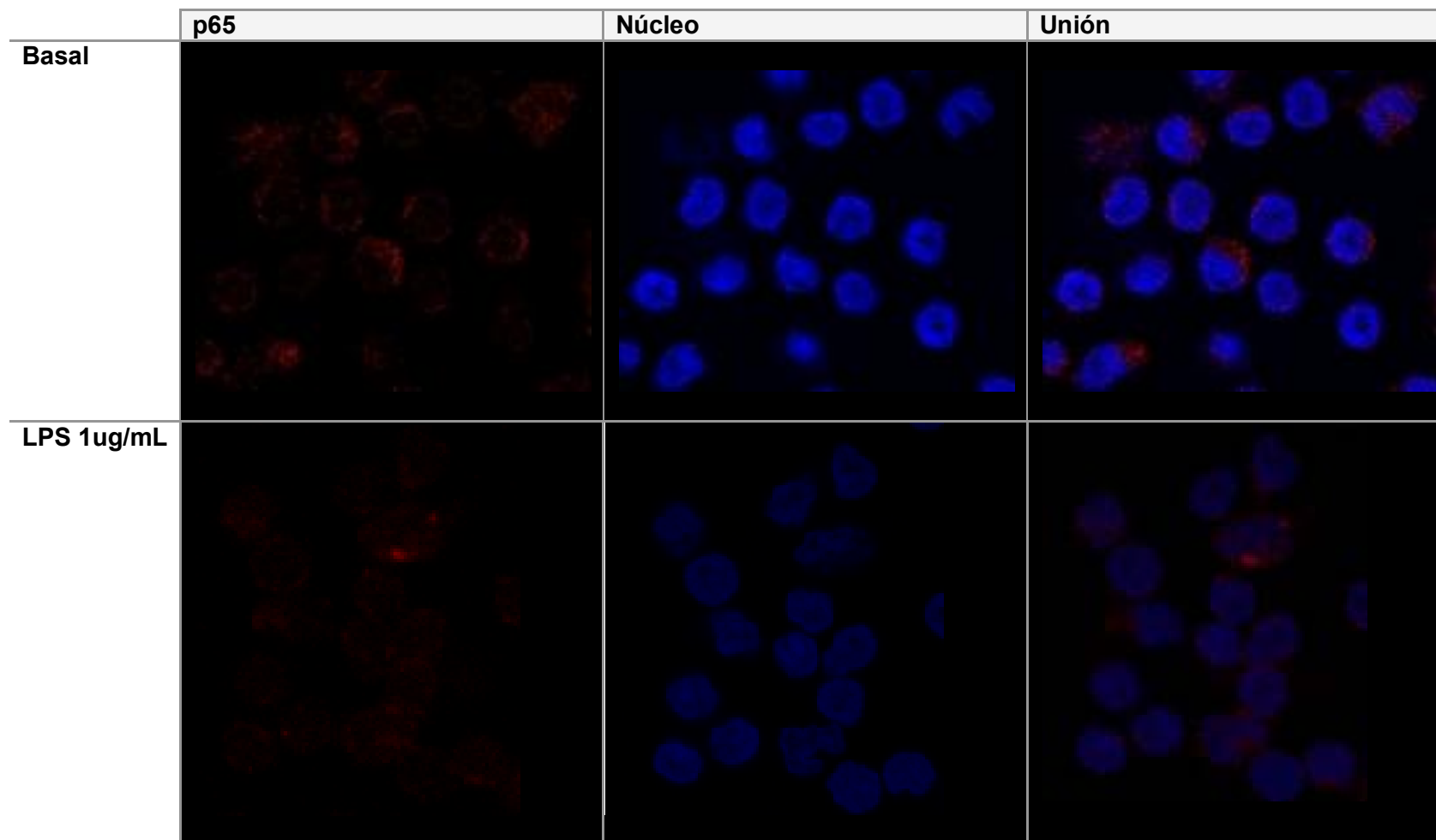
8.2 CDIP-2 NO MODIFICA LA TRANSLOCACIÓN DE LA SUBUNIDAD P65 DE NFkB AL NÚCLEO INDUCIDA POR LPS

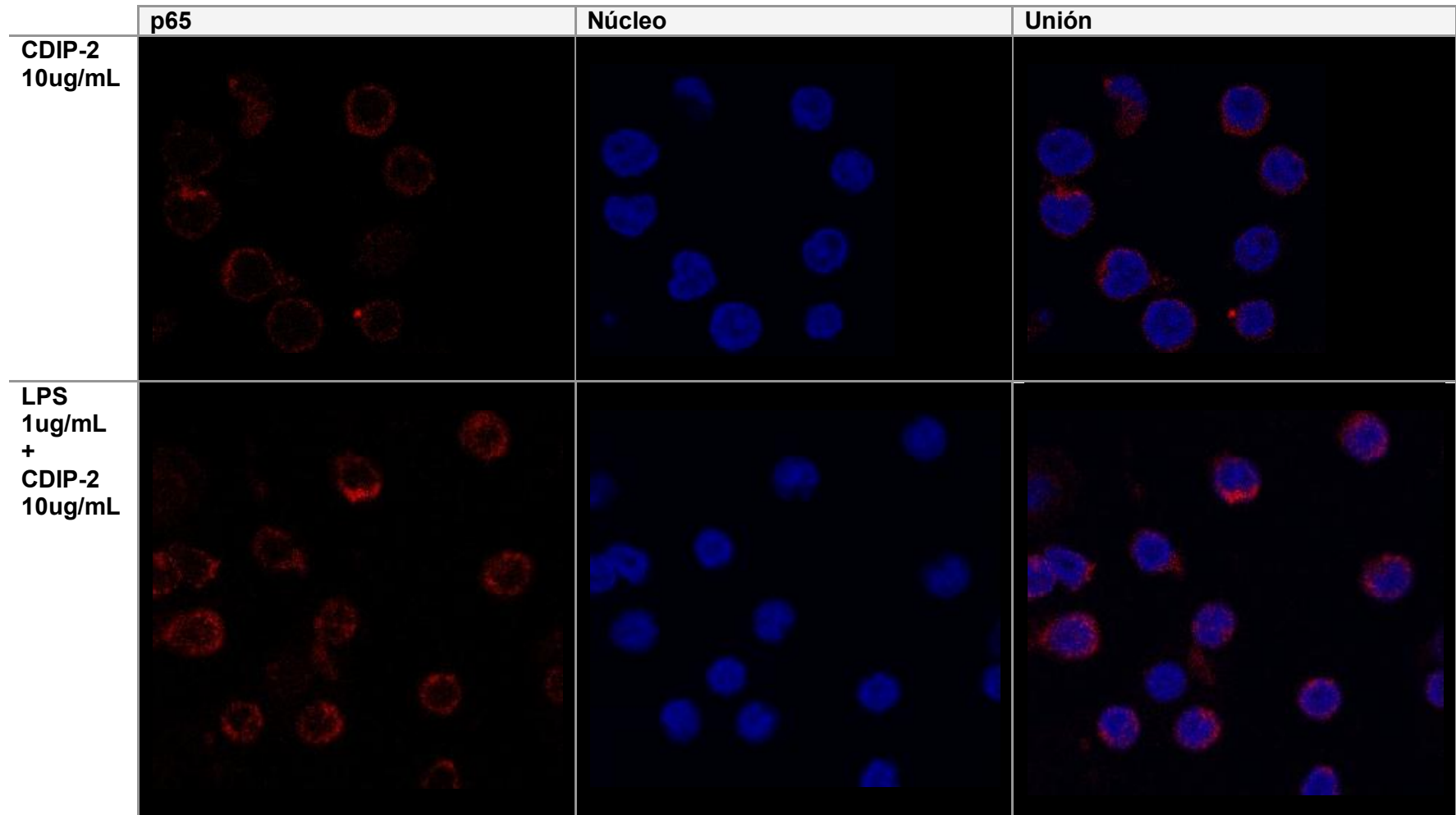
Se analizó el efecto de CDIP-2 sobre la activación de la vía de NFkB, observando si había cambios en la translocación al núcleo de la subunidad p65 inducido por LPS.

Primero se realizó un análisis cualitativo por microscopia confocal, en este las PBMC fueron tratadas con CDIP-2 por 45min a una concentración de 10ug/mL y posteriormente con 1ug/mL de LPS por 30 minutos, antes de ser fijadas y teñidas. La subunidad p65 se marcó con el flurocromo Alexa555 (rojo) y el núcleo se localizó al teñirlo con DAPI (azul).

Tanto en el ensayo tratado únicamente con CDIP-2 como en el no tratado (basal), se observa que la señal de la subunidad p65 se encuentra principalmente en el citosol; mientras que con la estimulación con LPS se observa que se induce la translocación, ya que la señal de p65 se observa uniforme en el citosol y el núcleo. Pareciera que hay una diferencia con el pretratamiento con CDIP-2, ya que la señal de p65 en el núcleo se observa disminuida en comparación a la observada sólo con LPS, pero con este ensayo cualitativo la diferencia no parece ser considerable. (Tabla 9)

Tabla 9. Análisis por microscopia confocal de la traslocación de la subunidad p65 de NFkB. Imágenes representativas de los distintos tratamientos. La subunidad p65 se encuentra marcado con el fluorocromo Alexa555 y el núcleo con el colorante DAPI.





Posteriormente para el análisis del efecto de CDIP-2 sobre la activación de la vía de NFkB, se realizó un análisis cuantitativo por densitometría con un Western Blot, al estudiar la subunidad p65 con los distintos tratamientos (Basal, CDIP-2 10 y 100ug/ml, LPS 1ug/ml y LPS+CDIP-2), en la fracción nuclear y citoplasmática de las células.

En el corrimiento de las proteínas en los geles se observó una diferencia cualitativa entre las proteínas encontradas en los tres diferentes extractos proteicos: lisado total, fracción nuclear y fracción citoplasmática; se muestra en la Figura 8.2 A el gel después de la transferencia.

En los resultados del Blot (Figura 8.2 B), se utilizó α -Tubulina como control negativo de la fracción nuclear para tener un control que verificará que no hubiese una contaminación por parte de la fracción citoplasmática. Usando para esta fracción β -actina como control de carga.

Se observó un ligero aumento en la expresión relativa de la subunidad p65 después del tratamiento con LPS, LPS+CDIP-2 y CDIP-2 100ug/ml, en la fracción nuclear (Figura 8.2 C), tras comparar y normalizar los resultados obtenidos contra los resultados basales. Pero no se obtuvieron diferencias significativas con ninguno de los tratamientos con lo que notamos que CDIP-2 no modifica la translocación de la subunidad p65 al núcleo inducido por LPS.

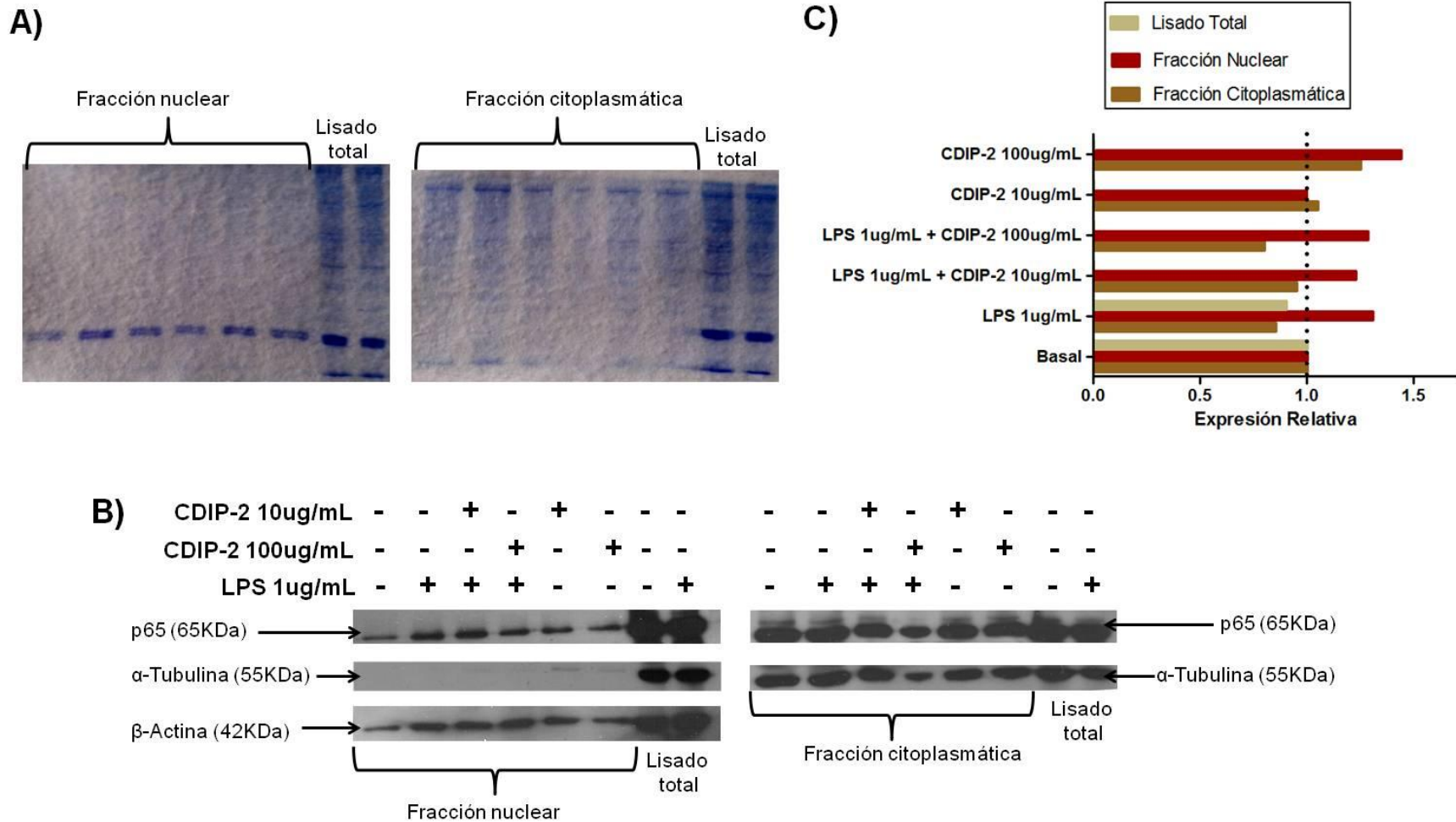


Figura 8.2 Análisis por Western Blot de la subunidad p65 en las fracciones citoplasmática y nuclear. Se trataron PBMC con LPS 1ug/mL por 30min, con o sin un pretratamiento por 45min con CDIP-2, se separaron las fracciones protéicas: nuclear y citoplasmática y se analizaron por electroforesis. A) Imagen del corrimiento de las proteínas en el gel tras la transferencia. B) Blot de la subunidad p65, α-tubulina y β-actina, con los diferentes estímulos. C) Expresión relativa de la subunidad p65 en base al resultado basal tras la cuantificación densitométrica. No se tienen diferencias significativas (n=2)

8.3 EL TRATAMIENTO CON CDIP-2 DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 DESPUÉS DEL ESTIMULO CON LPS

Se estudió el efecto de CDIP-2 sobre la activación de las vías ERK1/2 y p38 de las MAPK. Primero se realizó un ensayo de citometría de flujo con una tinción intracelular de la forma fosforilada de las proteínas p38 y ERK1/2. PBMC fueron estimuladas con 5ug/mL LPS por 30 minutos con o sin un pretratamiento de 45 minutos con CDIP-2. Fueron fijadas y teñidas, y se analizó en el citómetro la población de monocitos de acuerdo a su tamaño y granularidad. En la Figura 8.3 se muestran los resultados obtenidos, normalizados con respecto al basal. En los resultados de ERK1/2 se observa un aumento en la fosforilación tras el estímulo con LPS, que disminuye significativamente con el tratamiento de CDIP-2 a ambas concentraciones (10 y 100ug/mL), el cual sólo causa un ligero aumento no significativo. Para p38 se tiene un aumento significativo en la fosforilación con LPS, y no se presentan cambios significativos con el tratamiento con CDIP-2.

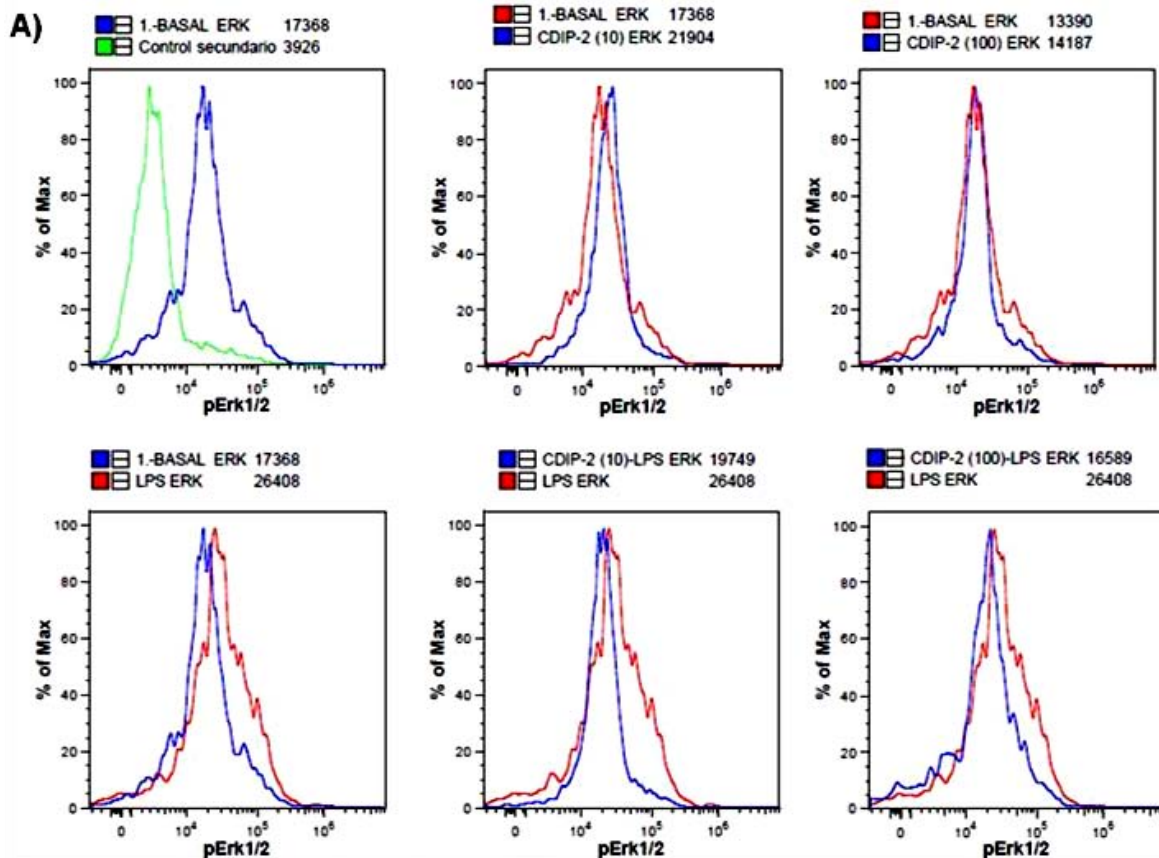


Figura 8.3 Análisis por citometría de flujo de la fosforilación de las MAPK ERK1/2 y p38. PBMC fueron tratadas con CDIP-2 10 y 100ug/mL y posteriormente estimuladas con 5ug/mL de LPS 30min, con una tinción de FACS intracelular se analizó la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y p38 tras los estímulos. A) Histogramas representativos del efecto de LPS y CDIP-2 sobre la fosforilación de ERK1/2.

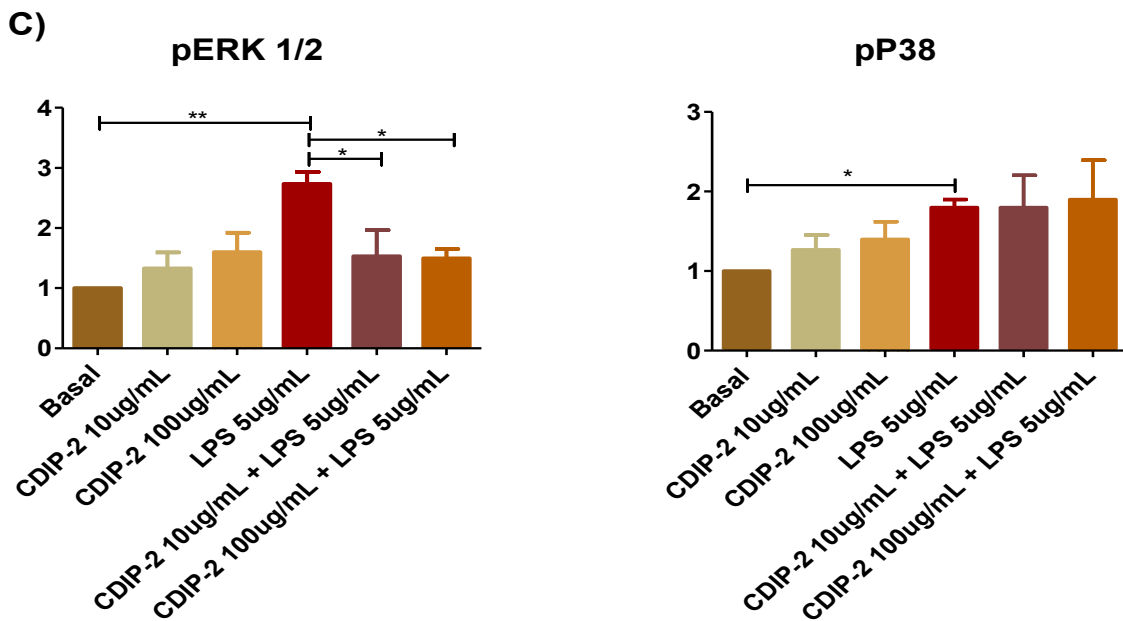
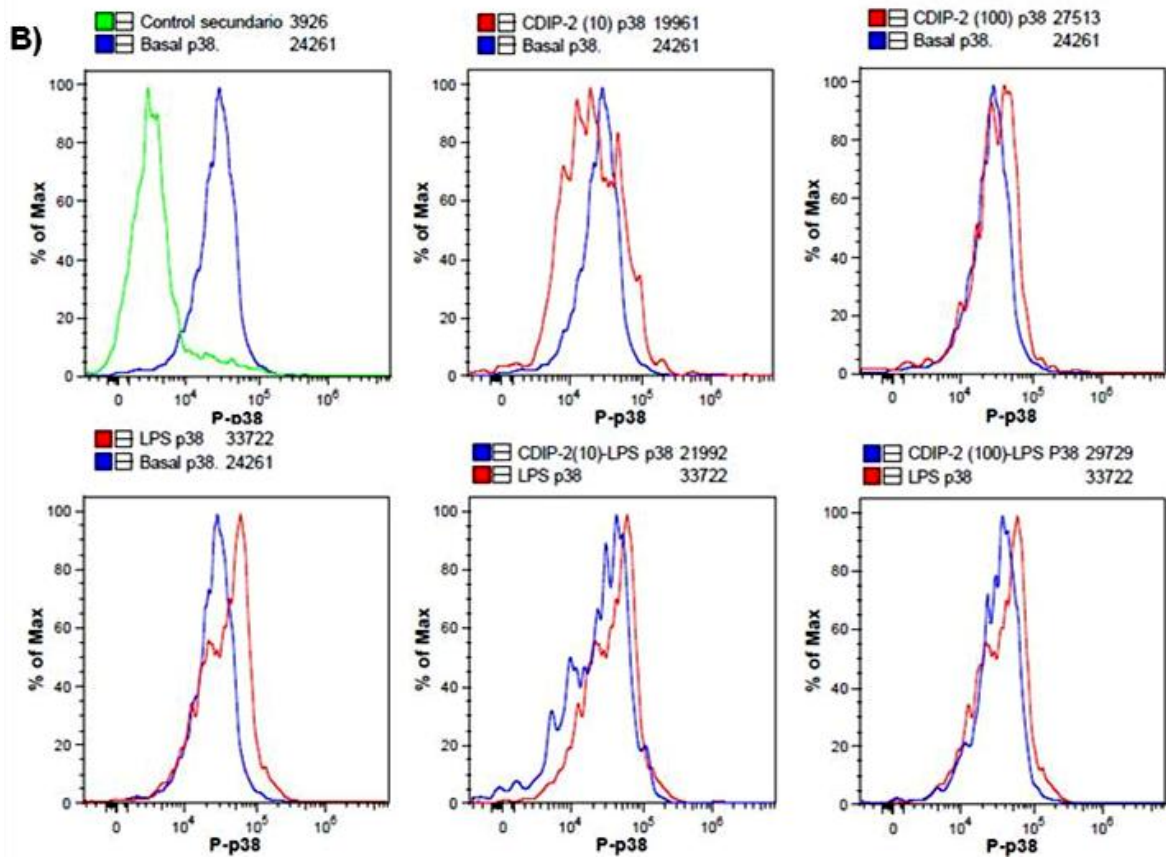


Figura 8.3 Análisis por citometría de flujo de la fosforilación de las MAPK ERK1/2 y p38.
 B) Histogramas representativos del efecto de LPS y CDIP-2 sobre la fosforilación de p38.
 C) Análisis del aumento relativo con respecto al basal en la intensidad de fluorescencia de los distintos tratamientos. (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) ($n = 3$)

Posteriormente para el estudio del efecto de CDIP-2 sobre la activación de las vías ERK1/2 y p38, se hizo un análisis por Western Blot (Figura 8.4). En este se realizó el estímulo con LPS 5ug/mL a diferentes tiempos (5,15 y 30min), con pretratamiento de CDIP-2 a 10ug/mL por 45min. Este método nos permite analizar individualmente ERK1 y ERK2. Se obtuvo como resultado que ERK2 disminuye su fosforilación después del tratamiento con CDIP-2 en los tres tiempos, pero en ningún caso es significativa. En p38 observamos un aumento no significativo de la activación en todos los tiempos tras el estímulo con LPS y con CDIP-2 en conjunto.

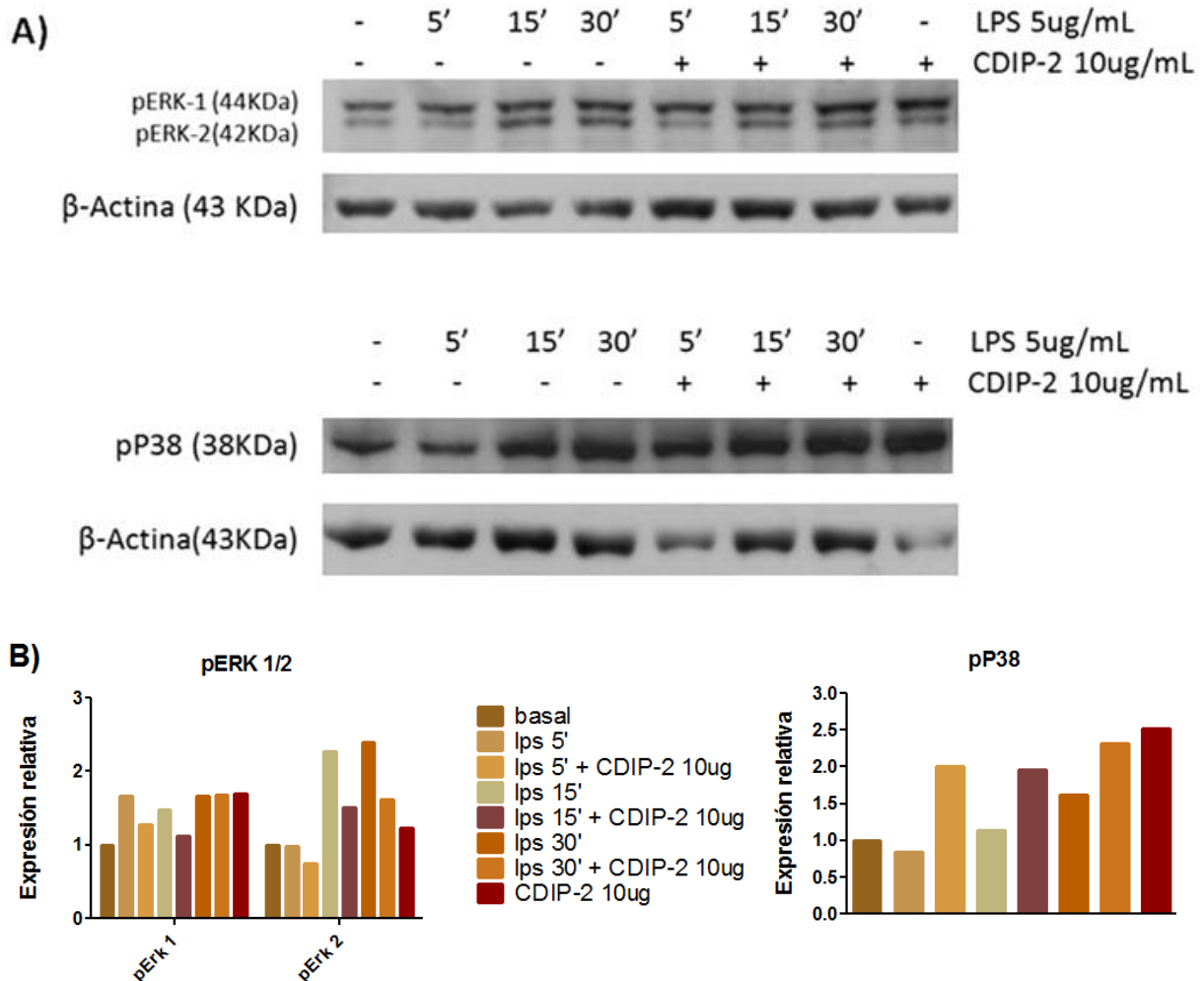


Figura 8.4 Análisis de la fosforilación de ERK1/2 y p38 por Western Blot. PBMC pretratadas con CDIP-2 10ug/mL fueron estimuladas a distintos tiempos con LPS 5ug/mL, se obtuvo el lisado completo y se analizaron por electroforesis. A) Blot de pERK1/2, pp38 y β-actina de los diferentes tratamientos. B) Expresión relativa de las proteínas fosforiladas en base al resultado basal tras la cuantificación densitométrica. No se tienen diferencias significativas (n=3)

8.4 CDIP-2 DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE TLR4 DESPUÉS DEL ESTÍMULO CON LPS

Se estudió el efecto de CDIP-2 en la expresión en membrana de TLR4, ya que la endocitosis del receptor es un paso crítico para la activación de la vía independiente a MyD88. PBMC fueron estimuladas con 100ng/mL o 1ug/mL de LPS por 30min previo tratamiento por 45min con CDIP-2. Con una tinción extracelular para FACS de TLR4 se comparó la intensidad de fluorescencia de los tratamientos con el basal (Figura8.5).

En los resultados se obtuvo una disminución significativa de la expresión en membrana de TLR4 con el tratamiento de CDIP-2 a 10ug/mL tras los estímulos con LPS comparado con la expresión basal.

Esta disminución significativa también se observa entre los tratamientos con la estimulación de LPS a 100ng/mL, teniendo una disminución para el tratamiento con CDIP-2 10ug/mL en comparación al estímulo de LPS sólo y la concentración de CDIP-2 de 100ug/mL. Y por último también se da una diferencia entre las concentraciones utilizadas de LPS, siendo significativamente menor la estimulación con 1ug/mL de LPS a la de 100ng/mL.

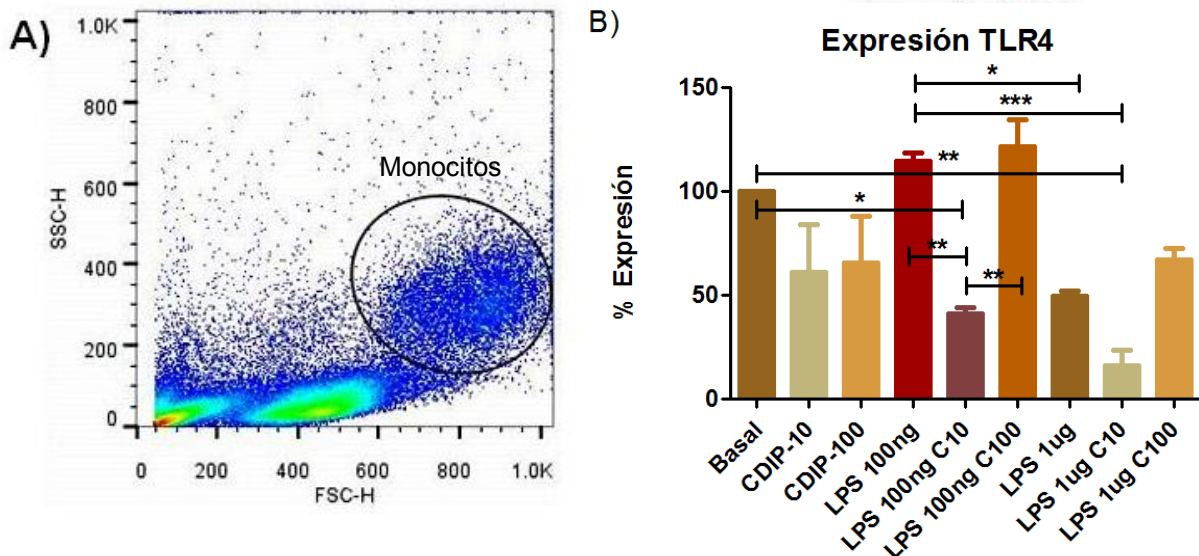


Figura 8.5 Análisis del efecto del péptido CDIP-2 en la expresión en membrana de TLR4 tras el estímulo con LPS. PBMC fueron tratadas con CDIP-2 a concentración de 10 o 100 ug/mL y estimuladas con 100ng/mL o 1ug/mL de LPS, se tiñeron extracelularmente para su análisis por FACS. A) Imagen representativa de la población celular de monocitos analizada B) Análisis de la expresión del receptor TLR4 respecto al basal en base a la intensidad de fluorescencia. (n=3)

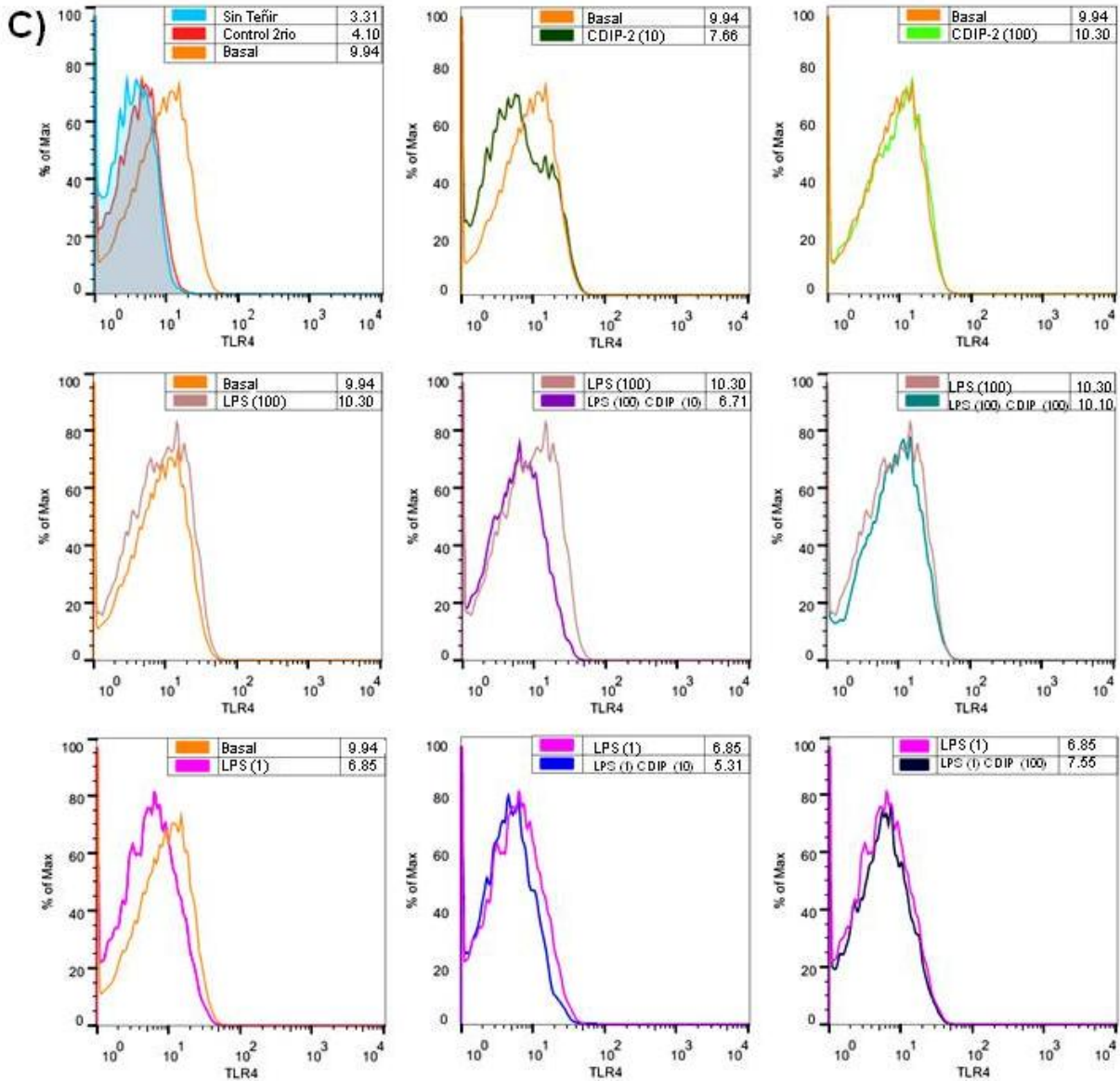


Figura 8.5 Análisis del efecto del péptido CDIP-2 en la expresión en membrana de TLR4 tras el estímulo con LPS. C) Histogramas representativos del efecto de CDIP-2 y LPS sobre la expresión en membrana de TLR4. (n=3)

9 DISCUSIÓN

Las quimiocinas juegan un rol importante en el control de infecciones, ya que intervienen en la respuesta inflamatoria, pero su sobreexpresión recluta células a los tejidos causando un infiltrado inflamatorio que resulta en daño al tejido.³⁶ Con el aumento en la incidencia de enfermedades inflamatorias como aterosclerosis, artritis, asma y obesidad; se ha comenzado a tomar como blanco terapéutico las quimiocinas y sus receptores, mediante el desarrollo de herramientas que modulen su actividad.

En trabajos anteriores se desarrolló una herramienta alternativa, la síntesis de péptidos derivados de quimiocina como la CCL13. Uno de ellos es CDIP-2, que presenta actividad parcial antagonista en modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamación.³¹ Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual CDIP-2 ejerce esta modulación por lo que en este trabajo se busca estudiar por medio de un modelo *in vitro* de PMBC, estimuladas con LPS, el efecto del péptido CDIP-2 en dos de las principales vías de la respuesta inflamatoria (MAPK y NFκB).

Primero se analizó el efecto del péptido CDIP-2 sobre la expresión de citocinas participantes en la respuesta inflamatoria, analizando las citocinas en sobrenadante después del un estímulo con LPS de 18 hrs en PBMC (Figura 8.1). Se obtuvieron resultados significativos del efecto de CDIP-2 con TNF α , encontrando que CDIP-2 no estimula por si sólo la expresión de TNF α y lo disminuye significativamente tras el estímulo con LPS.

La disminución de TNF- α e IL-1, no sólo confirma una modulación en la respuesta inflamatoria, ya que estas citocinas entre sus funciones se encargan de activar otras células y amplificar la respuesta inflamatoria¹; sino que también replica los resultados obtenidos anteriormente, lo que nos indica que el péptido funciona en este sistema.

La disminución de TNF- α e IL-1 se puede dar por la modulación de las vías de señalización de TLR4, ya que en estudios de sustancias antiinflamatorias con este estímulo se ha encontrado por ejemplo que la disminución de la citocinas se da ya

sea por una modulación de NFκB,⁴⁴ por modulación de las MAPK (JNK, p38 y ERK) sin afectar NFκB,⁴⁵ o afectando IKK y ERK. ⁴⁶ Lo que nos indica que la regulación de estas citocinas, dependen más que de una vía de señalización, de la forma en la que actúa el estímulo inhibitorio.

También cabe mencionar que los resultados en IL-8 e IL-10 tienen una tendencia interesante. En IL-8 se tiene una disminución en la expresión con el tratamiento de LPS con CDIP-2, pero ya que no hay una diferencia entre el valor basal y con LPS no podemos decir si CDIP-2 disminuye la expresión ya que el tratamiento con LPS no aumentó la expresión de IL-8 como se esperaría ya que se ha reportado que los valores de IL-8 en células sin estimular se puede encontrar entre 4,000 y 15,000pg/mL mientras que con LPS es de entre 30,000 a 70,000 pg/mL.⁴⁷

En IL-10 se observa un aumento en su expresión tras el tratamiento con CDIP-2 a 100ug/mL junto con LPS. A pesar de que este aumento no es tan significativo en los otros sujetos es un resultado a considerar, ya que está bien establecido que IL-10 controla los procesos inflamatorios al suprimir la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión, así como moléculas coestimuladoras en monocitos, neutrófilos y linfocitos T. ⁴⁸ Por lo que su aumento podría intervenir en la regulación de la inflamación.

Después de este ensayo, para comenzar a estudiar el posible mecanismo por el cual CDIP-2 tiene su efecto, se analizó la translocación de la subunidad p65 de NFκB al núcleo, ya que NFκB es un importante factor de transcripción en la expresión de genes de citocina durante la inflamación.

Primero se observó cualitativamente, mediante microscopia confocal, si el péptido modificaba la translocación de p65 (Tabla8), se distingue un aumento en el núcleo de p65 tras el estímulo con LPS el cual parece estar disminuido junto con el tratamiento de CDIP-2, el cual por sí sólo no muestra una diferencia con el basal. Para saber si estos cambios son cuantitativos a continuación se realizó un Western Blot de fracciones proteicas (Figura 8.2), que tras el análisis disimétrico no mostró diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.

En este caso se esperaría observar una diferencia en la estimulación con LPS, ya que este activa la vía de NFκB. Aunque se han encontrado resultados en donde LPS indujo la translocación de p50 al núcleo, pero no de p65,⁴⁰⁴⁸ es posible que este resultado se deba más bien a una falta de tiempo de estimulación con LPS, ya que otros ensayos en PBMC han reportado una translocación máxima a los 60min,^{49 50} por lo que no se puede concluir si CDIP-2 afecta la vía de NFκB sin realizar otros análisis.

Posteriormente se estudió el efecto de CDIP-2 sobre la vía de MAPK, estudiando 2 de sus componentes p38 y ERK1/2. Esto se realizó al analizar la diferencia de proteína fosforilada, es decir activada, con los distintos estímulos.

Mediante un análisis de citometría de flujo intracelular (Figura 8.3), se observó un aumento significativo de la fosforilación para ambas MAPK tras el estímulo con LPS, pero sólo se observó una disminución significativa para ERK1/2. Esto se puede deber a que se han encontrado distintas proteínas en la señalización por TLR4 que activan cada MAPK, por ejemplo TAK1 es importante en la activación de p38,⁷ mientras que la activación de ERK requiere de la MAP3K, TPL2.⁵¹

Además la disminución de la activación de ERK por CDIP-2 tras el estímulo con LPS se puede relacionar con la disminución en la expresión de TNFα, debido a que inhibidores de la cinasa de ERK, MKK1 y 2, disminuyen la inducción de TNFα en monocitos humanos.⁹

También se analizó el efecto sobre estas MAPK a distintos tiempos de estimulación con LPS por Western Blot; a pesar que en este caso no se obtuvieron diferencias significativas en la estimulación con LPS o por el tratamiento con CDIP-2, podemos observar que hay una mayor disminución en la fosforilación de ERK2 que de ERK1. Debido a esto puede ser que en este ensayo no observemos una diferencia significativa, ya que por citometría de flujo no podemos distinguir entre las dos proteínas, por lo que estamos observando un resultado aditivo.

Por último se analizó el efecto de CDIP-2 en la expresión en membrana de TLR4, ya que se sabe que después de la activación de la vía dependiente a MyD88, el

complejo TLR4-MD2-LPS es internalizado e inicia una vía de señalización secundaria, que promueve entre otros la expresión de IFN tipo I.^{11 52}

En los resultados se observa una disminución significativa de la expresión en membrana de TLR4 con el tratamiento de CDIP-2 a 10ug/mL tras los estímulos con LPS comparado con la expresión basal. Además de una diferencia entre el tratamiento con CDIP-2 a 10ug/mL en comparación a la concentración de CDIP-2 de 100ug/mL, tras el estímulo con LPS, habiendo disminución de la expresión a diferencia de LPS únicamente en la concentración menor, lo que se puede deber a una saturación en la concentración de 100ug/mL.

Estudios sugieren que la internalización de TLR4 tras la estimulación con LPS es regulada por endocitosis mediada por clatrina y dinamina,^{53 54} al igual que en los receptores de quimiocina.³⁵ Varios ejemplos de regulación por entrecruzamiento indirecto con otros receptores, han sido descritos, como la regulación cruzada de los receptores CCR1, 2 y 5 por TLR2 y TLR4.^{55 56} Se cree que esta comunicación puede ser bidireccional, por lo que, ya que en otros reportes se encontró que CDIP-2 induce de la internalización de los receptores CCR1, CCR2 y CCR3;³¹ podríamos suponer que la disminución de TLR4 se puede deber al efecto que CDIP-2 presenta sobre los receptores de quimiocina, ya que ambos se endocitan por el mismo mecanismo.

Finalmente aunque desconocemos los mecanismos exactos por los que actúa, con este trabajo se encontró que el péptido CDIP-2 disminuye la expresión de TNF α por la modulación de la activación de ERK y la expresión en membrana de TLR4, tras la estimulación con LPS. Lo que se resume en la Figura 9.1.

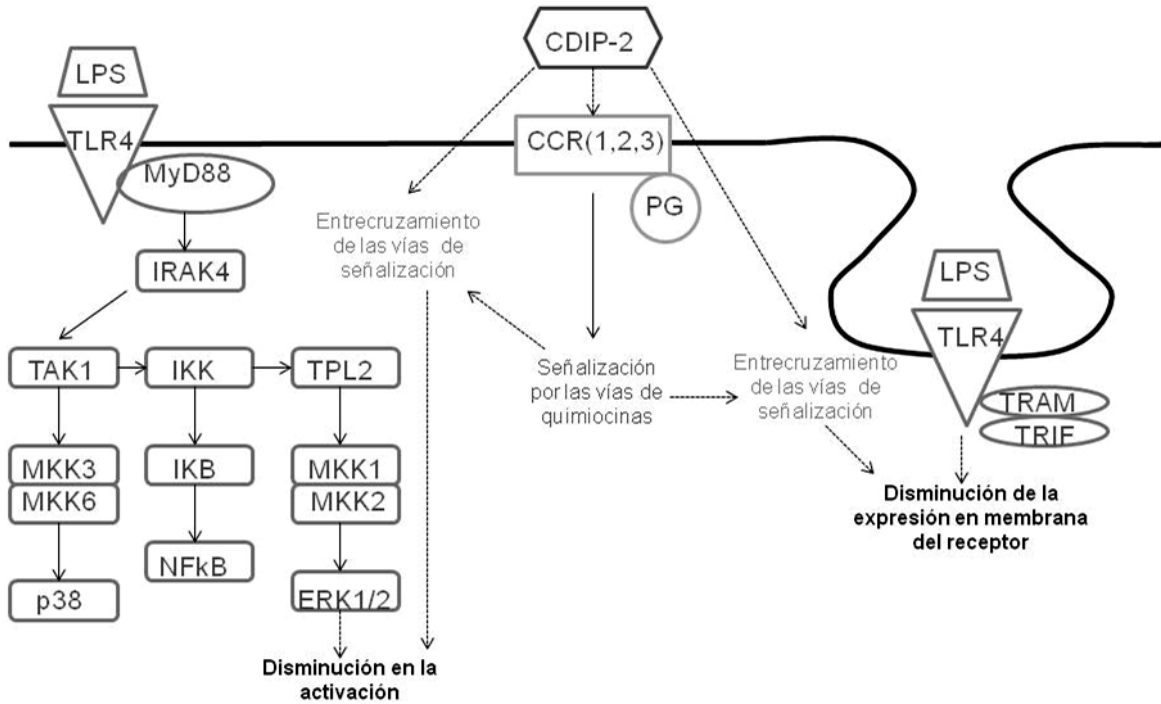


Figura 9.1. Modelo que muestra un posible mecanismo a través del cual CDIP-2 ejecuta su efecto antagonista modulando la vía de activación de ERK1/2 por LPS y la expresión en membrana del receptor TLR4, después de un estímulo con LPS. Lo que se puede dar por una modulación directa de las vías de TLR4 o por un entrecruzamiento de las vías de CCR y TLR.

10 CONCLUSIONES

1. CDIP-2 disminuye significativamente la expresión de TNF- α tras la estimulación con LPS.
2. CDIP-2 no aumenta la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF κ B.
3. CDIP-2 disminuye significativamente la fosforilación, es decir la activación, de ERK1/2 tras la estimulación con LPS.
4. ERK2 es menos activada tras el tratamiento con CDIP-2 y LPS.
5. CDIP-2 con una concentración de 10 μ g/mL, disminuye la expresión en membrana de TLR4, sólo y con la estimulación de LPS.

11 APÉNDICES

APÉNDICE I. SOLUCIONES

En todas las soluciones el agua utilizada fue bidestilada.

12.1.1 SOLUCIONES GENERALES

PBS10x (500mL)

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ 1.28g
- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4\text{-7H}_2\text{O}$ 11.24g
- NaCl 43.83g
- En H_2O
- pH 7.3

Diluir con agua para obtener la solución de trabajo PBS 1x

Medio de cultivo RPMI

Disolver el contenido del sobre en 960mL de agua con ayuda de un agitador magnético. Añadir:

- 1.5g NaHCO_3
- 10mL HEPES 10mM
- 10mL piruvato de sodio 100mM
- 10mL antibióticos
- 10mL de aa no esenciales
- 4uL β -mercaptoetanol

Filtrar

PFA 10%

- 10g Paraformaldehído
- En PBS 1x pH7.3

Amortiguador FACS (100mL)

- SFB 2mL
- En PBS 1x pH 7.3

Tritón 0.1% (50mL)

- Tritón 50mg
- En PBS 1x pH 7.3

12.1.2 SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS

Soluciones madre

- HEPES 1M pH 7.9
- MgCl₂ 1M
- KCl 3M
- EDTA 0.5M
- DTT 1M
- PMSF 200mM

Solución hipotónica

- 10mM HEPES
- 1.5mM MgCl₂
- 10mM KCl
- 0.2mM PMSF
- 0.5mM DTT
- En H₂O

Solución baja en sales

- 20mM HEPES
- 1.5mM MgCl₂
- 20mM KCl
- 0.2mM EDTA
- 25% Glicerol
- 0.2mM PMSF
- 0.5mM DTT
- En H₂O

Solución alta en sales

- 20mM HEPES
- 1.5mM MgCl₂
- 1.4M KCl
- 0.2mM EDTA
- 25% Glicerol
- 0.2mM PMSF
- 0.5mM DTT
- En H₂O

12.1.3 SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

Preparación de geles

Tabla 10. Preparación de gel para PAGE-SDS 10% (1gel)

Solución /Reactivo	Gel Separador	Gel concentrador
A	1.25 mL	250 uL
B	2.35 mL	/
C	62.5 uL	31.25 uL
D	/	1.075 mL
H₂O	1.925 mL	1.575 mL
TEMED*	1.6 uL	1.25 uL
PSA*	156 uL	250 uL
*Añadir al último		

- Solución A) Acrilamida- Bis acrilamida (100mL en H₂O)
 - ◆ 48.3g Acrilamida
 - ◆ 1.7g Bis acrilamida
 - ◆ Almacenar por 2 meses en una botella oscura a TA
- Solución B) TRIS-HCl 1.5M pH8.8 (en H₂O)
- Solución C) SDS 10% (en H₂O)
- Solución D) TRIS-HCl 1M pH6.8 (en H₂O)
- PSA) Persulfato de amonio (2mL en H₂O)
 - ◆ 100mg Persulfato de amonio

Laemmli 2x (50mL)

- SDS 4%
- Glicerol 20%
- β - Mercapto etanol 5mL
- Azul de bromofenol 2mg
- TRIS-HCl 0.985g pH6.8

Disolver TRIS-HCl en 25mL de agua y ajustar el pH, posteriormente agregar el SDS, glicerol, azul de bromofenol y por último β - Mercapto etanol, y llevar a 50mL. Almacenar en alícuotas a -20°C . Antes de utilizar agregar 20uL de ortovanadato 200mM y 20uL de β - Mercaptoetanol y dejar hervir. Diluir con la muestra o PBS para tener una concentración 1x.

Amortiguador de corrida 10x (500mL)

- TRIS-base 15.15g
- Glicina 72g
- SDS 5g
- En H_2O

Diluir con agua para obtener la solución de trabajo 1x

TBS 20x (500mL)

- TRIS base 12.11g
- NaCl 87.66g
- En H_2O
- pH 7.6

Amortiguador de transferencia (1L)

- TRIS-base 3g
- Glicina 14.4g
- En H_2O
- Agregar 20% de MetOH a la solución antes de utilizar

TBS-T 1x (1L)

- 50mL TBS20x
- 1mL Tween 20
- En H_2O

Amortiguador para stripping

- NaOH 0.2M
- En H_2O

APÉNDICE II. ANTICUERPOS

Anticuerpos primarios

α -Actina policlonal cabra IgG	Santa Cruz Biotechnology	
α -p65 policlonal conejo IgG	eBioscience	
α -pERK (Tyr 204) policlonal IgG conejo	Santa Cruz Biotechnology	
α -pP38 (Thr180/Tyr182) policlonal IgG conejo	Santa Cruz Biotechnology	
α -TLR4 humano biotina ratón	BD Pharmigen	551975
α - α Tubulina monoclonal IgG2a ratón	Gene Tex	628802

Anticuerpos secundarios

IgG conjugado Alexa 555	Préstamo	
Estreptavidina APC	Biologend	405207
IgG conjugado FITC cabra anti conejo	Jackson	
IgG conjugado HRP cabra anti conejo	Upstate	
IgG conjugado HRP conejo anti cabra	ZYMED	81-1620
IgG2a conjugado HRP conejo anti ratón	ZYMED	61-0220

APÉNDICE III. REACTIVOS

- ❖ Acrilamida
- ❖ Azul de bromofenol
- ❖ Azul de tripano
- ❖ Bis-acrilamida
- ❖ CDIP-2
- ❖ DAKO
- ❖ DAPI
- ❖ DTT
- ❖ EDTA
- ❖ Estándares de proteína (160-0305)
- ❖ Etanol 96%
- ❖ Etanol absoluto
- ❖ Fibronectina
- ❖ Glicerol
- ❖ Glicina
- ❖ HEPES
- ❖ Histopaque®-1077
- ❖ KCl
- ❖ Leche Svelty
- ❖ LPS *E. coli*
- ❖ Lumiglo 20x
- ❖ Metanol
- ❖ MgCl₂
- ❖ Na₂H₂PO₄-7H₂O
- ❖ NaCl
- ❖ NaH₂PO₄-H₂O
- ❖ NaOH
- ❖ Ortovanadato
- ❖ PFA
- ❖ PSA
- ❖ RPMI
- ❖ SDS
- ❖ SFB
- ❖ TEMED
- ❖ TRIS-base
- ❖ TRIS-HCl
- ❖ Tritón
- ❖ Tween 20
- ❖ β-Mercaptoetanol

APÉNDICE IV. ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Apc	Aloficocianina
APC	Célula Presentadora de Antígeno
C	Celsius
CBA	Ensayo de Perlas de Citocina
CDIP	Péptido inhibitorio derivado de quimiocina
CLR	Receptores Tipo Lectina-C
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilen diamino tetracético
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
EtOH	Etanol
FACS	Clasificación de células activada por fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido hidroxietil piperazinetanosulfónico
hr	Hora
HRP	Peroxidasa del rábano picante
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1RA	Antagonista del Receptor de IL-1
KCl	Cloruro de potasio
L	Litro
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MAPK	Proteincinasas activadas por mitógeno
MetOH	Metanol
MF	Media de Fluorescencia

MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Na ₂ H ₂ PO ₄ -7H ₂ O	Fosfato disódico hepta hidratado
NaCl	Cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	Fosfato monosódico hidratado
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NFκB	Factor Nuclear kappa B
ng	Nanogramo
NK	Asesinas Naturales
NLR	Receptores Tipo NOD
ON	Toda la noche
p	Fosfolirado
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMP	Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PFA	Paraformaldehído
PG	Prostaglandina
PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonilo
PRR	Receptor de Reconocimiento a Patrones
PSA	Persulfato de Sodio
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RLR	Receptores Tipo RIG
RPMI	Medio del "Roswell Park Memorial Institute"
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura Ambiente
TBS	Solución salina amortiguadora TRIS
TBS-T	Solución salina amortiguadora TRIS con Tween 20

TEMED	Tetrametiletilendiamina
Thr	Treonina
TLP2	Locus de Progresión de Tumor 2
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Tyr	Tirosina
ug	Microgramo
UV	Ultra Violeta
V	Volts

Este trabajo fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Murphy, K. *Janeway's immunobiology*. (Garland Publishing, 2011).
2. Janeway, C. a & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
3. Ezekowitz, A. B. & Hoffman, J. A. *Innate Immunity. Mol. Cell* **35**, (Humana Press, 2003).
4. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. (Saunders Elsevier, 2012).
5. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* **5**, 1–8 (2014).
6. Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N. & Martin, M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* **90**, 417–27 (2011).
7. Arthur, J. S. C. & Ley, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 679–92 (2013).
8. Jerala, R. Structural biology of the LPS recognition. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 353–63 (2007).
9. Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**, 85–94 (2001).
10. *The cytokine Handbook*. (Elsevier, 2003).
11. Avila, M. & Gonzalez-Espinosa, C. Signaling through Toll-like receptor 4 and mast cell-dependent innate immunity responses. *IUBMB Life* **63**, 873–80 (2011).
12. Doyle, S. L. & O'Neill, L. a J. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1102–13 (2006).
13. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001651 (2009).
14. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–62 (2008).

15. Ghosh, S. Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* **6**, 453–457 (2000).
16. Pimienta, G. & Pascual, J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* **6**, 2628–32 (2007).
17. Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta* **1754**, 253–62 (2005).
18. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–51 (2008).
19. Kagan, J. C. *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 361–8 (2008).
20. Martínez-Becerra, F. *et al.* Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-derived peptide (CDAP-4) on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 352–358 (2007).
21. Dinarello, C. a. Proinflammatory Cytokines. *CHEST J.* **118**, 503 (2000).
22. Mortier, A., Van Damme, J. & Proost, P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. *Immunol. Lett.* **145**, 2–9 (2012).
23. Viola, A. & Luster, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, 171–97 (2008).
24. Blanchet, X., Langer, M., Weber, C., Koenen, R. R. & von Hundelshausen, P. Touch of chemokines. *Front. Immunol.* **3**, 175 (2012).
25. Allen, S. J., Crown, S. E. & Handel, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 787–820 (2007).
26. Johnston, B. & Butcher, E. C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin. Immunol.* **14**, 83–92 (2002).
27. Townson, D. H. & Liptak, A. R. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 94 (2003).
28. Rot, A. & von Andrian, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 891–928 (2004).

29. Zlotnik, A. & Yoshie, O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36**, 705–716 (2012).
30. Bennett, L. D., Fox, J. M. & Signoret, N. Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology* **134**, 246–56 (2011).
31. Méndez-Enríquez, E. *et al.* A CCL chemokine-derived peptide (CDIP-2) exerts anti-inflammatory activity via CCR1, CCR2 and CCR3 chemokine receptors: Implications as a potential therapeutic treatment of asthma. *Int. Immunopharmacol.* **20**, 1–11 (2014).
32. White, G. E., Iqbal, A. J. & Greaves, D. R. CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol. Rev.* **65**, 47–89 (2013).
33. Wong, D. & Korz, W. Translating an Antagonist of Chemokine Receptor CXCR4: from bench to bedside. *Clin. Cancer Res.* **14**, 7975–80 (2008).
34. Lattin, J. *et al.* G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 16–32 (2007).
35. Mueller, a. Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood* **99**, 785–791 (2002).
36. Koelink, P. J. *et al.* Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. *Pharmacol. Ther.* **133**, 1–18 (2012).
37. EA, G.-Z. *et al.* Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.* 5613–26 (1996). doi:10.1371/journal.pone.0008314
38. Mendez-Enriquez, E. & García-Zepeda, E. a. The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation. *Inflammopharmacology* **21**, 397–406 (2013).
39. Mendez-Enriquez, E. *et al.* CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **152**, 354–63 (2008).
40. García-García, E. & Rosales, C. Nuclear factor activation by FcγR in human peripheral blood neutrophils detected by a novel flow cytometry-based method. *J. Immunol. Methods* **320**, 104–18 (2007).

41. Folco, E. G., Lei, H., Hsu, J. L. & Reed, R. Small-scale nuclear extracts for functional assays of gene-expression machineries. *J. Vis. Exp.* 2–7 (2012). doi:10.3791/4140
42. Krutzik, P. O. & Nolan, G. P. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry. A* **55**, 61–70 (2003).
43. Zanoni, I. *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868–80 (2011).
44. Guglielmotti, A. & Biondi, G. An anti-inflammatory small molecule that modulates the NFκB pathway Bindarit. 159–169 (2012).
45. Wang, W.-L. *et al.* Prostaglandin I(2) analogues suppress TNF-α expression in human monocytes via mitogen-activated protein kinase pathway. *Inflamm. Res.* **60**, 655–63 (2011).
46. Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L. & Gonzalez-Espinosa, C. Morphine prevents lipopolysaccharide-induced TNF secretion in mast cells blocking IκB kinase activation and SNAP-23 phosphorylation: correlation with the formation of a β-arrestin/TRAF6 complex. *J. Immunol.* **191**, 3400–9 (2013).
47. Porreca, E. *et al.* Peripheral blood mononuclear cell production of interleukin-8 and IL-8-dependent neutrophil function in hypercholesterolemic patients. *J. Atherosclerosis* **146-2**, 345-359 (1998).
48. Driessler, F. & Venstrom, K. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-κB activity: a role for p50. *Clin. Exp. Immunol.* 64–73 (2004).
49. Noursadeghi, M. *et al.* Quantitative imaging assay for NF-kappaB nuclear translocation in primary human macrophages. *J. Immunol. Methods* **329**, 194–200 (2008).
50. George, T. C., Morrissey, P. J., Cui, C., Singh, S. & Fitzgerald Bocarsly, P. Measurement of cytoplasmic to nuclear translocation. *Curr. Protoc. Cytom.* **Chapter 9**, Unit 9.28 (2009).
51. Rossol, M. *et al.* LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* **31**, 379–446 (2011).
52. Iyer, S. & Cheng, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 23–63 (2012).

53. Wang, Y. *et al.* Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling pathway. *Cell. Immunol.* **274**, 121–9 (2012).
54. Zanoni, I. *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868–80 (2011).
55. Fox, J. M., Letellier, E., Oliphant, C. J. & Signoret, N. TLR2-dependent pathway of heterologous down-modulation for the CC chemokine receptors 1, 2, and 5 in human blood monocytes. *Blood* **117**, 1851–60 (2011).
56. Parker, L. C., Whyte, M. K. B., Vogel, S. N., Dower, S. K. & Sabroe, I. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *J. Immunol.* **172**, 4977–86 (2004).