



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“LA TOLERANCIA A ENDOTOXINA ESTÁ ASOCIADA AL
ENRIQUECIMIENTO DE LA POBLACIÓN DE MONOCITOS
HUMANOS CD14+CD16+”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

BIOL. AIMÉE DOMÍNGUEZ NIETO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN RAYMUNDO VELÁZQUEZ RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F.

JULIO, 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.

RESUMEN

La pre-exposición a endotoxina induce un estado de resistencia celular a un segundo estímulo con el mismo antígeno. Este fenómeno se conoce como tolerancia a endotoxina y se caracteriza por la baja expresión de citocinas pro-inflamatorias. Establecimos un modelo de tolerancia a endotoxina en monocitos humanos de sangre periférica (MSP). En las células tolerantes encontramos una disminución de la degradación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y un decremento en la expresión de TNF (tanto RNA mensajero como proteína). Cuando probamos de forma indirecta la vía de señalización MyD88 dependiente de TLR4, mediante el cociente de los factores de diferenciación mieloide MyD88/MyD88s (variante corta), obtuvimos resultados similares en células tolerantes y no tolerantes. Al analizar las poblaciones celulares implicadas en este fenómeno de tolerancia, observamos un incremento significativo de la subpoblación CD14+CD16+. Adicionalmente, las células tolerantes a endotoxina tuvieron una alta producción de CXCL10/IP-10, una citocina típica de la vía de señalización de los TLRs que es MyD88 independiente.

ABSTRACT

Prior exposure to Lipopolysaccharides (LPS) induces a state of cell resistance to subsequent LPS restimulation, known as endotoxin tolerance, mainly by repressing the expression of pro-inflammatory cytokines. We established an endotoxin tolerance model in human Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Endotoxin-tolerant cells showed a decrease in I κ B α degradation and diminished expression of Tumor necrosis factor (TNF) (both messenger RNA [mRNA] and protein content). The Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/MyD88 splice variant (MyD88s) ratio, an indirect way to test the Toll-like receptor 4 (TLR4) MyD88-dependent signaling cascade, did not change in endotoxin tolerant cells when compared to LPS-stimulated or -unstimulated ones. Remarkably, cell population analysis indicated a significant increase of the CD14⁺ CD16⁺ subset only under the endotoxin-tolerant condition. On the other hand, endotoxin-tolerant cells produced higher amounts of C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), a typical MyD88-independent cytokine.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas (adscrito a la Facultad de Medicina) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la beca: 165493 y al Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca: 99091657, otorgadas durante el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” instituciones en las cuales se desarrolló la fase experimental de este proyecto.

Al Dr. Juan Raymundo Velázquez Rodríguez, gracias por haberme aceptado como su alumna, por enseñarme desde cómo tomar una pipeta, planear los experimentos, hasta como redactar un artículo. Gracias por su confianza y sobre todo por no permitir que me rindiera en el camino.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, gracias porque el abrirme las puertas de su laboratorio en los momentos más difíciles fue crucial para la realización de este proyecto. Gracias por encontrar una solución a cada problema que no estaba en mis posibilidades resolver. Gracias por su apoyo incondicional.

Al Dr. José Moreno Rodríguez, gracias por sus sugerencias y por el aporte de sus profundos conocimientos para el avance de este proyecto.

Al M en C. José Luis Ventura, gracias por su tiempo y paciencia para compartirme sus conocimientos. Gracias por su apoyo en el trabajo de laboratorio y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Sigifredo Pedraza y a la M en C. Laura Ventura gracias por su asesoría y apoyo en los experimentos de citometría.

Gracias a todo el personal del Depto. de Bioquímica del INCMNSZ especialmente a la M en C. Irma Mitre y a la Sra. Manuelita.



El ocaso de los dioses

El Dr. Roberto Kretschmer Schmid, hombre de rostro amable el cual la mayoría de las veces portaba corbata de moño. Nació en la ciudad de México, pero siempre se consideró veracruzano porque su infancia la vivió en Gutiérrez Zamora; cuando me lo presentaron le comenté que yo nací en el puerto de Veracruz y desde ese momento me convertí en su “paisana”.

Cada viernes los miembros de su grupo de investigación del hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI nos reuníamos para discutir los avances obtenidos de cada proyecto, era imposible faltar. Esas juntas comenzaban con la rifa de boletos para la orquesta filarmónica de la UNAM; el ganador, el siguiente viernes, tenía que mencionar sus impresiones de la pieza escuchada y estos comentarios eran enriquecidos con la vasta cultura musical del Dr. Kretschmer. Su obra preferida fue “el anillo del Nibelungo”, ópera creada por Wagner que se compone de cuatro secciones, siendo “el ocaso de los dioses” el final de dicha pieza.

Los resultados de este proyecto me brindaron la oportunidad de asistir a un congreso de inmunología en Boston. El Dr. Roberto nos dijo que era imprescindible visitar la biblioteca pública de dicha ciudad para conocer su colección de libros incunables, gracias a su recomendación, pude tener en mis manos un ejemplar original de la imprenta de Gutenberg.

Él siempre nos reiteró que “el patrimonio más valioso que uno puede tener es la cultura y la educación; lo que uno tiene dentro de la cabeza”. Confieso que mi trayecto por el doctorado se complicó debido a su ausencia, sin embargo, mi consuelo es una frase que leí en uno de sus tantos ensayos: **“a la universidad no se acude a abreviar certezas confortables, sino retos y dudas, a veces incómodas; a nutrirse del espíritu del desentendimiento educado”**.

DEDICATORIA

Gracias a mi patrocinador oficial, la fundación Domínguez-Nieto.

A mi mamá Profa. Bertha G. Nieto González porque sé que siempre cuento con tu apoyo incondicional, por tu cariño, amor y sobretodo tu confianza.

A mi papá Ing. José Rafael Domínguez Méndez, siempre me decías sólo te falta meter el gol, desgraciadamente no estás para verlo pero sí te cumplí. Gracias por todo tu apoyo.

A mi tía C.P. Adelina B. Nieto González, gracias por ser mi otra mamá (sí tengo 2) por sobrellevar conmigo lo más difícil de este camino, por no dejar que me rindiera, por tu sabiduría, cariño y amor incondicional.

A mi Lic. Wendy Domínguez Nieto y sus retoños María Fernanda y Francisco Cárdenas Domínguez, gracias por estar en las buenas y en las malas.

A la C.P. Marigel Lozano gracias por recibirme en su casa recién llegué de Veracruz al D.F., por enseñarme desde andar en el metro hasta dejarme formar parte de su familia.

Gracias a todos los maestros que me he topado en este camino, en particular a la Dra. Socorro Fernández la cual me introdujo en el mundo de la investigación científica.

Y gracias donde quiera que esté a mi negro por su compañía y amor, a lady, duquesa, condesa, corona y todas mis mascotas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
• Estructura de las endotoxinas.....	2
• Mecanismos de señalización de las endotoxinas	3
• Receptores tipo Toll.....	3
• Receptor tipo Toll 4 (TLR4).....	4
• Moduladores de las vías activadas por los TLRs	8
• Tolerancia a la endotoxina.....	10
• Tolerancia a la endotoxina <i>in vivo</i>	10
• Tolerancia a la endotoxina <i>in vitro</i>	11
• Tolerancia a la endotoxina <i>ex vivo</i>	12
• Subpoblaciones de monocitos	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	51

ANEXO 1

Artículo de revisión: **Control molecular de la inflamación: regulación de los receptores tipo Toll.** Domínguez-Nieto, et al.

ANEXO 2

Artículo experimental: **Human endotoxin tolerance is associated with enrichment of the CD14+ CD16+ monocyte subset.** Domínguez-Nieto, et al.

ANEXO 3

Diseño de sondas de TNF y HPRT, Universal probe library Roche.

ABREVIATURAS Y GLOSARIO

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCION

Figura 1. Estructura de las endotoxinas	2
Figura 2. Activación de la vía del receptor tipo Toll 4 a través de la proteína acopladora MyD88	6
Figura 3. Activación de la vía del receptor tipo Toll 4 independiente de la proteína acopladora MyD88 y dependiente de la proteína adaptadora TRIF	7
Figura 4. Moduladores negativos de las vías activadas por los TLRs	9

RESULTADOS

Figura 5. Modelo de tolerancia a endotoxina	29
Figura 6. Imagen del microarreglo de proteínas.....	32
Figura 7. Microarreglo de proteínas. Normalización de la producción de TNF en el modelo de tolerancia a endotoxina.....	33
Figura 8. Multielisa. Normalización de la producción de TNF en el modelo de tolerancia a endotoxina.....	35
Figura 9. Multielisa. Normalización de la producción de MIP-1 β en el modelo de tolerancia a endotoxina.....	36
Figura 10. Expresión relativa de TNF en el modelo de tolerancia a endotoxina	37
Figura 11. Western-blot representativo de la degradación de I κ B α en el modelo de tolerancia a endotoxina.....	38
Figura 12. Concentración de I κ B α en el modelo de tolerancia a endotoxina	39
Figura 13. Western-blot representativo de la expresión proteica de MyD88 y MyD88s en el modelo de tolerancia a endotoxina	40
Figura 14. Cociente de la expresión de MyD88/MyD88s en el modelo de tolerancia a endotoxina.....	41

Figura 15. Multielisa. Normalización de la producción de IP-10 como indicador de la vía de señalización MyD88 independiente	42
Figura 16. Efecto de la tolerancia a endotoxina en las subpoblaciones de MSP CD14+CD16- y CD14+CD16+	44
Figura 17. Efecto de la tolerancia a endotoxina en la expresión de TLR4 en superficie y la producción intracelular de TNF en las subpoblaciones de MSP CD14+CD16- y CD14+CD16+	46

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han sido una amenaza durante todas las épocas de la humanidad; fue la identificación del agente letal lo que permitió el desarrollo de medidas preventivas y terapéuticas. Louis Pasteur demostró que los gérmenes son responsables de la putrefacción y descomposición de la materia orgánica y reconoció que éstos microorganismos daban origen a las enfermedades infecciosas (Latour, 1994).

Posteriormente, Roberto Koch demostró que cada enfermedad infecciosa era originada por un microorganismo específico vivo, el cual después de entrar al cuerpo, se multiplicaba y causaba los síntomas (Brock, 1988). En 1884 Koch identificó la bacteria *Vibrio cholerae*, sin embargo en ese momento se desconocía el papel de las toxinas en la patogénesis del cólera.

Richard Pfeiffer, colaborador de Koch, examinó la naturaleza de las toxinas involucradas en la patogénesis del cólera. Durante sus experimentos, Pfeiffer inoculó *V. cholerae* a cobayos los cuales previamente habían sido inmunizados activa o pasivamente contra ésta bacteria. En éste experimento él no detectó bacterias vivas de *V. cholerae* en la cavidad abdominal de los cobayos, sin embargo los animales fallecieron.

Aparentemente en éstos animales la bacteria fue destruida, indicando que la toxicidad de *V. cholerae* no era dependiente de su viabilidad sino de algún tipo de toxina contenida en la bacteria, que era liberada hasta que ésta sufría lisis. Tiempo después, Pfeiffer demostró que la bacteria del cólera muerta por calor mantenía su potencial tóxico, lo que probó que ésta toxina no era una proteína clásica. Sus experimentos le permitieron formular el concepto que *V. cholerae* albergaba una sustancia tóxica termoestable asociada a la parte insoluble de la pared celular bacteriana (Beutler et al., 2003).

El denominó a ésta sustancia como “endotoxina”, posteriormente fueron también identificándas en *Salmonella typhi* y en *Haemophilus influenzae*.

Estructura de las endotoxinas

Las endotoxinas (también denominadas lipopolisacáridos o LPS) son los principales constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas; éstas se componen de un heteropolisacárido fosforilado covalentemente unido a un lípido de la membrana externa (lípido A) que contiene glucosamina. La porción de polisacárido que protuye de la membrana externa ha sido dividida en dos regiones: una región interna o central nombrada **núcleo** o **core** y una porción externa designada **cadena O** (**antígeno O** o **polisacárido O**) **Figura 1** (Rietschel et al., 1992).

La región del núcleo, que une el lípido A con la cadena O, ha sido a su vez subdividida en una región interna y una región externa. La cadena O constituye la porción inmunodominante de la molécula y los determinantes estructurales de esta región proveen la base de la clasificación serológica de la familia Enterobacteriaceae.

El lípido A, que se encuentra muy conservado entre las especies, es responsable de las propiedades patofisiológicas de las endotoxinas. Dentro de sus actividades biológicas más relevantes están la potente activación de macrófagos, y en consecuencia a éste evento, la producción de gran cantidad tanto de citocinas como otros mediadores con múltiples efectos en diferentes órganos (Morrison et al., 1987).

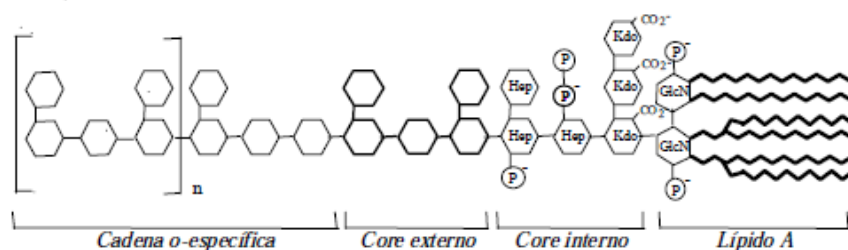


Figura 1. Estructura de las endotoxinas (Imagen de Bermejo, 2003)

Mecanismos de señalización de las endotoxinas

A nivel celular, las endotoxinas se unen a receptores los cuales activan una serie de cascadas de transducción de señales, ampliamente caracterizadas.

En principio, las endotoxinas forman un complejo con la denominada proteína de unión al LPS (LBP) mediante su unión con el lípido A (Taylor et al., 1995). La LBP convierte los agregados de endotoxina en monómeros y los transfiere a las lipoproteínas (Wurfel et al., 1995), a la β -integrina leucocitaria CD11c/CD18 y preferentemente al antígeno de diferenciación monocítico CD14 (Ulevitch et al., 1995).

El CD14 es uno de los principales responsables de la activación celular inducida por la endotoxina; éste puede encontrarse de forma soluble en el suero (sCD14) o asociado a la membrana (mCD14) de algunos tipos celulares como monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. La forma sCD14 facilita la transferencia de la endotoxina a las lipoproteínas (Wurfel et al., 1995) y aunque antes sólo se creía que sCD14 iba asociada al complejo LBP-endotoxina, sCD14 también puede unirse de forma directa a la endotoxina (Schumann et al., 1996).

La endotoxina puede interactuar directamente formando complejos con el sCD14, con el mCD14 y con los receptores tipo Toll (TLR) (Poltorak et al., 2000).

Receptores tipo Toll

En 1988 Nusslein-Volhard acuñó el término Toll (en alemán significa extraordinario) para referirse a un gen que codifica para un receptor de membrana involucrado en el desarrollo dorso-ventral de la mosca de la fruta, ya que cuando estos insectos carecían de esta proteína se desarrollaban de manera fuera de lo común (O'Neill, 2004), de ahí que en un principio los TLRs se relacionaran con la diferenciación morfológica de este insecto.

A mediados de los años noventa del siglo pasado, se descubrió que la defensa fisiológica generada por la mosca de la fruta consistía en la producción de diferentes péptidos anti-microbianos (O'Neill, 2004). Los promotores de los genes que codifican estos péptidos contienen secuencias de reconocimiento para el factor nuclear κB (NF- κB), este factor de transcripción es central para la expresión de genes relacionados con la reacción inflamatoria, el control de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis (Karin, 1998).

El grupo de Hoffmann encontró que las moscas adultas que no expresaban el factor de transcripción denominado “dorsal” (proteína de la familia NF- κB y regulada por Toll) morían de infecciones causadas por hongos (O'Neill, 2004); de esta manera se estableció la relación entre los genes involucrados con la defensa del hospedero y dicho receptor.

Actualmente sabemos que la familia TLR cuenta con 13 miembros; estos receptores presentan tres regiones estructurales: el extremo amino que contiene la región extracelular con el dominio de unión al ligando que se caracteriza por presentar secuencias repetidas ricas en leucina, una región transmembranal, y el extremo carboxilo que contiene la región intracelular con un dominio TIR (receptor Toll/IL-1) originalmente identificado en el receptor de IL-1.

Receptor tipo Toll 4 (TLR4)

Previamente, en ratones de la cepa C3H/HeJ que no tenían la capacidad de responder a endotoxina, se reportó que tenían un defecto en el gen *Lps* localizado en el cromosoma 4 de ratones que regula la habilidad de respuesta a endotoxina (Beutler et al., 1986). El grupo de Vogel relacionó el defecto en el gen *Lps* con una inhibición del reconocimiento de la endotoxina en los macrófagos de los ratones C3H/HeJ (Manthey et al., 1994).

Actualmente es conocido que el receptor que identifica a la endotoxina es el TLR4 (Chow et al., 1999) y que la falta de respuesta a la endotoxina en la cepa C3H/HeJ se debe a una mutación puntual en este receptor (Hoshino, 1999). El TLR4 fue el primer TLR humano descrito y ha sido el mejor caracterizado debido a su relación con el choque séptico, éste receptor identifica a las endotoxinas de bacterias Gram negativas. La interacción entre el complejo formado por CD14, LBP y la endotoxina con TLR4, da origen a una secuencia de eventos intracelulares que culminan con la expresión de genes relacionados con la inflamación como el factor de necrosis tumoral (TNF) o interleucina 1 β (IL-1 β).

El funcionamiento de estas rutas puede ser dependiente o independiente de la proteína acopladora MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88) (Li et al., 2005).

Activación de la vía dependiente de MyD88, **Figura 2:**

- 1) Esta proteína acopladora se recluta y asocia con los TLRs a través de los dominios TIR de ambas moléculas, este evento permite que MyD88 se una a la cinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-4) a través de su dominio intermedio (DI) y a IRAK-1 mediante su dominio de muerte (DD); la proximidad entre ambas cinasas provoca que IRAK-4 fosforile a IRAK-1.
- 2) IRAK-1 fosforilado se une a la proteína factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF-6), ambos se disocian del complejo del receptor e interactúan con otro grupo proteico formado por la cinasa activada de TGF- β (TAK1) y a las proteínas de unión a TAK1 (TAB1 y 2).
- 3) Una vez formado este complejo proteico surgen dos vías independientes de señalización: una que lleva a la activación de las MAP cinasas (3a) y otra que conduce a la activación del sistema NF- κ B (3b). En la primera ruta (3a), la activación de TAK1 induce la fosforilación de las MAP's cinasas (ERK, JNK y p38) promoviendo la translocación nuclear del factor AP1; en la segunda ruta (3b), TAK 1 fosforila el complejo de cinasas de I κ B (IKKs) que a su vez fosforilan a I κ B marcándolo para su ubiquitinación y subsecuente destrucción por

el proteasoma. El dímero NF- κ B (p50, p65) se transloca al núcleo cuando la secuencia de localización nuclear queda expuesta, ya en el núcleo, el factor transcripcional se une a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco (Foster, 2009).

4) En la búsqueda de moléculas estructuralmente similares a MyD88 se identificó a otra proteína adaptadora que también contiene el dominio TIR (TIRAP) (Horng, 2002). Esta proteína ayuda a MyD88 en la señalización sólo cuando son activados TLR2 o TLR4. También fue caracterizada la tirosina cinasa de Bruton (Btk) que interactúa con el dominio TIR de la mayoría de los TLRs (Jefferies, 2003).

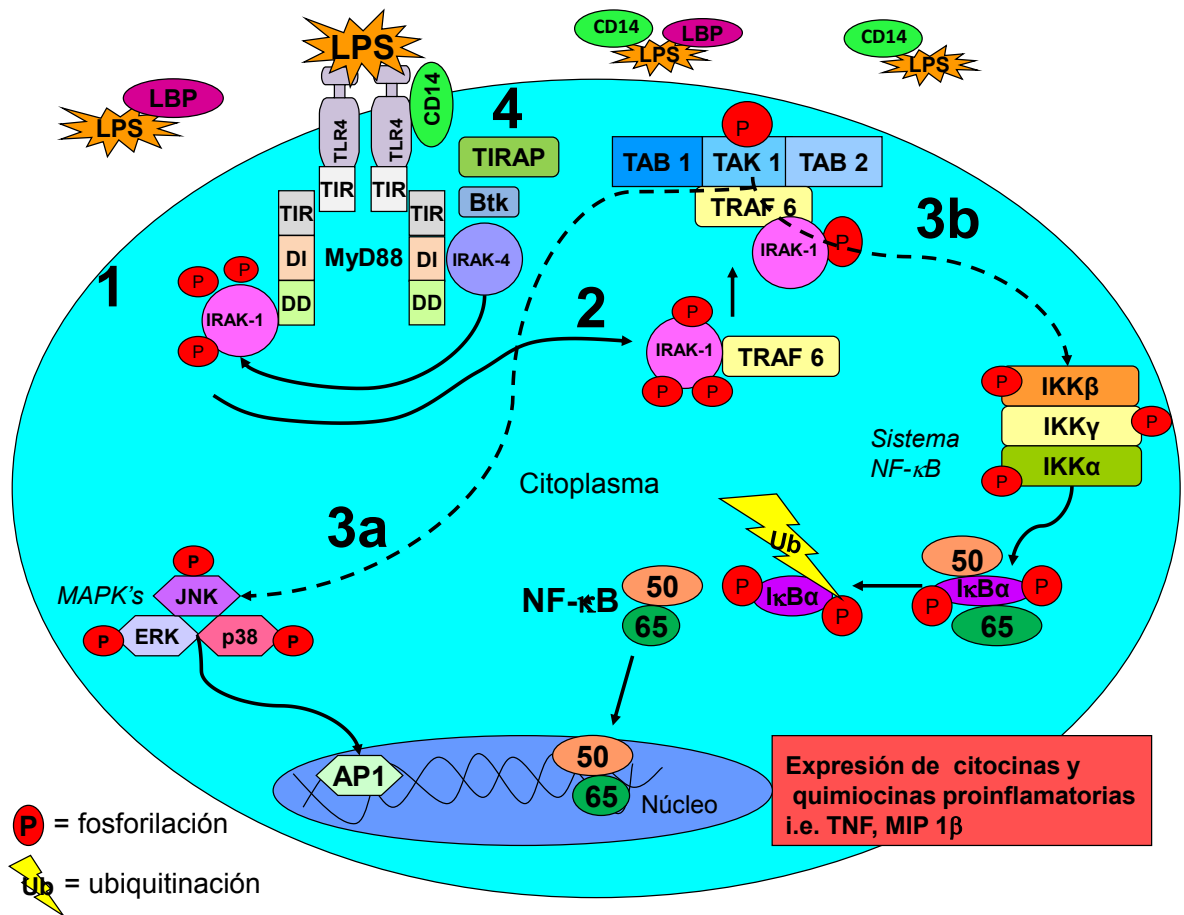


Figura 2. Activación de la vía del receptor TLR4 dependiente de la proteína acopladora MyD88 que activa a la vía de las MAP-quinasas y del sistema NF- κ B. Los números indican la secuencia en que se dan las cuatro etapas descritas en el texto.

La vía independiente de la proteína acopladora MyD88 empleada por TLR4 señala a través de dos proteínas: adaptador que contiene el dominio TIR e induce interferón IFN- β (TRIF) y molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (Li et al., 2005) **Figura 3**. La señalización de ésta vía independiente a MyD88 abarca la siguiente secuencia:

- 1) El complejo de proteínas TRIF/TRAM reclutan al complejo proteico TRAF6-TAK1 TAB2 que activa a las IKKs permitiendo la liberación de NF- κ B.
- 2) A través de otra ruta, las proteínas TRIF/TRAM interactúan con el dímero TBK1/IKK ϵ ocasionando la translocación nuclear del factor 3 regulador de IFN (IRF-3), provocando la síntesis de interferón tipo I (IFN α/β).

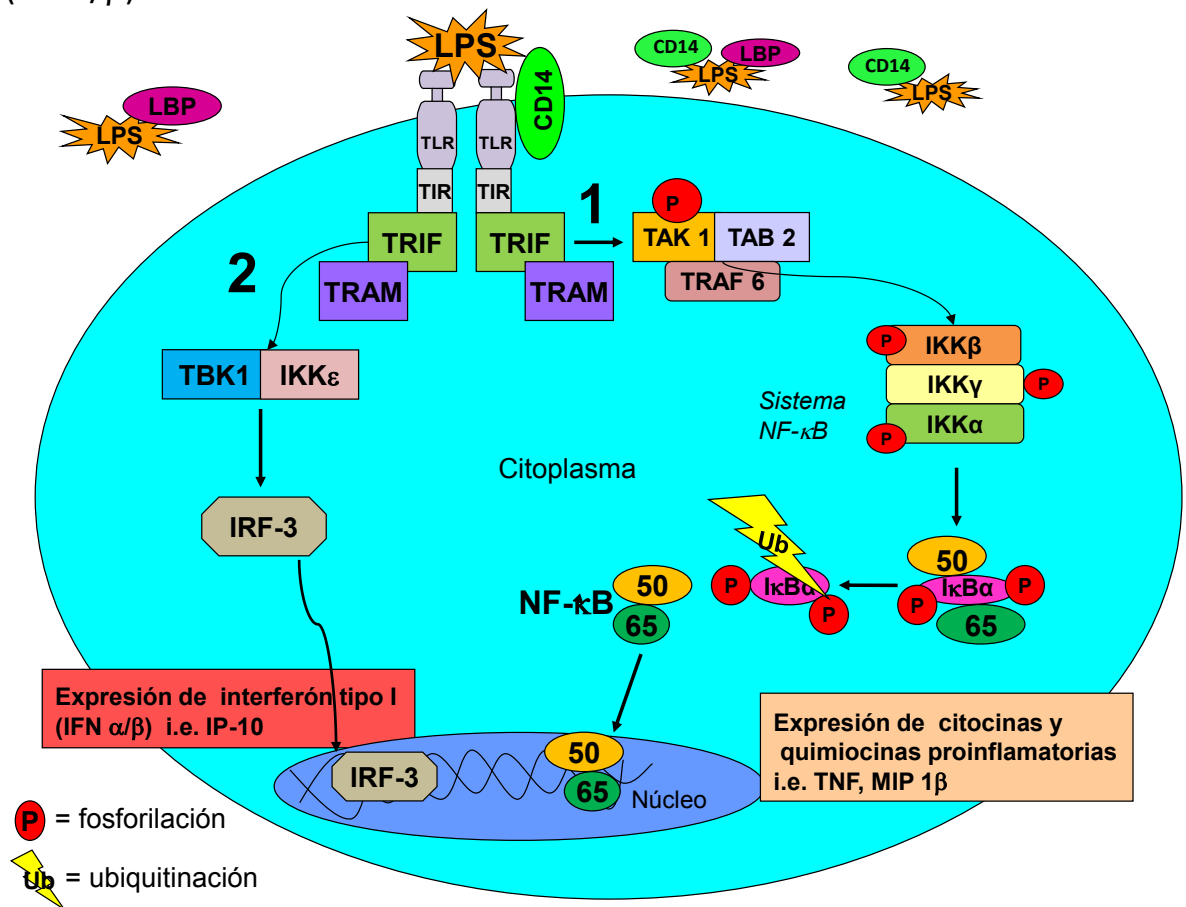


Figura 3. Activación de la vía del receptor TLR4 independiente de la proteína acopladora MyD88 y dependiente de las proteínas adaptadoras TRIF/TRAM que conduce a la expresión de la familia de interferón tipo 1.

Moduladores de las vías activadas por los TLRs

La producción de citocinas proinflamatorias como el TNF, IL-6 o IL-1 β se considera como un marcador de la activación celular mediada por los TLRs; la producción exacerbada de estos mediadores inflamatorios origina serios desórdenes sistémicos en el hospedero que pueden causarle síndrome de falla orgánica múltiple e incluso la muerte. Cabe mencionar que esta es la condición más común en pacientes críticos en las unidades de terapia intensiva a nivel mundial (Domínguez, et al. 2009).

A pesar del conocimiento de la diversidad de ligandos que activan los TLR's, la señalización inducida por LPS a través del receptor TLR4 ha sido la más estudiada. Los mecanismos de señalización de ésta vía son similares a los que ocurren durante la activación de los otros TLR's. Actualmente han sido descubiertas diferentes moléculas intracelulares que regulan negativamente la activación inducida por LPS, entre las más conocidas se encuentran: MyD88s, IRAK-M, ST2, SIGIRR y SOCS1 (Liew, et al., 2005) **Figura 4.**

La molécula MyD88s es el producto de un empalme alternativo que elimina al exón 2 que corresponde al dominio intermedio de MyD88, la ausencia de éste dominio en MyD88s impide que IRAK-4 sea reclutado, bloqueando la activación de NF- κ B (Janssens et al., 2003). Se ha reportado que ésta molécula es inducible por LPS en ratones y en la línea celular THP1 (Janssens et al., 2002); en pacientes sépticos se encuentra sobre-expresada a nivel de mensajero (Adib-Conquy et al., 2006).

La familia de cinasas IRAK cumple una importante actividad en la transducción de la señal de los TLRs, sin embargo, uno de sus integrantes conocido como IRAK-M, no posee actividad enzimática (Kobayashi et al., 2004). Esta molécula interfiere con la disociación entre IRAK4/IRAK-1 y MyD88, impidiendo la posterior interacción de IRAK-1 con TRAF6 y está relacionada a la tolerancia ya que ésta molécula es inducible por la exposición a LPS (Kobayashi et al., 2004).

Las proteínas transmembranales ST2 y SIGIRR pertenecen a la superfamilia de proteínas que presentan un dominio tipo TIR; ambas estructuras se consideran receptores huérfanos que interfieren en la señalización que activa a NF- κ B (Liew, et al., 2005). El mecanismo por el cual ST2 bloquea la activación de los TLRs es secuestrando a los adaptadores MyD88 y TIRAP a través de su dominio TIR y la estrategia utilizada por SIGIRR es desconocida, sólo se sabe que interactúa con TLR4, IRAK y TRAF6.

La molécula supresora 1 de la señalización de citocinas (SOCS-1) pertenece a un grupo de proteínas involucrado en la regulación negativa de las vías de transducción de citocinas, en particular la activación de la vía de interferón tipo I (Kobayashi et al., 2004).

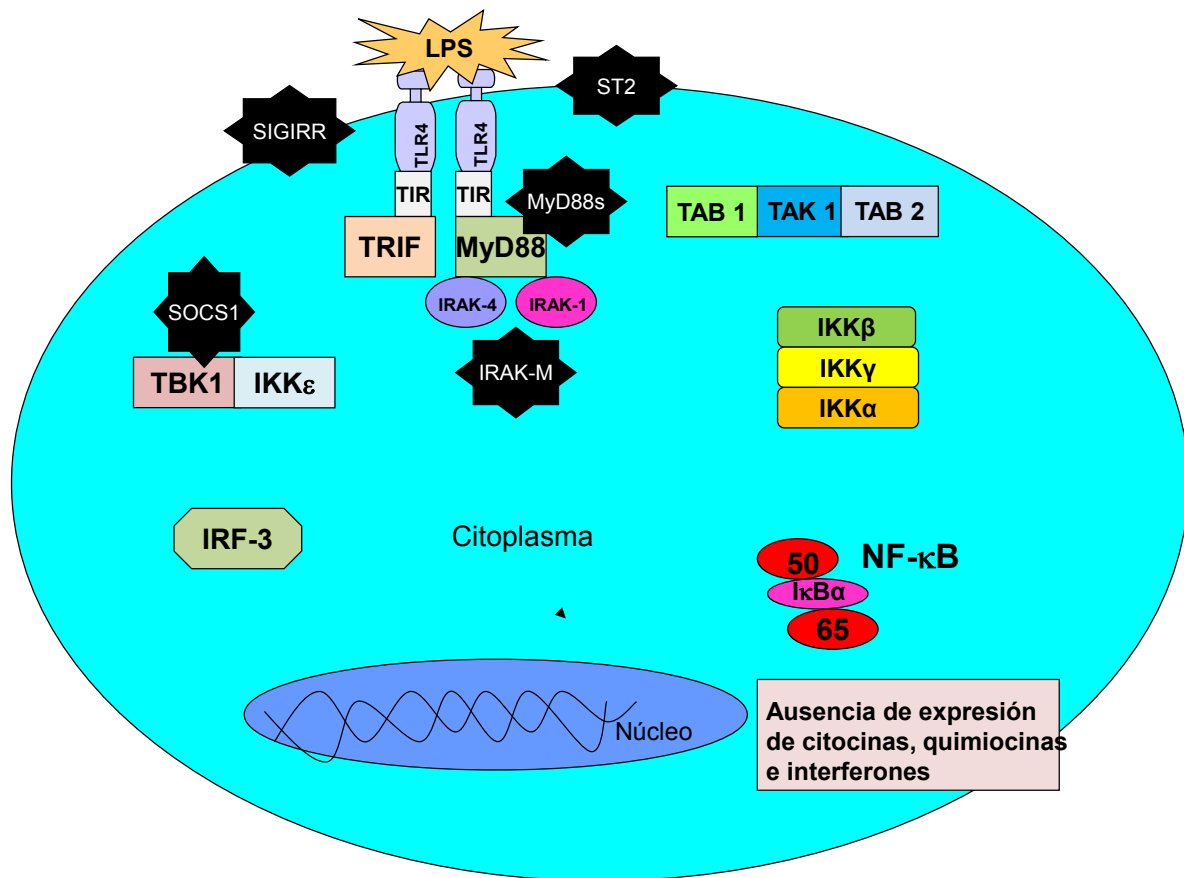


Figura 4. Moduladores negativos de las vías activadas por los TLRs, las estrellas negras representan diferentes tipos de moduladores de la vía. MyD88s: forma truncada de MyD88; IRAK-M: miembro de familia IRAK que carece de actividad enzimática; ST2 y

SIGIRR: receptores transmembranales huérfanos; SOCS1: supresor tipo 1 de la señalización de citocinas.

Tolerancia a la endotoxina

El fenómeno de tolerancia a endotoxina se define como una respuesta reducida ante un estímulo de LPS en un hospedero o célula que previamente fue sensibilizada con este mismo estímulo. Este fenómeno implica que el hospedero o célula que presentó modificaciones pato fisiológicas ante el primer encuentro con la endotoxina, en un segundo reto no responde.

Tolerancia a la endotoxina *in vivo*

La tolerancia a endotoxina fue inicialmente descrita en modelos animales los cuales eran sometidos a una exposición repetida de endotoxina.

En 1946, Paul Beeson reportó una reducción progresiva en la respuesta febril de conejos que habían sido inyectados varias veces con un pirógeno de la bacteria de la tifoidea. Posteriormente, demostró que la tolerancia ante este pirógeno bacteriano era disminuida mediante el bloqueo del sistema retículo-endotelial y que la desaparición de las sustancias bacterianas ocurría más rápido en los animales tolerantes (Beeson, 1946). Greisman y colegas encontraron una incrementada capacidad fagocítica en conejos a los cuales se les indujo tolerancia a endotoxina comparado con conejos normales (Greisman et al., 1963). Posteriormente, Freedman demostró que ocupando plasma de conejos tolerantes a endotoxina, se podía transferir la tolerancia a otros animales sugiriendo la existencia de mediadores circulantes de la tolerancia (Freedman, 1960).

Fue el desarrollo y mejoramiento de la técnica para medir las citocinas, lo que permitió explicar parcialmente el aumento en la sobrevivencia de los animales tolerantes a endotoxina. Sanchez-Cantu y colaboradores expusieron a un pre-tratamiento con endotoxina a un grupo de ratas las cuales sobrevivieron a un segundo reto. El 100% del grupo de ratas sin pre-tratamiento, no sobrevivió al reto con endotoxina.

Fue en este grupo donde se reportaron altos niveles de TNF en el suero, 90 min después de la administración de endotoxina. En el grupo de animales tolerantes, la expresión de TNF se encontró disminuida (Sanchez-Cantu et al., 1989).

En humanos también se ha estudiado la tolerancia a endotoxina. Durante el período 1940-1950, pacientes convalecientes de fiebre tifoidea (Neva et al., 1950) y pacientes con malaria (Heyman et al. 1949) fueron inyectados con endotoxina. La pirogenicidad de este estímulo se encontró disminuida en estos pacientes a comparación de la respuesta de los controles sanos.

En la década de los años sesentas del siglo pasado, fueron reportados resultados similares en voluntarios inoculados con *Salmonella typhi* (Greisman et al., 1969) o infectados por picadura de mosquito con *Plasmodium* (Rubestein et al., 1965) los cuales posteriormente fueron inyectados con endotoxina. Incluso se reportó disminución de la respuesta febril a endotoxina en pacientes con infecciones del tracto urinario y con pielonefritis (McCabe et al., 1963).

Tolerancia a la endotoxina *in vitro*

Los modelos *in vitro* más empleados para estudiar la tolerancia a la endotoxina son los que utilizan monocitos, macrófagos o líneas celulares similares a macrófagos. Los estudios *in vitro* con macrófagos muestran que el pre-tratamiento con dosis bajas de endotoxina es capaz de inhibir la expresión de TNF ante un segundo estímulo (Shinji et al., 1994, Takasuka et al., 1991, Hirohashi et al., 1996). La inhibición de la producción de TNF es una característica universal de la tolerancia a endotoxina, sin embargo éste fenómeno también altera a otros mediadores. Existen discrepancias en cuanto a la producción de IL-1 β e IL-6 en células tolerantes a endotoxina, unos reportes indican aumento y otros indican disminución de dichas citocinas ante éste fenómeno (West et al., 2002). Probablemente estas discrepancias se relacionen con el grado de pureza, el tipo y la dosis de la endotoxina y las propiedades de las células ocupadas en los estudios.

En células monocíticas tolerantes a endotoxina se ha reportado un aumento en la producción de IL-6, IL-1 β y la prostaglandina E₂ junto a la inhibición de TNF (West et al., 1994). En cuanto a las CC quimiocinas la producción de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β y la citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación (RANTES/CCL5) fue suprimida en células tolerantes a endotoxina, y en éstas mismas células, la producción de IL-8 y de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) se mantuvo alta o incrementada (Kauffmann et al., 2000).

Incluso, en monocitos tolerantes a endotoxina también se ha reportado un deterioro en la presentación de antígeno (Wolk et al., 2000) e inhibición de la expresión de CD14 (Kawasaki et al., 2001).

Tolerancia a la endotoxina *ex vivo*

La reducción en la capacidad para producir citocinas de los leucocitos circulantes depende de diversos factores entre ellos, la naturaleza del estrés. Existen diferentes reportes sobre la alteración de la capacidad *ex vivo* para producir citocinas en respuesta a la endotoxina por parte de leucocitos aislados (Munoz et al , 1991, Shahbazian et al., 1999, Haupt et al., 1996).

Diversas investigaciones sugieren que la inhibición en la producción de citocinas en respuesta a endotoxina está asociada a la presencia de sepsis (Marie et al., 2000, Munoz et al., 1991, Shahbazian et al., 1999, Flach et al., 1999). Los monocitos de pacientes con sepsis presentan una disminuida producción de TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (Van Deuren et al.,1994, Muñoz et al., 1991) y una elevada producción de IL-10 (Adib-Conquy et al., 2006).

El hecho que los monocitos de pacientes con sepsis presenten una producción disminuida de TNF y una producción alta de IL-10 implica que estos monocitos son capaces de percibir la endotoxina, pero las vías de señalización han sido alteradas para limitar la producción de citocinas pro-inflamatorias y mantener o inducir las anti-inflamatorias. A partir de este hallazgo se empezó a estudiar la participación de las subpoblaciones de los monocitos en este fenómeno.

Subpoblaciones de monocitos

Los monocitos de sangre periférica (MSP) muestran una variabilidad en tamaño, granularidad y morfología nuclear. Inicialmente los monocitos fueron identificados por una alta expresión de CD14 (Setoguchi et al., 1989). La subsecuente identificación de la expresión de diferentes marcadores antigénicos mostró que la población de MSP es heterogénea y este hallazgo brindó las primeras pistas de diferentes actividades fisiológicas asociadas a las subpoblaciones de los monocitos.

Inicialmente los monocitos fueron clasificados en subpoblaciones caracterizadas por diferentes niveles de expresión de las moléculas CD14 y CD16. Los monocitos denominados “clásicos” presentan una alta expresión de CD14, son negativos para CD16 (monocitos CD14+CD16-) y constituyen la mayoría de todos los monocitos presentes en sujetos sanos. A diferencia de los monocitos “clásicos”, los monocitos positivos para CD16 denominados “no clásicos” (CD14+CD16+) corresponden al 5-15% de todos los monocitos (Passlick et al., 1989). Recientemente, el Comité de Nomenclatura de la Unión de Sociedades Inmunológicas (NC-IUIS) define tres tipos de monocitos: monocitos clásicos (CD14++CD16-); monocitos intermedios (CD14++CD16+) y monocitos no clásicos (CD14+CD16+) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

A la fecha, en la mayoría de los reportes clínicos, los monocitos CD14+CD16+ han sido analizados y catalogados como una sola subpoblación y se ha encontrado que su frecuencia incrementa significativamente en condiciones inflamatorias como sepsis, tuberculosis, aterosclerosis, etc (Wong et al., 2012).

Cabe destacar que en monocitos de pacientes sépticos se ha reportado la expansión de la subpoblación CD14+CD16+ (Fingerle et al., 1993). Reportes recientes indican que ésta subpoblación en respuesta a endotoxina, favorece la activación a través de TLR4 de la vía dependiente de TRIF la cual activa a translocación nuclear del factor IRF-3 y promueve la expresión de IFN β , RANTES y de la proteína inducible por IFN γ (IP-10/CXCL10) (Shalova et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN

La actividad de la endotoxina de bacterias Gram negativas, el mayor inductor del estado séptico en humanos, ha sido caracterizada *in extenso*. Aunque las infecciones por bacterias Gram negativas han predominado, las infecciones por bacterias Gram positivas están involucradas en casi la mitad de los casos de sepsis.

La mayoría de las publicaciones de tolerancia a endotoxina en sepsis y en modelos *ex vivo*, no correlacionan la respuesta del huésped con el tipo de patógeno (bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas, ambos u otros microorganismos) y no consideran a la inmunidad de cada huésped como factor de variación de la respuesta ante el patógeno; por lo cual resulta difícil caracterizar el fenómeno de tolerancia a endotoxina *in vivo*.

En estos modelos se recurre al uso de monocitos o macrófagos, principales estirpes celulares que responden a endotoxina ya que poseen los receptores y moléculas de señalización involucrados en el reconocimiento de este agente. Esta situación nos llevó a desarrollar un modelo reduccionista de tolerancia a endotoxina *in vitro*, donde es posible correlacionar la tolerancia a endotoxina con una población particular de monocitos de sangre periférica.

HIPÓTESIS

En la tolerancia a endotoxina humana está involucrada una subpoblación particular de monocitos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la población CD14+CD16+ está asociada a la tolerancia a endotoxina en un modelo de monocitos de sangre periférica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un modelo reduccionista de tolerancia a endotoxina *in vitro* en MSP; utilizando como marcadores de activación la expresión de TNF (mRNA y proteína) y la degradación de I κ B α .
- Correlacionar el cociente de la actividad de las proteínas MyD88/MyD88s, en las diferentes condiciones experimentales.
- Analizar los niveles de CD14, CD16, del receptor TLR4; así como la producción intracelular de TNF en células tolerantes y no tolerantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo celular

Fueron requeridos donadores sanos y sin ningún tipo de tratamiento del Banco de sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se aislaron los monocitos de sangre periférica (MSP) a partir de concentrados leucocitarios de dichos donadores. El procedimiento de aislamiento de MSP fue el siguiente:

- Se diluyeron en proporción 1:2 50 mL de sangre con solución salina fisiológica
- Cuidadosamente se añadieron 30 mL de sangre a un tubo conteniendo 10 mL de Ficoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) para formar los gradientes
- Los gradientes se centrifugaron a 2000 rpm por 30 min a 18°C
- Utilizando una pipeta Pasteur estéril se removió la interfase (anillo blanco) rica en monocitos y plaquetas; los monocitos se transfirieron a un tubo estéril
- Se añadieron por lo menos 3 volúmenes (6 mL) de RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) a los monocitos en el tubo y se resuspendieron con pipeta Pasteur
- Se centrifugó a 1800 por 10 min a 18°C
- Se removió el sobrenadante y se repitieron los dos pasos anteriores
- Los monocitos se resuspendieron en 5 mL de RPMI 1640

Diez millones de MSP (por condición experimental) fueron resuspendidos en RPMI 1640 suplementado con 2mM L-glutamina, y una mezcla al 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO, USA) y fueron incubados en CO₂ al 5% a 37°C en cajas de Petri de 50 mm durante una h. Posteriormente, se removió el sobrenadante y las células no adherentes se descartaron; las células adherentes permanecieron en cultivo con medio RPMI 1640 suplementado con 2mM L-glutamina, una mezcla al 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO, USA) y suero bovino fetal al 10% en CO₂ al 5% a 37°C.

Después de 24 h de incubación, las células adherentes a las cuales nos referiremos como monocitos, permanecieron sin ser estimuladas. Para generar la condición de tolerancia a endotoxina, los monocitos fueron pre-sensibilizados con 10ng/mL de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante 24 h. (El LPS fue previamente sonicado 10 min para ser utilizado como estímulo).

Después de 48 h de incubación, se removió el sobrenadante y las células fueron lavadas 2 veces con RPMI 1640 tibio, y las siguientes condiciones experimentales fueron establecidas:

- a) **Control:** monocitos sin estímulo
- b) **Endotoxina:** monocitos tratados sólo una vez con 10 ng/mL de endotoxina
- c) **Endotoxina+Pol B:** monocitos tratados con 10 ng/mL de endotoxina+10 µg/mL polimixina B (Sigma, USA). Usado como control negativo, ya que la polimixina B es un antibiótico que se une al lípido A de la endotoxina y por lo tanto bloquea su actividad.

d) Tolerancia a endotoxina: monocitos pre-sensibilizados con 10 ng/mL de endotoxina 24 h antes de ser retados una segunda vez con 10 ng/mL de endotoxina.

En las cuatro condiciones experimentales después de 48 h de cultivo, se evaluó el contenido de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ después de 20 min, la expresión del RNA mensajero (mRNA) de TNF después de 60 min y la producción de la proteína de TNF después de 3 h.

Aislamiento de RNA, transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtPCR)

El RNA total fue extraído de los monocitos utilizando Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente:

- Se adicionó 1 mL de Trizol a las cajas de Petri por cada condición experimental, se rasparon las cajas con una espátula nueva y se recuperó el material celular en un tubo eppendorf
- Se incubó durante 5 min a temperatura del laboratorio
- Se adicionó 0.2 mL de cloroformo al 100%, se agito vigorosamente durante 2 min y se centrifugó 15 min a 12,000 rpm a 4°C
- Se recuperó la fase acuosa y ésta se mezcló con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se agitaron los tubos
- Se centrifugaron los tubos a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min
- Se recuperó la fase acuosa y ésta se mezcló por inversión con 1 volumen de isopropanol frío al 100% (500 μL por condición) y se incubó 30 min a -20°C

- Se centrifugaron los tubos 15 min a 12,000 rpm a 4°C, se quitaron los restos de isopropanol con jeringa
- Se lavó la pastilla de RNA con 500 µL de etanol frío al 75% en agua DEPC, se agitaron los tubos en vórtex y se centrifugaron a 9500 rpm a 4°C por 10 min
- Se retiró el etanol con jeringa, se esperó a que se evaporaran los restos de etanol
- Se resuspendió el RNA en agua DEPC estéril, se cuantificó el RNA y se guardaron los tubos a -70°C

La cuantificación del RNA se determinó por la proporción de absorbancia 260 nm/280 nm en un ND-1000 NanoDrop®. Para la reacción de RT, no menos de 1 µg del RNA total fue mezclado con Oligo-dT (12-18 mer) (Invitrogen Life Technologies, USA), 200 U de Superscript II (Invitrogen Life Technologies, Brazil), first strand buffer, 0.1 M DTT y la mezcla de deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) 25 mM (Invitrogen Life Technologies, Brazil).

La RT consistió en:

- No menos de 1 µg del RNA total fue mezclado con 1 µL Oligo-dT y se colocó en el termociclador a 70°C por diez min.
- A la mezcla anterior se le agregó 1 µL de superscript, 4 µL de first strand buffer, 2 µL de 0.1 M DTT y .4 µL de la mezcla de dNTPs; se colocó en el termociclador a 42°C por una hora.

El rtPCR se realizó en capilares con 20 μ L de mezcla de reacción; se valoraron los genes TNF y HPRT empleando para cada uno sondas específicas de la Universal Probe Library (UPL) (Roche Applied Science, Salt Lake City, UT, USA) y primers específicos para dichas sondas **ver anexo**. La mezcla de reacción del PCR contuvo 2 μ L de Light Cycler TaqMan Master, 0.1 μ L de PCR primer mix, 0.1 μ L de la sonda humana específica UPL y 0.125 μ L Uracil-DNA glicosilasa. Todas las reacciones se realizaron y analizaron en un Light Cycler 2.0 instrument (Roche Applied Science).

El programa para la rtPCR consistió en:

- Pre-incubación (Uracil-DNA glicosilasa) 1 ciclo
40°C durante 10 min
- Incubación 1 ciclo
95°C durante 10 min
- Amplificación 45 ciclos
95°C durante 10 seg
60°C durante 20 seg
72°C durante 10 seg
- Enfriamiento 1 ciclo
40°C durante 30 seg

Los resultados de TNF fueron normalizados empleando el método $\Delta\Delta C_t$ contra la expresión del gen constitutivo hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT) para obtener la expresión relativa del gen blanco **ver anexo**.

Extractos citoplásmicos, electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot

Después de un período de incubación de 20 min, los monocitos se lavaron tres veces con PBS frío y se rasparon las cajas Petri con una espátula nueva para recolectar el material celular. El citoplasma se separó de los núcleos por centrifugación a 14,000 rpm por 10 min. Se recuperó el citoplasma y se resuspendió en un buffer con anti-proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Se cuantificó la cantidad de proteína de cada extracto citoplásmico mediante el método de Bradford (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) empleando concentraciones de 0 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albúmina sérica bovina (Sigma, St. Louis MO, USA) para la curva patrón.

Se ocuparon 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína de cada extracto citoplásmico que fueron mezclados 1:1 con amortiguador de Laemmli 5X; posteriormente se colocaron en ebullición a baño maría durante 10 min y se dejaron estabilizar a 4°C por 5 min. Se realizó una electroforesis de las muestras en un gel concentrador de acrilamida al 4% y un gel separador al 10%. La corrida se efectuó a 80 v durante 15 min, posteriormente el voltaje se aumentó a 100 v durante 2 h, hasta obtener la separación deseada de las proteínas; guiándonos con las bandas del marcador de peso molecular. Mediante una electro-transferencia húmeda, las proteínas separadas se transfirieron a 40 Watts durante toda la noche a una membrana de PVDF con tamaño de poro de 0.45 μm (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Inmuno-detección:

- La membrana de PVDF que tenía embebidas las proteínas del extracto citoplásmico fue bloqueada con una solución de TBS con Tween-20 al 0.1% y leche descremada al 5% por 1 h
- Se incubó con el anticuerpo primario 1 h 30 min en agitación en una solución de TBS-Tween con albúmina al 0.1%
- Se lavó cinco veces con TBS-Tween (tres de 10 min y 2 de 5 min)
- Se incubó con el anticuerpo secundario por 1 h en una solución de TBS-Tween con leche descremada al 5%
- Se lavó cinco veces con TBS-Tween (tres de 10 min cada uno y dos de cinco min) con un enjuague final de TBS sin Tween
- Se revelaron las proteínas de interés mediante quimioluminiscencia, en donde la enzima peroxidasa de rábano (HRP) catalizó la emisión de luz a 428 nm a través de la oxidación del luminol con el reactivo supersignal (PIERCE, Rockford, GB), que fue revelada al exponer una película fotográfica (Kodak, Rochester NY, USA) a diferentes tiempos
- Los anticuerpos primarios fueron: anti-MyD88 policlonal que reconoce los aminoácidos 233-248 de MyD88 humano (Chemicon International, Temecula, CA, USA) diluido 1:4000, anti-I κ B α policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluido 1:2000 y anti-actina 1:2000 (donado por el Dr. Manuel Hernández del CINVESTAV-IPN)

Ensayo Milliplex

Después de 3 h de tratamiento, los sobrenadantes de cada condición fueron colectados y congelados a -80°C hasta su empleo para medir citocinas. Los ensayos se realizaron con el Kit Millipore's MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente:

- Se añadieron 200 μL de buffer de lavado por pozo y se agitó la placa por 10 min a temperatura ambiente, pasados los 10 min se decantó el buffer
- Se añadieron 25 μL del estándar de citocinas en los pozos indicados
- Se añadieron 25 μL del buffer de ensayo a los pozos designados como fondo (background) y para los pozos de las muestras
- Se añadieron 25 μL de H_2O ultrapura
- Se añadieron 25 μL de cada muestra a los pozos indicados
- Se añadieron 25 μL de las perlas magnéticas acopladas a los anticuerpos de las citocinas
- Se incubó toda la noche a 4°C en agitación
- La placa se colocó en un magneto para que las perlas permanecieran en el fondo de los pozos y cuidadosamente se removió el contenido de los pozos, se retiró el magneto y se lavaron los pozos en agitación durante 30 segundos con 200 μL de buffer de lavado, se colocó el magneto y se descartó el buffer de lavado, se repitió el paso de lavado de los pozos
- Se añadieron 25 μL de anticuerpos de detección a cada pozo

- Se incubó la placa durante 1 h a temperatura ambiente, no se aspiró
- Se añadieron 25 μL de estraptavidina-ficoeritrina a cada pozo
- Se incubó la placa por 30 min a temperatura ambiente
- La placa se colocó en un magneto para que las perlas permanecieran en el fondo de los pozos y cuidadosamente se removió el contenido de los pozos, se retiró el magneto y se lavaron los pozos en agitación durante 30 segundos con 200 μL de buffer de lavado, se colocó el magneto y se descartó el buffer de lavado, se repitió el paso de lavado de los pozos
- Se añadieron 150 μL de Sheath Fluid a cada pozo
- Se leyeron las muestras en el aparato MagPix

Las citocinas que se midieron en los sobrenadantes de 9 donadores fueron TNF, MIP-1 β , el factor estimulador de colonias granulocito macrófago (GM-CSF), IP-10 e IL-12p40.

Microarreglo de proteínas

Después de 3 h de tratamiento, los sobrenadantes de cada condición fueron colectados y congelados a -80°C hasta ser ocupados para medir citocinas. Los ensayos fueron realizados utilizando el Quantibody® Human Inflammation Array 1 –Quantitative measurement of 10 Inflammation cytokines- Ray Biotech, Inc. de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente:

- Se sacó el chip de la envoltura de plástico y se le retiró el film que lo cubría, se dejó secar 2 h a temperatura ambiente para evitar la formación de colas de cometa

- Se reconstituyó la mezcla estándar de citocinas humanas (liofilizadas) añadiendo 1 mL de diluyente de la muestra al tubo. Se disolvió el polvo completamente mezclando cuidadosamente. Se realizaron las diluciones del estándar
- Se añadió 100 μ L de diluyente de muestra en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos
- Se decantó el buffer de cada pozo. Se añadió 100 μ L del estándar de citocinas o de las muestras a cada pozo. Se incubó el chip a temperatura ambiente durante 1 hora
- Se decantaron las muestras de cada pozo, se lavaron 5 veces con 200 μ L del buffer 1 de lavado 1X y 2 veces con 200 μ L de buffer 2 de lavado a temperatura ambiente en agitación. Se retiró el buffer de lavado en cada paso
- Se reconstituyó el cocktail de anticuerpo de detección añadiéndole 1.4 mL de diluyente de muestra al tubo. Se mezcló cuidadosamente
- Se añadió 80 μ L del cocktail de anticuerpo de detección a cada pozo, se incubaron a 4°C toda la noche
- Se decantaron las muestras de cada pozo, se lavaron 5 veces con 200 μ L del buffer 1 de lavado 1X y 2 veces con 200 μ L de buffer 2 de lavado a temperatura ambiente en agitación. Se retiró el buffer de lavado en cada paso
- Se añadió 1.4 mL de diluyente de muestra al Cy3-conjugado con estreptavidina, se mezcló cuidadosamente

- Se añadió 80 μ L de Cy3-conjugado con estreptavidina a cada pozo. Se cubrió el chip con aluminio para evitar la exposición a la luz y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora
- Se lavó 4 veces con el buffer 1 de lavado 1X
- Se colocó el chip en el tubo de lavado y añadió suficiente buffer 1 de lavado 1X para cubrir todo el chip y se agitó cuidadosamente a temperatura ambiente por 15 minutos. Se decantó el buffer 1 de lavado 1X y se lavó con el buffer 2 de lavado 1X, se agitó cuidadosamente a temperatura ambiente por 5 minutos
- Se decantó el buffer 2 de lavado 1X y se removieron las gotas de agua por centrifugación a 1,000 rpm por 3 minutos
- Se capturó la señal del chip en un scanner láser ScanArray 4000, los parámetros fueron: excitación 555nm, emisión 565 nm, resolución 10 μ m.
- Para el análisis cuantitativo de los datos se utilizó el Ray Biotech® Q Analyzer software.

Se analizaron los sobrenadantes de 9 donadores, las citocinas que se midieron fueron TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1 e IFN γ .

Citometría

La presencia de TLR4, CD14, CD16 y de TNF intracelular fue evaluada en monocitos de cinco donadores. Después de los tratamientos, se rasparon las cajas de Petri con gendarme y se colectaron los monocitos, se transfirieron a tubos para FACS y éstos se centrifugaron a 1500 rpm durante cinco min. Se decantaron los tubos y se lavaron las células con 1 mL de PBA y se repitió este paso. Para la detección de TNF, los monocitos fueron pre-tratados con Brefeldina A (Sigma). Los monocitos se resuspendieron en buffer de tinción y se incubaron con 5 μ L anti-TLR4 PECy7 (eBioscience, San Diego, CA, USA), 2.5 μ L anti-CD14 (APC) (eBioscience) y 7 μ L de anti-CD16 (FITC) (BD Pharmingen BD Biosciences, San Jose, CA, USA) durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente.

Los monocitos se lavaron con 1 mL de PBA, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se permeabilizaron con 500 μ L de Flow cytometry (FACS) permeabilizing solution BD Permz (BD Biosciences) durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se decantaron los tubos y se resuspendió en el remanente de solución permeabilizadora. Para la detección de TNF intracelular se agregó 10 μ L de anti-TNF (PE) (BDPharmingen BD Biosciences) durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente.

Los monocitos se lavaron con 1 mL de PBA , se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 400 μ L de paraformaldehído al 1% (Sigma). Para la adquisición de eventos se utilizó BD FACSDiva software (BD Bioscience) y el BD FACS Canto II flow cytometer (BD Bioscience). Para cada

condición, al menos 30,000 eventos fueron adquiridos basados en los parámetros tamaño y granularidad combinados con la positividad para CD14. La expresión de los receptores de superficie se midieron como Geometric mean fluorescence intensity (GMFI).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad PRISM versión 5.00 para Windows GraphPad (San Diego, CA, USA). Para el análisis de CD14 y CD16 se utilizó la prueba Mann-Whitney U . Todos los datos adicionales se sometieron a la prueba t de student parizada con 2 colas, donde una $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Modelo de tolerancia a endotoxina en monocitos de sangre periférica (MSP) humana

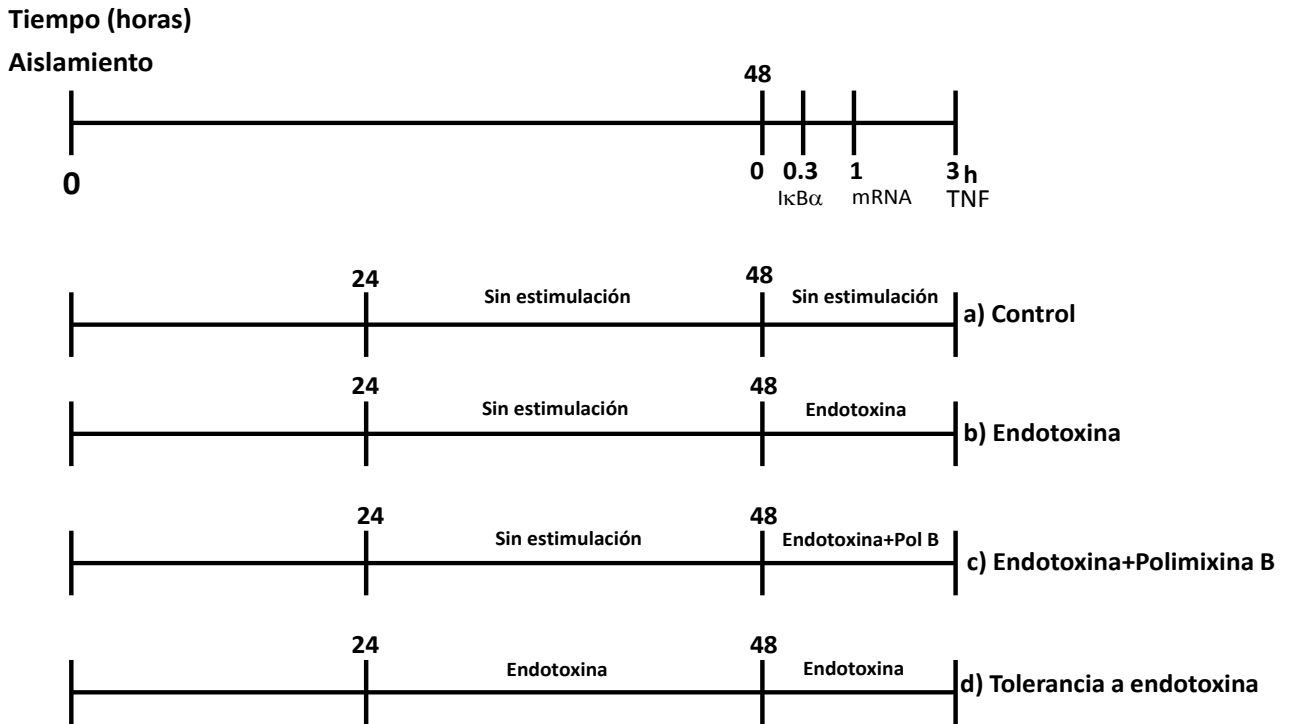


Figura 5. Modelo de tolerancia a endotoxina.

Los MSP fueron aislados a partir de concentrados leucocitarios de donadores sanos y fueron incubados durante una hora. Posteriormente, se removió el sobrenadante y las células no adherentes se descartaron; las células adherentes permanecieron en cultivo. Después de 24 h de incubación, las células adherentes a las cuales nos referiremos como monocitos, permanecieron sin ser estimuladas. Para generar la condición de tolerancia a endotoxina, los monocitos fueron pre-sensibilizados con 10ng/mL de endotoxina durante 24 h.

Después de 48 h de incubación, se removió el sobrenadante y las células fueron lavadas 2 veces con RPMI 1640 tibio, y las siguientes condiciones experimentales fueron establecidas:

- a) **Control:** monocitos sin estímulo
- b) **Endotoxina:** monocitos tratados sólo una vez con 10 ng/mL de endotoxina
- c) **Endotoxina+Pol B:** monocitos tratados con 10 ng/mL endotoxina+10 µg/mL polimixina B (Sigma, USA) como control negativo, ya que la polimixina B es un antibiótico que se une al lípido A de la endotoxina y por lo tanto bloquea su actividad.
- d) **Tolerancia a endotoxina:** monocitos pre-sensibilizados con 10 ng/mL de endotoxina 24 h antes de ser retados una segunda vez con 10 ng/mL de endotoxina.

En las cuatro condiciones experimentales después de 48 h de cultivo, se evaluó el contenido de IκBα después de 20 min, la expresión mRNA de TNF después de 60 min y la producción de la proteína de TNF después de 3 h de acuerdo a la **Figura 5**.

Validación del modelo de tolerancia a endotoxina

Con la finalidad de validar el modelo de tolerancia a endotoxina se realizaron los siguientes experimentos: mediante western blot se evaluó el contenido de I κ B α 20 min posterior a la estimulación, por PCR en tiempo real la expresión de TNF 60 min después de la estimulación y ya sea empleando un microarreglo de proteínas o una multi-elisa la producción de la proteína de TNF 3 h post estimulación.

Una de las citocinas más estudiadas en el fenómeno de tolerancia a endotoxina es el TNF. En este modelo el aumento en la expresión de TNF con un solo estímulo de endotoxina fue indicador de activación de la vía de señalización NF- κ B. En la condición de tolerancia el decremento en la producción de dicha citocina sugirió interferencia en dicha vía.

Microarreglo de proteínas

Validamos la tolerancia a endotoxina en sobrenadantes de monocitos después de 3 h de tratamiento midiendo las citocinas TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1, IFN γ en un microarreglo de proteínas **Figura 6**.

Del grupo de citocinas analizadas sólo TNF presentó cambios estadísticamente significativos. En los MSP control no se detectó producción de TNF. Encontramos una alta concentración de TNF (9135 pg/mL) en los MSP estimulados una vez con endotoxina, si consideramos este valor como el 100% de actividad, en los MSP tolerantes la producción fue de 57 pg/mL equivalente al 0.62% de actividad y en los MSP tratados con endotoxina+polimixina B fue de 76 pg/mL equivalente a 0.83% de actividad. Las diferencias estadísticas entre los MSP tratados una vez con endotoxina vs MSP tolerantes y endotoxina vs endotoxina+polimixina B fue de $p < 0.0001$ en ambos casos **Figura 7**.

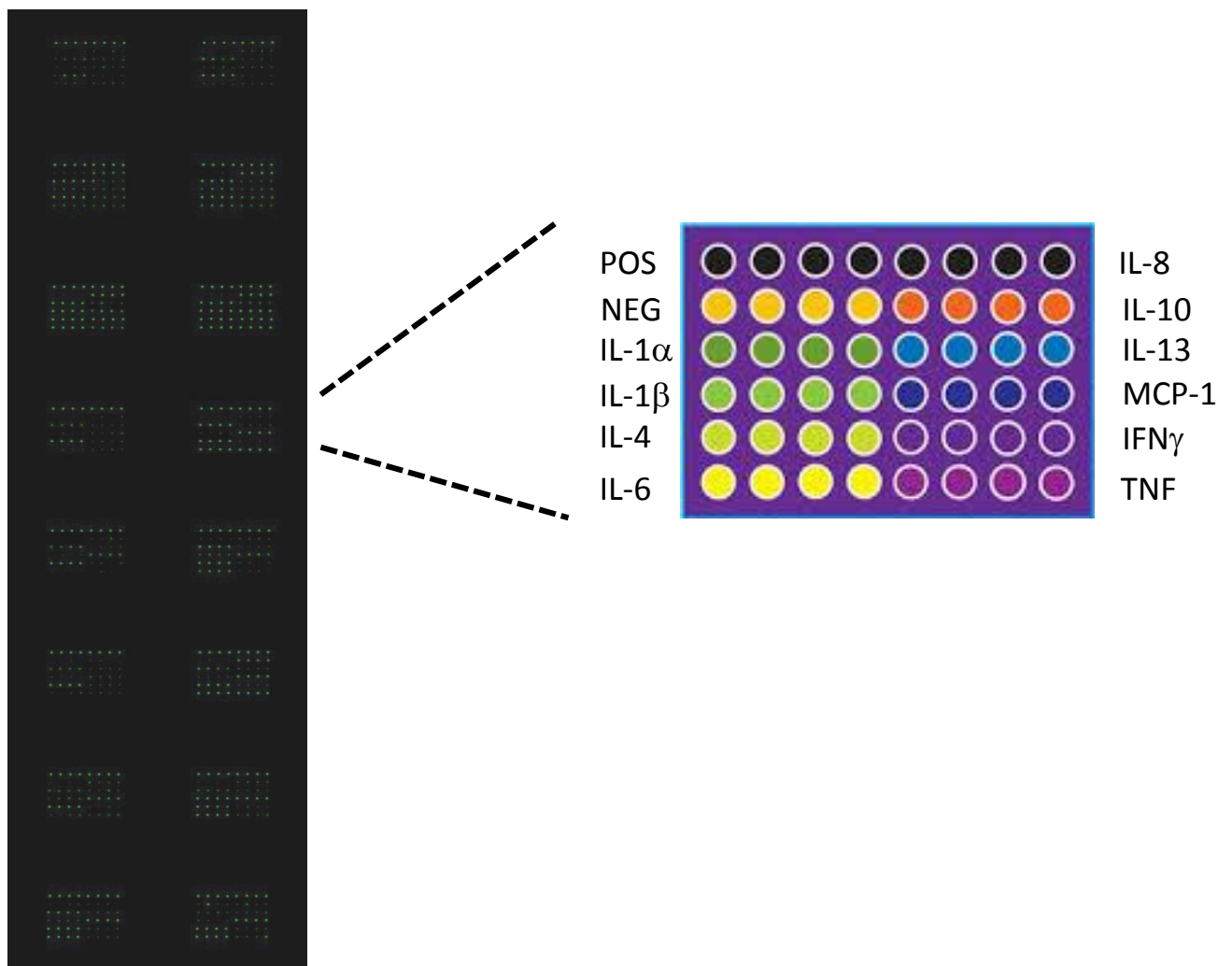


Figura 6. Imagen del microarreglo de proteínas. Cada laminilla contiene 16 pozos y cada pozo alberga el arreglo de anticuerpos de las citocinas TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, MCP-1, IFN γ . Cada anticuerpo está colocado por cuadruplicado.

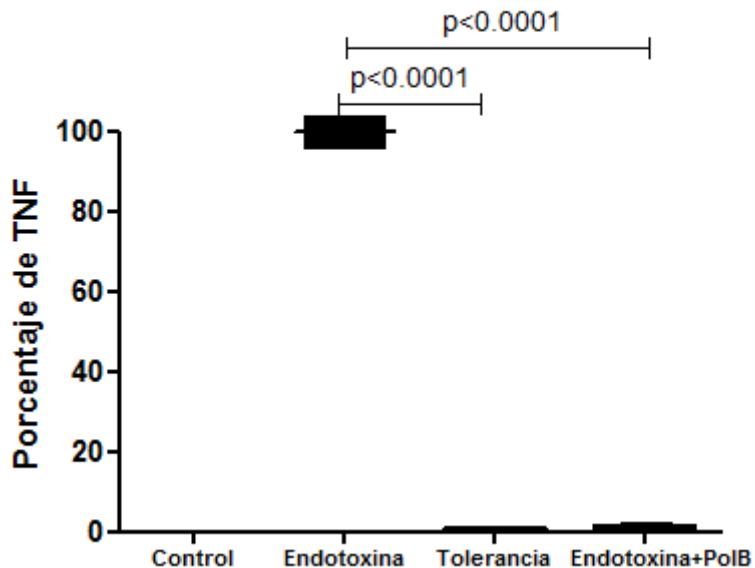


Figura 7. Microarreglo de proteínas. Normalización de la producción de TNF considerando el valor de la condición con un solo reto de endotoxina como el 100%. Los resultados corresponden a cinco experimentos independientes. Los whiskers representan los valores mínimos-máximos. Los valores de p se muestran sobre cada línea de comparación.

Con los datos obtenidos con el microarreglo de proteínas pudimos validar el modelo de tolerancia a endotoxina, principalmente con la expresión de TNF. En la condición de un solo estímulo de endotoxina, al haber una elevada concentración de TNF confirmamos que la vía de señalización NF- κ B estaba activa, caso contrario para la condición de tolerancia donde la expresión de TNF fue baja por lo que ésta vía de señalización resulto alterada.

Multi-elisa

Debido a que en el ensayo anterior TNF fue la única citocina que presentó una regulación en el modelo de tolerancia, decidimos explorar la regulación de las siguientes citocinas MIP-1 β , GM-CSF, IP-10 e IL-12p40 incluyendo a TNF en sobrenadantes de monocitos después de 3 h de tratamiento empleando una técnica más sensible (multi-elisa).

En este ensayo el promedio de la concentración de TNF en las células control no estimuladas fue de 296 pg/mL. Encontramos una alta producción de TNF en los MSP estimulados una sola vez con endotoxina (21,024 pg/mL), si consideramos este valor como el 100% de actividad, en los MSP tolerantes la producción fue de 4,224 pg/mL equivalente al 20% de actividad y en los MSP tratados con endotoxina+polimixina B fue de 3,026 pg/mL equivalente a 14% de actividad. Las diferencias estadísticas entre endotoxina vs MSP tolerantes y endotoxina vs endotoxina+polimixina B fue de $p < 0.0001$ en ambos casos **Figura 8**.

En este ensayo de multi-elisa confirmamos los resultados de la expresión de TNF que fueron similares a los obtenidos con el microarreglo de proteínas. La elevada producción de TNF fue un indicador de la activación de la vía de señalización NF- κ B en la condición de un solo estímulo con endotoxina y en la condición de tolerancia la baja expresión de TNF mostró la alteración en dicha vía de señalización. Estos datos también nos permitieron validar el modelo de tolerancia a endotoxina.

En el control sin estímulo analizado en el microarreglo de proteínas no detectó TNF contrario al control sin estímulo examinado en la multi-elisa en donde sí se detectó una expresión basal de dicha citocina, por lo que consideramos la multi-elisa como un ensayo más sensible para medir las citocinas.

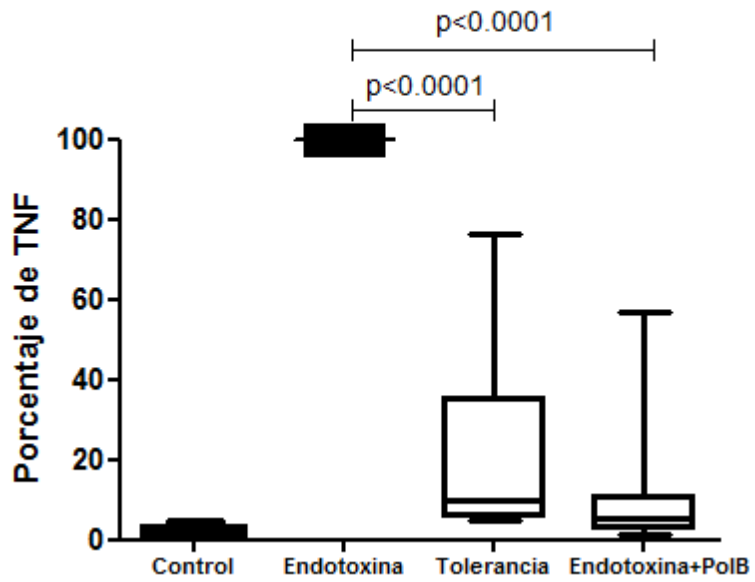


Figura 8. Multi-elisa. Normalización de la producción de TNF considerando el valor de la condición con un solo reto de endotoxina como el 100%. Los resultados corresponden a nueve experimentos independientes. Los whiskers representan los valores mínimos-máximos. Los valores de p se muestran sobre cada línea de comparación.

Interesantemente, MIP-1 β otra citocina inflamatoria incluida en la multi-elisa, mostró un comportamiento similar al de TNF. El promedio de producción de MIP-1 β en las células control fue 435 pg/mL. La concentración de MIP-1 β en los MSP estimulados una única vez con endotoxina fue de 19,672 pg/mL; si consideramos éste valor como el 100% de actividad, los 7,418 pg/mL de MIP-1 β en los MSP tolerantes equivalen al 38% de actividad y los 4,868 pg/mL de MIP-1 β en los MSP tratados con endotoxina+polimixina B fue equivalente a 25% de actividad. Las diferencias estadísticas entre las condiciones endotoxina vs MSP tolerantes y endotoxina vs endotoxina+polimixina B fue de $p < 0.0001$ en ambos casos **Figura 9**.

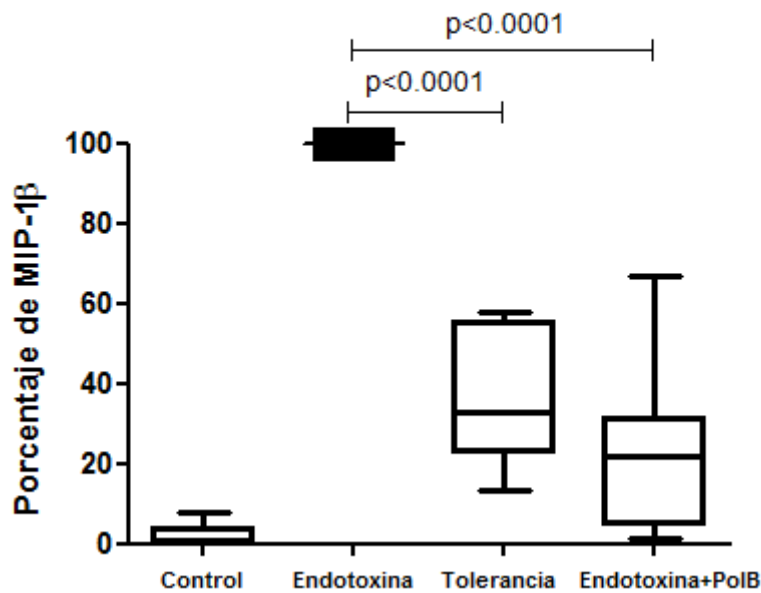


Figura 9. Multi-elisa. Normalización de la producción de MIP-1 β considerando el valor de la condición con un solo reto de endotoxina como el 100%. Los resultados corresponden a nueve experimentos independientes. Los whiskers representan los valores mínimos-máximos. Los valores de p se muestran sobre cada línea de comparación.

PCR en tiempo real

Una vez obtenidas las concentraciones proteicas de TNF que validaran nuestro modelo de tolerancia a endotoxina, se consideró también estudiar la expresión del mRNA de TNF para observar la regulación de esta citocina en la vía de señalización NF- κ B.

En los MSP de nuestro modelo, encontramos una elevada producción de mRNA de TNF en respuesta a un solo estímulo con endotoxina y una disminución significativa de dicha citocina en la condición de tolerancia. La expresión relativa de TNF se incrementó hasta 150 veces en respuesta a un solo estímulo con endotoxina. En tanto la expresión de TNF incrementó ligeramente en los MSP tolerantes (1.05 veces) y en los MSP tratados con polimixina B (cinco veces) con respecto a los MSP no estimulados **Figura 7**.

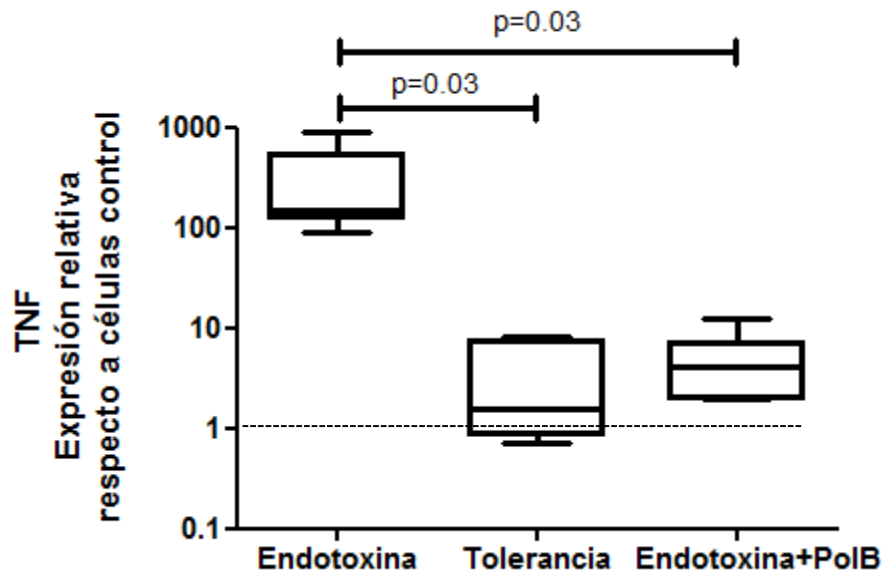


Figura 10. Expresión relativa del mRNA de TNF normalizada con respecto a las células control. Los resultados corresponden a nueve experimentos independientes. Los whiskers representan los valores mínimos-máximos. Los valores de p se muestran sobre cada línea de comparación.

Degradación de I κ B α

Considerando los resultados anteriormente mencionados donde hay una clara regulación de la citocina TNF en el modelo de tolerancia a endotoxina, decidimos explorar si la vía de señalización NF- κ B se activaba. Un indicador de la activación de la vía de NF- κ B es la degradación de I κ B α , ya que implica que I κ B α es ubiquitinizada, fosforilada y destruida en el proteasoma. En consecuencia NF- κ B queda libre para translocarse al núcleo y puede unirse a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco.

Estudiamos la degradación de I κ B α en el modelo de tolerancia a endotoxina con la técnica de western-blot **Figura 11**. En los MSP de los donadores incluidos en este estudio encontramos diferentes grados de degradación de I κ B α en la condición de un solo estímulo con endotoxina. En la Figura 11 mostramos un donador que presentó una clara degradación de I κ B α en respuesta a la endotoxina (b), sin embargo ésta degradación fue diferente entre todos los donadores.

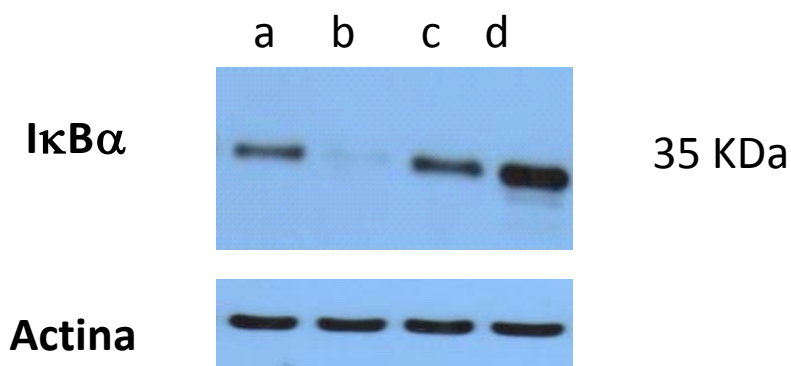


Figura 11. Western-blot representativo de la degradación de I κ B α en el modelo de tolerancia a endotoxina. Las condiciones son carril a) control, b) endotoxina, c) endotoxina + polimixina B y d) tolerancia. La concentración relativa de I κ B α fue normalizada con actina.

En nuestro modelo encontramos que la cantidad de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en MSP tolerantes fue 2.6 veces más alto que en las células control y 3.3 veces más alto que en los MSP tratados una única vez con endotoxina **Figura 12**. Estos resultados confirmaron que en la condición de tolerancia la vía de NF- κ B fue alterada.

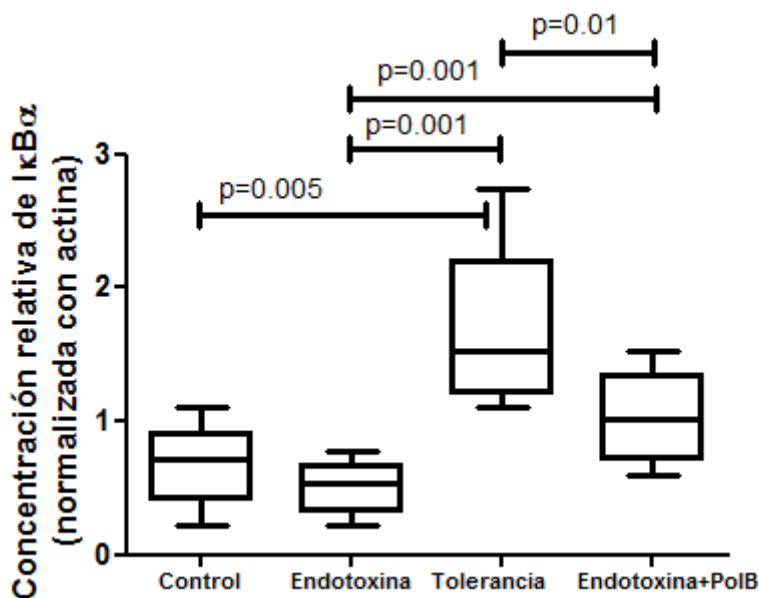


Figura 12. Concentración relativa de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ normalizada con actina. Los resultados corresponden a nueve experimentos independientes. Los whiskers representan los valores mínimos-máximos. Los valores de p se muestran sobre cada línea de comparación.

Expresión de la proteína MyD88s en MSP tolerantes a endotoxina

Una vez establecido nuestro modelo de tolerancia a endotoxina, estuvimos interesados en estudiar la contribución de MyD88s (regulador negativo de la vía de señalización TLR4-NF- κ B). Cantidades semi cuantitativas de proteína de MyD88 y MyD88s fueron estudiadas por western blot **Figura 13**; y se estableció la prevalencia cuantitativa de una sobre la otra utilizando el cociente MyD88/MyD88s en todas las condiciones experimentales.

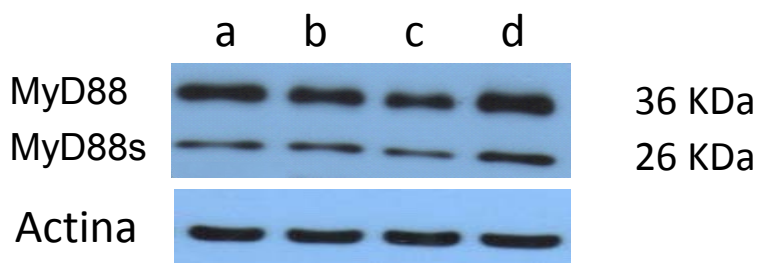


Figura 13. Western-blot representativo de la expresión proteica de MyD88 y MyD88s en el modelo de tolerancia a endotoxina. Las condiciones son carril a) control, b) endotoxina, c) endotoxina + polimixina B y d) tolerancia. La concentración relativa de ambas proteínas fue normalizada con actina.

La **Figura 14** muestra que en nuestro modelo de tolerancia a endotoxina no hubo diferencias significativas entre las células control, tratadas una vez con endotoxina y las tolerantes a endotoxina.

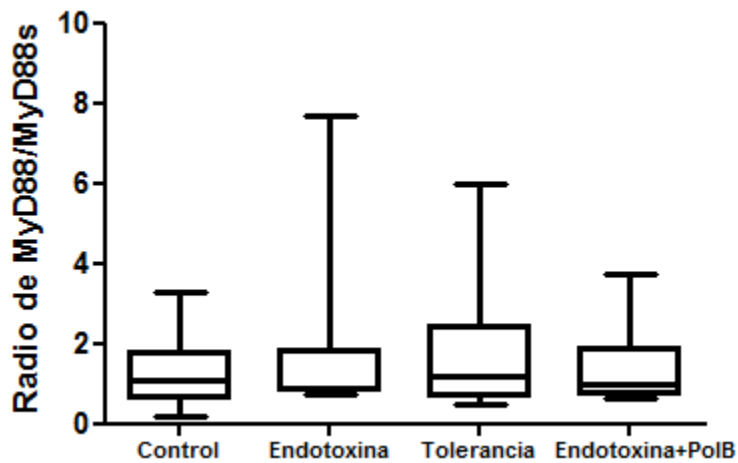


Figura 14. Cociente de los valores densitométricos de MyD88/MyD88s . Los resultados corresponden a nueve experimentos independientes. Los whiskers representan los valores mínimos-máximos. Los valores de p se muestran sobre cada línea de comparación.

IP-10 como indicador de la vía de señalización MyD88 independiente

Debido a que el comportamiento de la vía MyD88 dependiente en nuestro modelo de tolerancia a endotoxina sugería alteraciones de la vía de señalización mediada por NF- κ B, decidimos explorar el comportamiento de la vía MyD88 independiente ocupando como indicador la concentración de IP-10 (una citocina típica regulada por IRF-3) **Figura 15**. Notamos un incremento en la producción de IP-10 en las células tratadas una vez con endotoxina (7,754 pg/mL), si consideramos este valor como el 100% de actividad, los 16,779 pg/mL de IP-10 en los MSP tolerantes fue equivalente a 216% de actividad. Nuestros datos revelan una depresión de la vía MyD88 dependiente, junto con una estimulación de la vía MyD88 independiente en los MSP tolerantes a endotoxina. El fenómeno de tolerancia parecería implicar una regulación dinámica entre ambas vías de señalización.

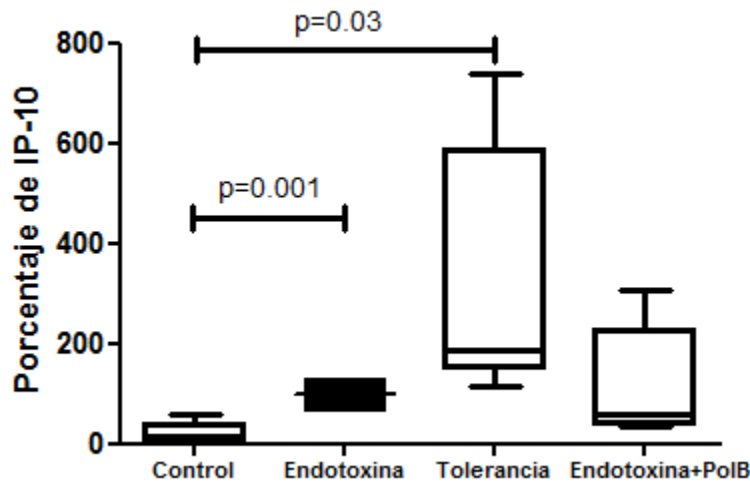


Figura 15. Multi-elisa. Normalización de la producción de IP-10 considerando el valor de la condición con un solo reto de endotoxina como el 100%. Los resultados corresponden a nueve experimentos independientes. Los whiskers representan los valores mínimos-máximos. Los valores de p se muestran sobre cada línea de comparación.

Efecto de la tolerancia a endotoxina en la expresión de receptores de superficie

Dado que en nuestro modelo de tolerancia a endotoxina empleamos MSP, fue de nuestro interés observar si existía un fenotipo de monocitos asociado con la tolerancia. En monocitos de cinco donadores sanos, se analizó la expresión tanto de CD14 como de CD16 mediante inmuno fluorescencia y se realizó una determinación convencional que incluyó sólo dos subpoblaciones de monocitos: “clásicos” CD14+CD16- y “no clásicos” CD14+CD16+.

En los monocitos control (sin estímulo) después de 48 h de incubación, los porcentajes de las dos subpoblaciones fueron CD14+CD16- 67.6% y CD14+CD16+ 25.3%. Tomando en cuenta a las células control como el 100%, encontramos que la subpoblación CD14+CD16+ disminuyó al 38% después de un solo estímulo con endotoxina, mientras que esta misma subpoblación incrementó a un 148% en la condición de tolerancia a endotoxina (valores en color rojo) **Figura 13**. Nuestro control de polimixina B mostró una distribución de ésta subpoblación similar a las células control **Figura 13**. Por el contrario, la subpoblación CD14+CD16- sólo presentó una ligera disminución al 84% en el control de polimixina B, el resto de las condiciones experimentales no presentaron cambios.

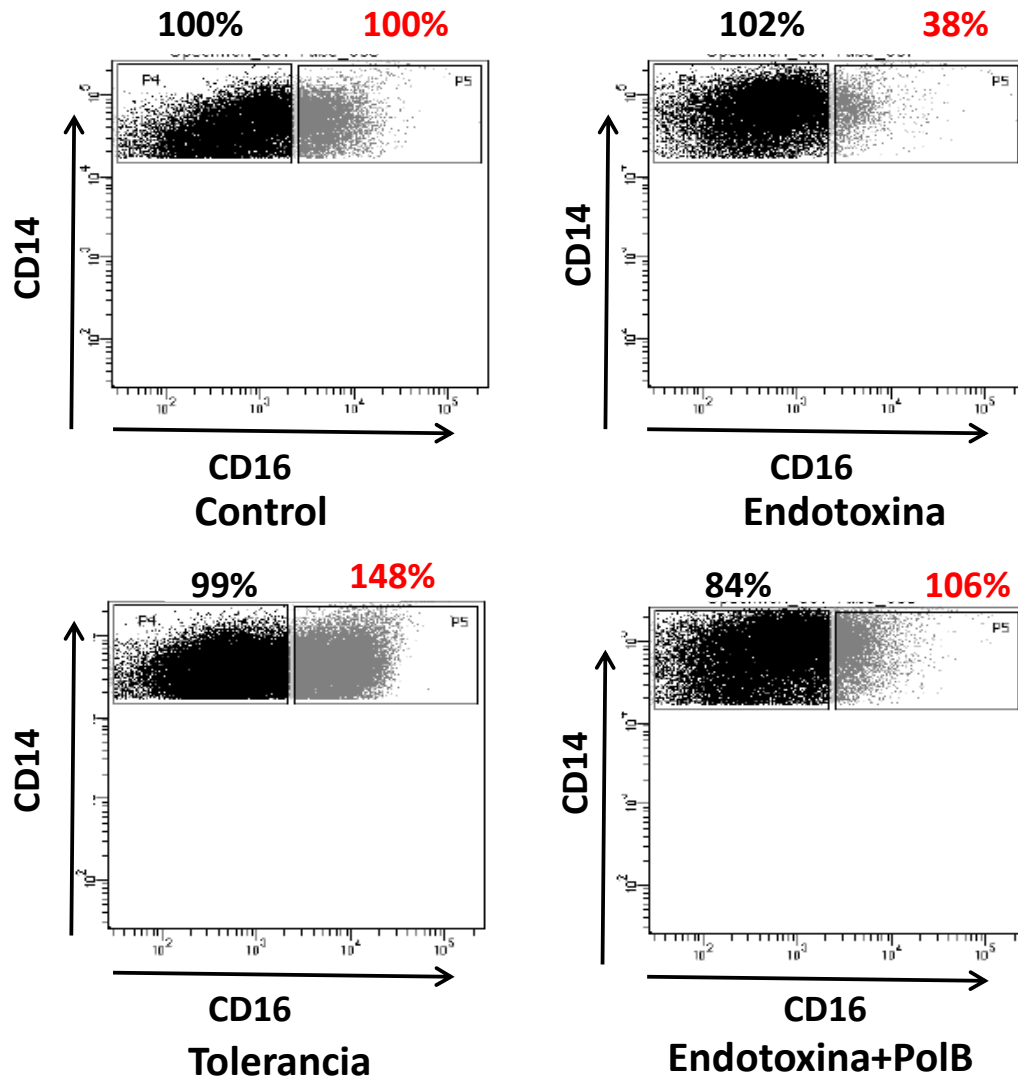


Figura 16. Experimento representativo del efecto de la tolerancia a endotoxina en los porcentajes de las dos subpoblaciones de MSP CD14+CD16- (color negro) y CD14+CD16+ (color rojo). Después del tratamiento, las células fueron teñidas con CD14 (APC) y con CD16 (FITC), y el porcentaje de ambas subpoblaciones fue determinado por análisis de citometría de flujo. Los resultados corresponden a cinco experimentos independientes.

En la subpoblación CD14+CD16+ la tolerancia a endotoxina fue confirmada por medio de la determinación de TLR4 en la superficie y de TNF intracelular. Tomando en cuenta la condición de un solo estímulo de endotoxina como el 100%, la expresión normalizada de TLR4 disminuyó a 26% en las células control, a 7% en las tolerantes y 24% en la condición endotoxina + polimixina B. Las diferencias estadísticas entre las condiciones control vs endotoxina, endotoxina vs MSP tolerantes y endotoxina vs endotoxina+polimixina B fue de $p=0.0005$, $p=0.02$ y $p=0.0006$ respectivamente **Figura 14 a**. Los porcentajes de TNF normalizado con un único estímulo con endotoxina fueron 11% en las células control, 3% en los MSP tolerantes y 10% en la condición endotoxina + polimixina B. Las diferencias estadísticas entre las condiciones control vs endotoxina, endotoxina vs MSP tolerantes y endotoxina vs endotoxina+polimixina B fue de $p=0.0002$, $p=0.02$ y $p=0.0001$ respectivamente **Figura 14 b**. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de TLR4 y la producción de TNF en la subpoblación CD14+CD16- después de un solo estímulo con endotoxina o en la condición de tolerancia a endotoxina **Figura 14 c y d**.

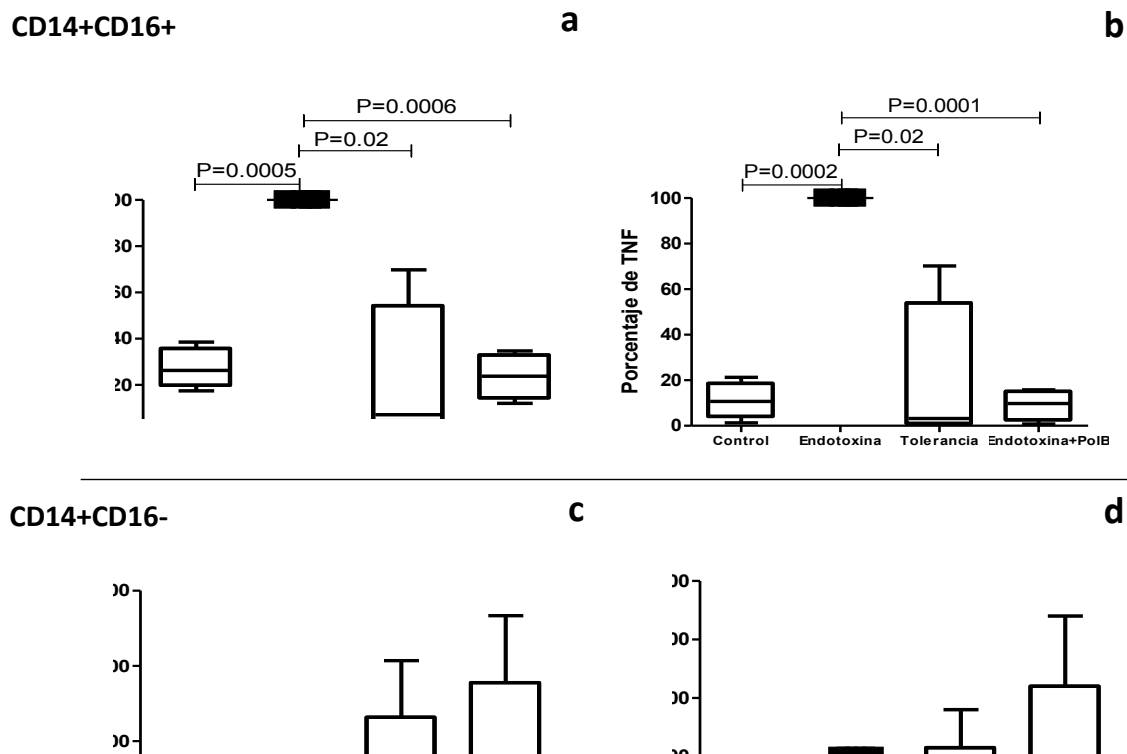


Figura 17. Efecto de la tolerancia a endotoxina en la expresión de TLR4 en superficie y la producción intracelular de TNF en MSP. Después del tratamiento, las células fueron teñidas a nivel de superficie con TLR4 (PECy7) e intracelularmente con TNF (PE), y la expresión de éstas proteínas fue determinado por análisis con citometría de flujo. Los resultados corresponden a cinco experimentos independientes.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La tolerancia a endotoxina es un fenómeno capaz de alterar la respuesta del monocito ante un segundo reto. Uno de los diversos mecanismos que podrían explicar la tolerancia a endotoxina, involucra la modificación de las vías de señalización mediadas por TLRs. La regulación de receptores clave como CD14 y TLR4 en monocitos humanos debido por ejemplo a su internalización, han sido asociados a la respuesta ante la endotoxina (Medvedev et al., 2002; Muzio et al., 2000).

Sin embargo, no existe evidencia suficiente para asegurar que la tolerancia a endotoxina éste basada únicamente en un mecanismo de regulación decreciente de los receptores de superficie (Fan & Cook, 2004).

Convencionalmente, los monocitos humanos se pueden separar en dos categorías, basadas en la expresión de marcadores de superficie. El 90 por ciento de los monocitos humanos expresan CD14 y no CD16 y son denominados “monocitos clásicos”; los restantes son células CD14+CD16+ conocidas como “monocitos no clásicos” (Mosser & Edwards, 2008). Adicionalmente, el Comité de Nomenclatura de la Unión de Sociedades Inmunológicas (NC-IUIS) define tres tipos de monocitos: monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻); monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y monocitos no clásicos (CD14⁺CD16⁺) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Dado que nuestro modelo de tolerancia a endotoxina fue realizado con monocitos, este demandó un gran volumen de sangre para que fuera suficiente poder ensayar todas las condiciones experimentales y efectuar una determinación convencional que incluyó las subpoblaciones de monocitos: “clásicos” CD14⁺CD16⁻ y “no clásicos” CD14⁺CD16⁺.

La población de monocitos en nuestro modelo de tolerancia se compuso 67.6% de CD14+CD16- y 25.3% de CD14+CD16+ en la condición control (sin estímulo), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

Se ha referido que los monocitos no clásicos CD14+CD16+ es la subpoblación que produce altos niveles de TNF (Belge et al., 2002). Nosotros lo corroboramos, ya que en la condición de un solo estímulo con endotoxina detectamos altos niveles de TNF intracelular y paralelamente encontramos una incrementada expresión de TLR4 en este fenotipo de monocitos.

Si consideramos que cada subpoblación de monocitos posee un fenotipo funcional distinto, la expansión selectiva de una subpoblación particular podría estar involucrada en la respuesta a endotoxina y en el desarrollo de la tolerancia. En el presente trabajo reportamos que la condición de tolerancia está asociada a un enriquecimiento del fenotipo CD14+CD16+, la cual ante un segundo estímulo con endotoxina disminuye su producción de TNF. Se requieren estudios adicionales para explicar si el enriquecimiento se debe a una proliferación del fenotipo CD14+CD16+ o está asociado a una diferenciación de la subpoblación CD14+CD16-. Una estrategia sería realizar un curso temporal para analizar el efecto de la endotoxina sobre el enriquecimiento de la subpoblación CD14+CD16+.

Resultaría interesante considerar un control con un estímulo de endotoxina a las 24 h, para descartar que el TNF inducido en dicha condición pudiera estar implicado en el enriquecimiento de la subpoblación CD14+CD16+. El uso de distintos marcadores podría distinguir la implicación de otras poblaciones celulares en el fenómeno de tolerancia, como macrófagos tipo M1 y M2.

Existe evidencia indirecta de la participación de monocitos CD14+CD16+ en la tolerancia a endotoxina en estudios de subpoblaciones monocíticas en sepsis. Esta inflamación generalizada causada por una infección severa se caracteriza por una fase pro-inflamatoria seguida por una respuesta anti-inflamatoria que da como resultado un estado inmunosupresivo. Los pacientes con sepsis desarrollan alteraciones funcionales en los monocitos, incluyendo la reducción de la expresión de citocinas pro-inflamatorias asociadas a un incremento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias (Cavaillon et al., 2005).

La subpoblación de monocitos “no clásicos” en pacientes con sepsis no responde a la endotoxina, debido a diversos mecanismos que regulan negativamente la señalización asociada a los TLRs (Biswas et al., 2009, Cavaillon et al., 2005). Inclusive, diversos estudios sugieren que la subpoblación CD14+CD16+ es la responsable del estado de tolerancia a endotoxina en sepsis (Adib-Conquy et al., 2006, Blumenstein et al., 1997).

En nuestro modelo de monocitos tolerantes encontramos que la subpoblación CD14+CD16+ está asociada a la tolerancia a endotoxina, caracterizada por baja producción intracelular de TNF y expresión disminuida del receptor TLR4 en respuesta a un segundo estímulo de endotoxina.

Interesantemente, en los monocitos de nuestros donadores, hallamos diferentes niveles de degradación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en respuesta a un solo estímulo de endotoxina. Por otro lado, en los monocitos tolerantes a endotoxina, no encontramos cambios significativos en la proporción de MyD88/MyD88s comparándola con las condiciones de un solo estímulo y sin estímulo. Esto sugiere que MyD88s no es relevante en la inducción del fenómeno de tolerancia a endotoxina.

Shalova et al., reportaron en monocitos de pacientes con sepsis por bacterias Gram negativas una proporción incrementada de CD14+CD16+ asociada a una sobre-expresión de genes dependientes de la vía TRIF; ellos encontraron aumento en la producción de IFN- β , RANTES e IP-10 (Shalova et al., 2012). Adicionalmente, los autores mostraron evidencia del rol de CD16 en la inducción de reguladores negativos de la vía TLR4/MyD88, como IRAK-M y el receptor antagonista de interleucina 1 (IL1-RA).

Tomamos en cuenta este antecedente, cuando analizamos la producción de IP-10 en nuestros monocitos tolerantes a endotoxina. En ellos encontramos una elevada concentración de IP-10, lo que sugiere una preferencia de la vía independiente de MyD88 en la respuesta deficiente a endotoxina en nuestro fenotipo tolerante.

No podemos ignorar un reporte previo de un modelo de tolerancia a endotoxina en monocitos donde se reportó el incremento de citocinas dependientes de la vía MyD88: el oncogén relacionado al crecimiento α (GRO- α), MCP-1 e IL-8 (Kaufmann et al., 2000). Sin embargo, Kaufmann et al., omitió mencionar cual población estaba involucrada en el estado de tolerancia. A pesar de estos datos, su modelo tolerante así como el nuestro mostró una baja producción de TNF y MIP-1 β ante un segundo estímulo con endotoxina.

Definitivamente son necesarios más estudios enfocados en la expresión de CD16 y otros marcadores asociados para distinguir los fenotipos clásico/no clásico e intermedio, y aclarar cuál es la función de cada subtipo.

Sería interesante explorar la posibilidad de ocupar a la subpoblación CD14+CD16+ como factor de pronóstico en patologías como la sepsis.

BIBLIOGRAFÍA

- Adib-Conquy M., Adrie C., Fitting C., Gattolliat O., Beyaert R., Cavaillon J. M. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med* 2006; 34: 2377-2385.
- Beeson P.B., Development of tolerance to typhoid bacterial pyrogen and its abolition by reticulo-endothelial blockade. *Proc Soc Exp Biol Med* 1946; 61: 248-250.
- Belge K.U., Dayyani F., Horelt A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B., Espevik T., and Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002; 168: 3536-3542.
- Beutler B., Tkacenko V., Milsark I., Krochin N., Cerami A. Effect of gamma interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. Reversal of the lpsd (endotoxin resistance) phenotype. *J Exp Med* 1986; 164: 1791-1796.
- Beutler, B. Rietschel E. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 169-176.
- Biswas S.K., Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 2009; 30: 475-487.
- Blumenstein M, Boekstegers P, Fraunberger P, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW, and Fingerle-Rowson G. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 1997; 8: 73-75.
- Brock, D. Th. Robert Koch. *A Life in Medicine and Bacteriology* A Life in Medicine and Bacteriology: In: *Scientific Revolutionaries: A Biographical Series*. Science Tech. Publishers, Madison WI and J. Springer, Berlin, hard cover, 48 – DM, 364 pp.
- Cavaillon J.M., Adrie C., Fitting C., and Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 2005; 11: 311-320.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999; 274(16):10689-92.
- Fan H. ,Cook J.A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 71-84.

- Fingerle G., Pforte A., Passlick B., Blumenstein M., Ströbel M., Ziegler-Heitbrock H. W. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993; 82: 3170-3176.
- Flach R., Majetschak M., Heukamp T., Jennissen V., Flohé S., Bürgermann J., Obertacke U., Schade FU. Relation of ex vivo stimulated blood cytokine synthesis to post-traumatic sepsis. *Cytokine* 1999; 11: 173-178.
- Foster S. L., Medzhitov R., Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 2009; 130(1): 7-15.
- Freedman H.H. Passive transfer of tolerance to pyrogenicity of bacterial endotoxin. *J Exp Med* 1960; 111: 453-463.
- Greisman S. E., Carozza F.M. and Hills J.D. Mechanisms of endotoxin tolerance. I. Relationship between tolerance and reticulo-endothelial system phagocytic activity in the rabbit. *J Exp Med* 1963; 117: 663-674.
- Greisman S. E., Hornick R.B., Wagner H.N. Jr, Woodward W.E., Woodward T.E. The role of endotoxin during typhoid fever and tularemia in man. *J Clin Invest* 1969; 48: 613-629.
- Haupt W., Fritzsche H., Hohenberger W., Zirngibl H. Selective cytokine release induced by serum and separated plasma from septic patients. *Eur J Surg* 1996; 162: 769-776.
- Heyman A., Beeson P.B. Influence of various disease states upon the febrile response to intravenous injection of typhoid bacterial pyrogen; with particular reference to malaria and cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med* 1949; 34: 1400-1403.
- Hirohashi N., Morrison D. C. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immunol* 1996; 64: 1011-1015.
- Horng T., Barton G. M., Flavell R. A., Medzhitov R., The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420 (6913): 329-333.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999;162(7):3749-52.
- Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol.* 2002 ;12(6):467-471.

- Janssens S., Burns K., Vercammen E., Tschopp J., Beyaert R. MyD88(S), a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappa B- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett* 2003; 548(1-3): 103-107.
- Jefferies C. A., Doyle S., Brunner C., Dunne A., Brint E., Wietek C., Walch E., Wirth T., O'Neill L. A. J., Bruton's tyrosine kinase is a toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappa B activation by toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2003; 278(28): 26258-26264.
- Karin M., The NF- κ B activation pathway: Its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J Sci Am* 1998; 4(SUPPL. 1).
- Kaufmann A., Gemsa D., Sprenger H. Differential desensitization of lipopolysaccharide-inducible chemokine gene expression in human monocytes and macrophages. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1562-1567.
- Kawasaki T., Ogata M., Kawasaki C., Tomihisa T., Okamoto K., Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg* 2001; 92: 1322-1326.
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*. 2002;110(2):191-202.
- Kobayashi K. S., Flavell R. A. Shielding the double-edged sword Negative regulation of the innate immune system. *J Leukoc Biol* 2004; 75(3):428-433
- Latour, B. Pasteur-Une Science, Un Style, Un Siècle (Librairie Académique, Perrin, Paris, 1994).
- Li X. X., Qin J. Z., Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med* 2005; 83(4): 258-266.
- Liew F. Y., Xu D. M., Brint E. K. and O'Neill L. A. J. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;5(6): 446-458.
- Manthey CL, Perera PY, Henricson BE, Hamilton TA, Qureshi N, Vogel SN. Endotoxin-induced early gene expression in C3H/HeJ (Lpsd) macrophages. *J Immunol*. 1994; 153(6):2653-63
- Marie C., Fittin C., Muret J., Payen D., Cavaillon J.M. Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis?. *Cytokine* 2000; 12: 55-61.

- McCabe W.R. Endotoxin Tolerance II. It's occurrence in patients with pyelonephritis. *J Clin Invest* 1963; 42: 618-625.
- Medvedev A.E., Lentschat A., Wahl L.M., Golenbock D.T., and Vogel S.N. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol* 2002; 169: 5209-5216.
- Morrison, D.C. and Ryan, J.L. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med* 1987, 38: 417-432.
- Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev Immunol* 2008; 8: 958-969.
- Munoz C., Carlet J., Fitting C., Misset B., Blériot J. P., Cavaillon J. M. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1747-1754.
- Muñoz C., Misset B., Fitting C., Blériot J.P., Carlet J., Cavaillon J.M. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur J Immunol* 1991, 21: 2177-2184.
- Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., and Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164: 5998-6004.
- Neva F.A., Morgan H.R. Tolerance to the action of endotoxins of enteric bacilli in patients convalescent from typhoid and paratyphoid fevers. *J Lab Clin Med* 1950; 35: 911-922.
- O'Neill L. A. J., TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol* 2004; 25(12): 687-693.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74(7):2527-34.
- Poltorak A., Ricciardi-Castagnoli P., Citterio S., Beutler B., Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2163-2167.

- Rietschel, E.T. and H Brade. Bacterial Endotoxins. *Sci. Am.* 1992; 267: 26-33.
- Rubenstein M., Mulholland J. H., Jeffery G.M., Wolf S.M. Malaria induced endotoxin tolerance. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 118: 283-287.
- Sanchez-Cantu I., Rode H. N., Christou NV. Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. *Arch Surg* 1989; 124: 1432-1436.
- Schumann R.R., Pfeil D., Lamping N., Kirschning C., Scherzinger G., Schlag P. Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14. *Blood* 1996; 87: 2805-2814.
- Setoguchi M., Nasu N., Yoshida S., Higuchi Y., Akizuki S., Yamamoto S. Mouse and human CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) primary structure deduced from cDNA clones. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1008 (2): 213-22.
- Shahbazian L. M., Jeevanandam M., Petersen S. R. Release of proinflammatory cytokines by mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells from critically ill multiple-trauma victims. *Metabolism* 1999; 48: 1397-1401.
- Shalova I.N., Kajiji T., Lim J.Y., Gómez-Piña V., Fernández-Ruiz I., Arnalich F., Iau P.T., López-Collazo E., Wong S.C., Biswas S.K. CD16 regulates TRIF-dependent TLR4 response in human monocytes and their subsets. *J Immunol* 2012; 188: 3584-3593.
- Shinji H., Akagawa K., Yoshida T. LPS induces selective translocation of protein kinase C-beta in LPS-responsive mouse macrophages, but not in LPS-nonresponsive mouse macrophages. *J Immunol* 1994; 153: 5760-5771.
- Takasuka N., Tokunaga T., Akagawa K. S. Preexposure of macrophages to low doses of lipopolysaccharide inhibits the expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA but not of IL-1 beta mRNA. *J Immunol* 1991; 146: 3824-3830.
- Taylor A. H., Heavner G., Nedelman M., Sherris D., Brunt E., Knight D. Lipopolysaccharide (LPS) neutralizing peptides reveal a lipid A binding site of LPS binding protein. *J Biol Chem* 1995; 270: 17934-17938.
- Ulevitch R., Tobias P. Receptor dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 437-457.

- Van Deuren M., Van der Ven-Jongekrijg J., Demacker P.N., Bartelink A. K., van Dalen R., Sauerwein R.W., Gallati H., Vannice J.L., Van der Meer J.W. Differential expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of meningococcal infections. *J Infect Dis* 1994; 169: 157-161.
- West M. A., Li M. H., Seatter S. C., Bubrick M. P. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. *J Trauma* 1994; 37: 82-90.
- West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med*. 2002; 30(1 Supp):S64-S73.
- Wolk K., Docke W. D., von Baehr V., Volk H. D., Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 2000; 96: 218-223.
- Wong K.L., Yeap W.H., Tai J.J., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 2012; 53(1-3):41-57.
- Wurfel M.M., Hailman E., Wright S.D. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med* 1995; 181: 1743-1754.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, and Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116: e74-e80.
- Ziegler-Heitbrock L., The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 584-592.

ANEXO 1

CONTROL MOLECULAR DE LA INFLAMACIÓN: REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL*

Aimée Domínguez Nieto¹, Alejandro Zentella Dehesa² y
Juan Raymundo Velázquez Rodríguez¹

RESUMEN

El origen e intensidad de la mayoría de los padecimientos inflamatorios es causado cuando existe la producción descontrolada de mediadores que regulan dichos procesos. Partiendo de la necesidad de entender estas patologías, se ha identificado a la familia de receptores tipo Toll que detectan patrones moleculares asociados a daño (DAMP's por sus siglas en inglés); este reconocimiento desencadena procesos intracelulares que finalizan en la expresión de mediadores inflamatorios. La gran interrogante actual es cómo son controlados estos mecanismos y qué disfunciones conducen a estados de enfermedad; en la presente revisión abordaremos cómo son activadas y reguladas las vías de señalización de esta familia de receptores.

PALABRAS CLAVE: Inmunidad innata, patrones moleculares asociados a patógenos, alarminas, señalización, proteínas acopladoras.

ABSTRACT

The origin and intensity of most inflammatory illnesses is caused by the unbalanced production of mediators that regulate these processes. In an attempt to better understand these pathologies, a Toll like receptors family that detect molecular patterns associated to danger (DAMP's) has been identified; recognition of these signals by these family of receptors starts intracellular processes that lead to the expression of inflammatory mediators. The current question is to understand how these mechanisms are controlled and what are the dysfunctions that lead to disease states; this review cover how are activated and regulated the signaling pathways of these receptors family.

KEY WORDS: Innate immunity, molecular patterns associated to pathogens, alarmins, signaling, adaptor protein.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el encargado de eliminar a los microorganismos patógenos o al tejido deteriorado cuando existe una infección o algún daño tisular. Al sitio donde ocurre la agre-

sión, arriban diversos tipos celulares del sistema inmune innato que producen factores solubles que desencadenan el proceso fisiológico denominado inflamación, esta primera fase es general e inespecífica y es seguida

por la respuesta inmune adaptativa que gracias a la generación de anticuerpos es altamente específica.

Los signos característicos de la inflamación han sido definidos con las cuatro palabras latinas: calor, dolor,

Abreviaturas: Btk: tirosina cinasa de Bruton, CpG: secuencias no metiladas en el DNA bacteriano, DAMPs: patrones moleculares asociados a daño, DD: dominio de muerte, DI: dominio intermedio, dsRNA: RNA de doble cadena, HMGB1: proteínas nucleares de alta movilidad electroforética, HSPs: proteínas de choque térmico, IFN: interferón, IκB: proteína inhibidora κB, IKKs: cinasas de IκB, IL: interleucina, IRAK: cinasa asociada al receptor de IL-1, IRF-3: factor regulador de IFN-3, LPS: lipopolisacárido, MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno, MyD88: factor de diferenciación mieloide 88, NF-κB: factor nuclear κ B, PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, RAGE: receptor para productos de glicosilación avanzada, SIGIRR: molécula relacionada al receptor de inmunoglobulina interleucina1, SOCS1: supresor de la señalización de citocinas 1, ssRNA: RNA de cadena sencilla, TAB: proteínas de unión a TAK, TAK1: cinasa activada de TGF-β TIR: receptor Toll/IL-1, TIRAP: proteína adaptadora que contiene el dominio TIR, TLRs: receptores tipo Toll, TRAF-6: Factor asociado al receptor de TNF, TRAM: molécula adaptadora relacionada a TRIF, TRIF: adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN-β.

*Recibido: 27 de marzo de 2009 Aceptado: 13 octubre de 2009

¹Unidad de Investigación Médica de Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Zacatecas, Zac., México. ²Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán & Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, México D.F., México. Correo E: aimee_120579@hotmail.com

rubor y tumor, aunque el fenómeno ya era conocido desde la época de los griegos. Actualmente sabemos que estos signos son inducidos por la acción de factores solubles, entre los que destacan las citocinas y las quimiocinas.

Las citocinas son proteínas que funcionan como señales que regulan tanto el crecimiento como la maduración de los diferentes tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio; por su parte las quimiocinas también son proteínas cuya acción es atraer a las células del sistema inmune al sitio dañado, tanto las citocinas como las quimiocinas son reconocidas por receptores específicos que se encuentran en la membrana de los elementos celulares reclutados.

Las citocinas y las quimiocinas dan inicio al proceso inflamatorio al promover la dilatación y el incremento de la permeabilidad en los vasos sanguíneos, el aumento de la expresión de moléculas de adhesión en las paredes de estos vasos provocan que neutrófilos y monocitos se adhieran, atraviesen activamente las paredes vasculares y migren al lugar de la agresión.

Al arribar al sitio lesionado, los monocitos se diferencian a macrófagos que junto con los neutrófilos inician el proceso fagocítico, paralelamente, los eosinófilos y basófilos liberan gránulos especializados que contienen productos citotóxicos. Esta combinación de mecanismos logra eliminar tanto a los microorganismos patógenos como al tejido agredido.

Esta respuesta denominada "celular o innata" se caracteriza por ser inmediata, ya que se desarrolla dentro de las primeras cuatro horas de detección de la presencia del agente patógeno o del daño tisular en el hospedero.

A diferencia de los linfocitos, principales miembros de la inmunidad adaptativa, las células de la inmunidad innata no son capaces de producir anticuerpos ni presentan recepto-

res específicos de antígenos; esta notable diferencia entre los representantes celulares característicos del sistema inmune innato y adaptativo fue motivo de una inquietante especulación alrededor del cómo se identifican los antígenos agresores durante la respuesta inmune innata.

Ahora sabemos que una estrategia de reconocimiento que utiliza el sistema inmune innato involucra receptores membranales evolutivamente conservados denominados receptores tipo Toll (TLRs), estos receptores identifican moléculas que se encuentran en la superficie de patógenos o que son liberadas por tejido necrótico (1).

Estas moléculas que se interpretan como "señales de peligro" forman parte de un grupo denominado patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés) integrado por: los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) y las alarminas que son proteínas intracelulares liberadas por células necróticas (2). Así, la estimulación de los TLRs por moléculas DAMPs inducen la expresión de la gran mayoría de los genes involucrados en procesos inmunológicos de inmunidad innata entre los que destacan IL-1 β e IL-6.

Enfermedades como el choque séptico, la autoinmunidad y la aterosclerosis tienen una estrecha relación con el desequilibrio en la respuesta inflamatoria, entender la modulación de la inflamación es esencial para el diseño de nuevos tratamientos que mitiguen este tipo de patologías.

Nuestra intención es describir qué regula la respuesta mediada por los TLRs.

RECEPTORES TIPO TOLL

En 1988 Nusslein-Volhard acuñó el término Toll que en alemán significa extraordinario para referirse a un gen que codifica para un receptor de membrana involucrado en el desarrollo

dorso-ventral de la mosca de la fruta, ya que cuando estos insectos carecían de esta proteína se desarrollaban de manera fuera de lo común (3), de ahí que en un principio los TLRs se relacionaran con la diferenciación morfológica de este insecto.

A mediados de los años noventas del siglo pasado, se descubrió que la defensa fisiológica generada por la mosca de la fruta consistía en la producción de diferentes péptidos antimicrobianos (3). Los promotores de los genes que codifican estos péptidos contienen secuencias de reconocimiento para el factor nuclear κ B (NF- κ B), este factor de transcripción es central para la expresión de genes relacionados con la reacción inflamatoria, el control de la proliferación celular y la resistencia a la apoptosis (4).

Fue el grupo de Hoffmann el cual encontró que las moscas adultas que no expresaban el factor de transcripción denominado "dorsal", proteína de la familia NF- κ B y regulada por Toll, morían de infecciones causadas por hongos (3); de esta manera se estableció la relación entre los genes involucrados con la defensa del hospedero y dicho receptor.

El primer TLR humano fue descrito en 1997, actualmente sabemos que la familia TLR cuenta con 13 miembros; estos receptores presentan tres regiones estructurales: el extremo amino que contiene la región extracelular y el dominio de unión al ligando que se caracteriza por presentar secuencias repetidas ricas en leucina, una región transmembranal, y el extremo carboxilo contiene la región intracelular que contiene un dominio TIR (receptor Toll/IL-1) que originalmente se identificó en el receptor de IL-1.

Los receptores Toll reconocen a sus ligandos en forma de homo- o heterodímeros (5) y han sido clasificados dependiendo del tipo de

DAMP's que identifican: PAMP's o alarminas (Tabla 1), la exquisita especificidad de esta familia de receptores ha detonado un amplio interés en el campo de la inmunidad innata.

El primer TLR descrito y mejor caracterizado debido a su relación con el choque séptico fue TLR4, éste identifica al lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas.

El RNA de doble cadena (dsRNA) es reconocido por TLR3, en tanto el RNA de cadena sencilla (ssRNA) por TLR7 y 8, y las secuencias CpG no metiladas en el DNA bacteriano por TLR9. La flagelina se describió como ligando de TLR5 y la profilina de TLR11 (sólo en ratón). El TLR2 es el único capaz de formar heterodímeros, uniéndose a TLR1 o TLR6 y responde tanto a lipopéptidos de bacterias Gram positivas y hongos, así como a glicerosfosfatidil inositol de parásitos (6). A la fecha, se desconocen los PAMPs reconocidos por TLR10, 12 y 13.

Las alarminas integran un conjunto de patrones moleculares de reciente descubrimiento y como habíamos mencionado son proteínas intracelulares liberadas cuando existe daño tisular o celular (2); entre ellas se ha identificado la molécula HMGB1 (high mobility group box 1) que es una proteína nuclear liberada por células necróticas que forma un complejo con RAGE (receptor for advanced glycation end products) y con secuencias CpG no metiladas de DNA bacteriano (7), la formación de éste complejo DNA-proteico estimula la activación de TLR9.

Otro miembro de las alarminas son las proteínas de choque térmico (HSPs), moléculas chaperonas que corrigen el plegamiento de nuevas proteínas y también son secretadas por células necróticas, entre ellas se encuentran HSP60, PRAT4A y gp96 que interactúan con TLR4 (8).

Cada tipo celular presenta diferente expresión y distribución de los TLRs

TABLA 1

PAMP's	
TLR's homodiméricos	
TLR4	Lipopolisacáridos de bacterias gram-
TLR3	ARN de cadena doble
TLR7,TLR8	ARN de cadena sencilla
TLR9	CpG DNA: Secuencias de ADN no metilado
TLR5	Flagelina
TLR11	Profilina
TLR10,TLR12,TLR13	Desconocido
TLR's heterodiméricos	
TLR2/TLR1	Lipopéptidos de bacterias gram+
TLR2/TLR6	Lipopéptidos de micobacterias
ALARMINAS	
TLR's homodiméricos	
TLR9	RAGE:receptor para productos de glicosilación avanzada/HMGB: proteínas nucleares de alta movilidad electroforética/ CpG DNA: Secuencias de ADN no metilado HSPs: Proteínas de choque térmico
TLR4	

Clasificación de los receptores tipo Toll y del tipo de patrones moleculares asociados a daño (DAMP's por sus siglas en inglés) que identifican: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's por sus siglas en inglés) o alarminas. Modificada de Ref.13.

mencionados, diferentes reportes señalan que en las superficies celulares se expresan TLR1, 2 y 4 mientras que en compartimentos intracelulares de tipo endosomal se ubica a TLR3, 7, 8 y 9. Sólo en la cara basolateral de células de epitelio intestinal, se ha localizado la presencia de TLR5 y en células epiteliales de vejiga la de TLR11 (sólo en ratón) (6).

SEÑALIZACION DE VIAS ACTIVADAS POR TLRs

La interacción entre los TLRs y los DAMPs da origen a una secuencia de eventos intracelulares que culminan con la expresión de genes relacionados a la inflamación, dependiendo de la naturaleza de la señal de peligro y de los TLRs implicados son activadas diferentes vías de señalización.

El funcionamiento de estas rutas puede ser dependiente o independiente de la proteína acopladora MyD88 (factor de diferenciación mieloides 88) (9) (Fig. 1).

Cuando la activación de la vía es dependiente de MyD88:

1) Esta proteína acopladora se recluta y asocia con los TLRs a través de los dominios TIR de ambas moléculas, este evento permite que MyD88 se una a IRAK-4 (cinasa 4 asociada al receptor de IL-1) a través de su dominio intermedio (DI) y a IRAK-1 mediante su dominio de muerte (DD); la proximidad entre ambas cinasas provoca que IRAK-4 fosforile a IRAK-1.

2) IRAK-1 fosforilado se une a la proteína TRAF-6 (Factor asociado al receptor de TNF), ambos se disocian

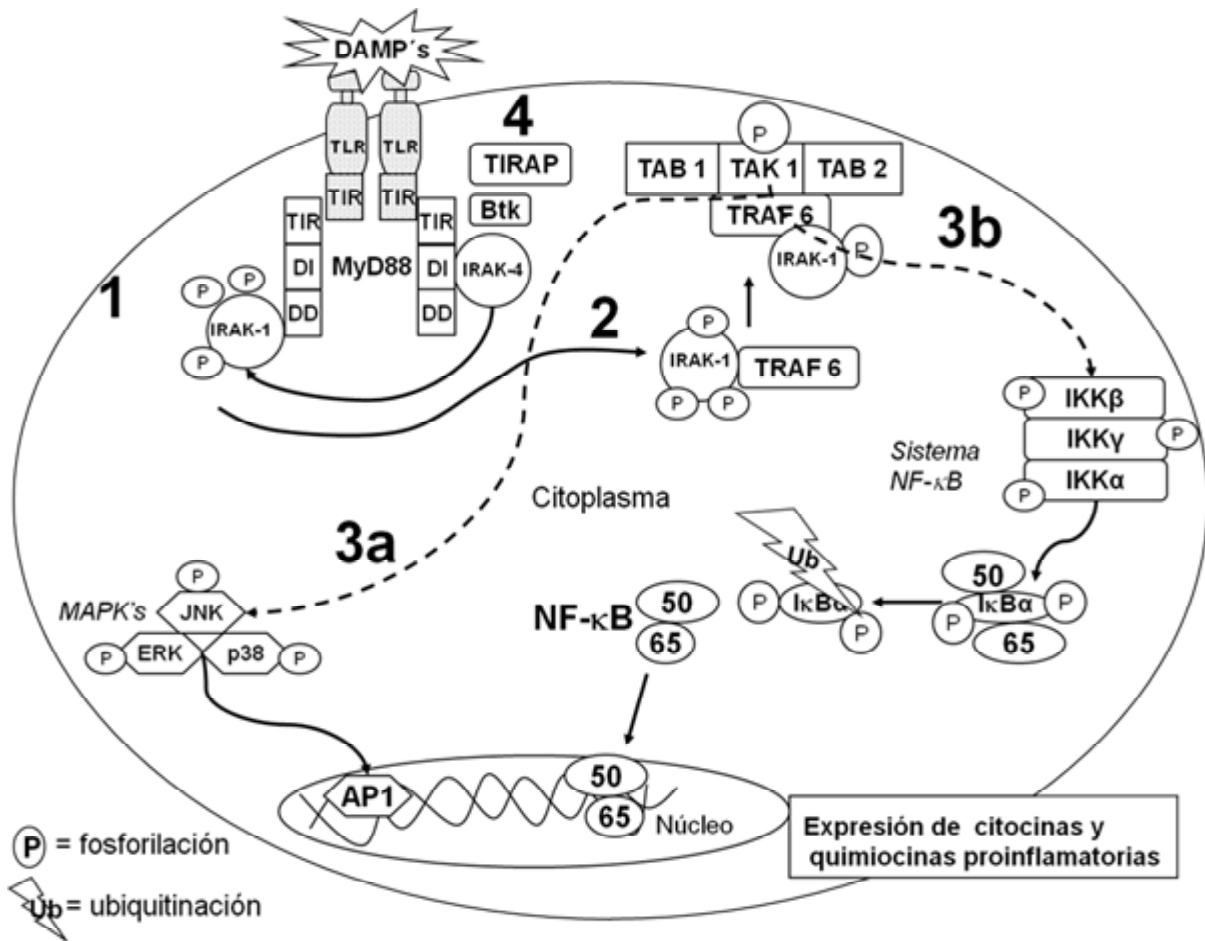


Figura 1. Activación de la vía de receptores tipo Toll a través de la proteína acopladora MyD88 que activa a la vía de las MAP-quinasas y del sistema NF- κ B. Los números indican la secuencia en que se dan las cuatro etapas descritas en el texto. Figura modificada de Ref. 9.

del complejo del receptor e interactúan con otro grupo proteico formado por TAK1 (cinasa activada de TGF- β) y TAB1 y 2 (proteínas de unión a TAK1).

3) Una vez formado este complejo proteico surgen dos vías independientes de señalización: una que lleva a la activación de las MAP-quinasas (3a) y otra que conduce a la activación del sistema NF- κ B (3b). En la primera ruta (3a), la activación de TAK1 induce la fosforilación de las MAPK's cinasas (ERK, JNK y p38) promoviendo la translocación nuclear del factor AP1; en la segunda ruta (3b), TAK 1 fosforila el complejo de cinasas de I κ B (IKKs) que a su vez fosforilan a I κ B marcándolo para su ubiquitinación y

subsecuente destrucción por el proteasoma. El dímero NF- κ B (p50,p65) se transloca al núcleo cuando la secuencia de localización nuclear queda expuesta, ya en el núcleo, el factor transcripcional se une a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco (10).

4) En la búsqueda de moléculas estructuralmente similares a MyD88 se identificó a TIRAP, otra proteína adaptadora que también contiene el dominio TIR (11), esta proteína ayuda a MyD88 en la señalización cuando sólo son activados TLR2 o TLR4. También fue caracterizada la tirosina cinasa de Bruton (Btk) que interactúa con el dominio TIR de la mayoría de los TLRs (12).

La vía independiente a la proteína acopladora MyD88 sólo es empleada por TLR3 y TLR4; ambos receptores señalizan a través de la proteína TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR e induce IFN- β) y sólo TLR4 ocupa a la proteína TRAM (molécula adaptadora relacionada a TRIF) (9) (Fig. 2).

La señalización de la vía independiente a MyD88 abarca la siguiente secuencia:

1) La proteína acopladora TRIF recluta al complejo proteico TRAF6-TAK1- TAB2 que activa a las IKKs permitiendo la liberación de NF- κ B.

2) A través de otra ruta, la molécula TRIF interactúa con el dímero TBK1/IKK ϵ ocasionando la

translocación del factor nuclear IRF-3 (Factor regulador de IFN-3), provocando la síntesis de interferón tipo I (IFN α/β).

MODULADORES DE LAS VIAS ACTIVADAS POR LOS TLRs

La producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α IL-6 o IL-1 β se considera como un marcador de la activación de los TLRs; la producción exacerbada de estos mediadores inflamatorios origina serios desórdenes sistémicos en el hospedero que lo pueden llevar a presentar el síndrome de falla orgánica múltiple e incluso la muerte, cabe mencionar que esta es la condición más común en pacientes críticos en las unidades de terapia intensiva a nivel mundial.

A pesar del conocimiento en la diversidad de ligandos que activan los TLR's, la señalización inducida por LPS es el modelo que explica a esta familia de receptores.

El LPS induce la expresión de diversos moduladores, entre los más conocidos se encuentran: MyD88s, IRAK-M, ST2, SIGIRR y SOCS1 (13) (Fig. 3).

La molécula MyD88s es el producto de un empalme alternativo que elimina al exón 2 que corresponde al dominio intermedio de MyD88, la ausencia de éste dominio en MyD88s impide que IRAK-4 sea reclutado, bloqueando la activación de NF- κ B (14).

La familia de cinasas IRAK cumplen una importante actividad en la transducción de la señal de los TLRs,

sin embargo, uno de sus integrantes conocido como IRAK-M, no posee actividad enzimática (15). Esta molécula interfiere con la disociación entre IRAK4/IRAK-1 con MyD88, impidiendo la posterior interacción de IRAK-1 con TRAF6.

Las proteínas transmembranales ST2 y SIGIRR pertenecen a las superfamilia de proteínas que presentan un dominio tipo TIR; ambas estructuras se consideran receptores huérfanos que interfieren en la señalización que activa a NF- κ B (13). El mecanismo por el cual ST2 bloquea la activación de los TLRs es secuestrando a los adaptadores MyD88 y TIRAP a través de su dominio TIR y la estrategia utilizada por SIGIRR es desconocida, sólo se

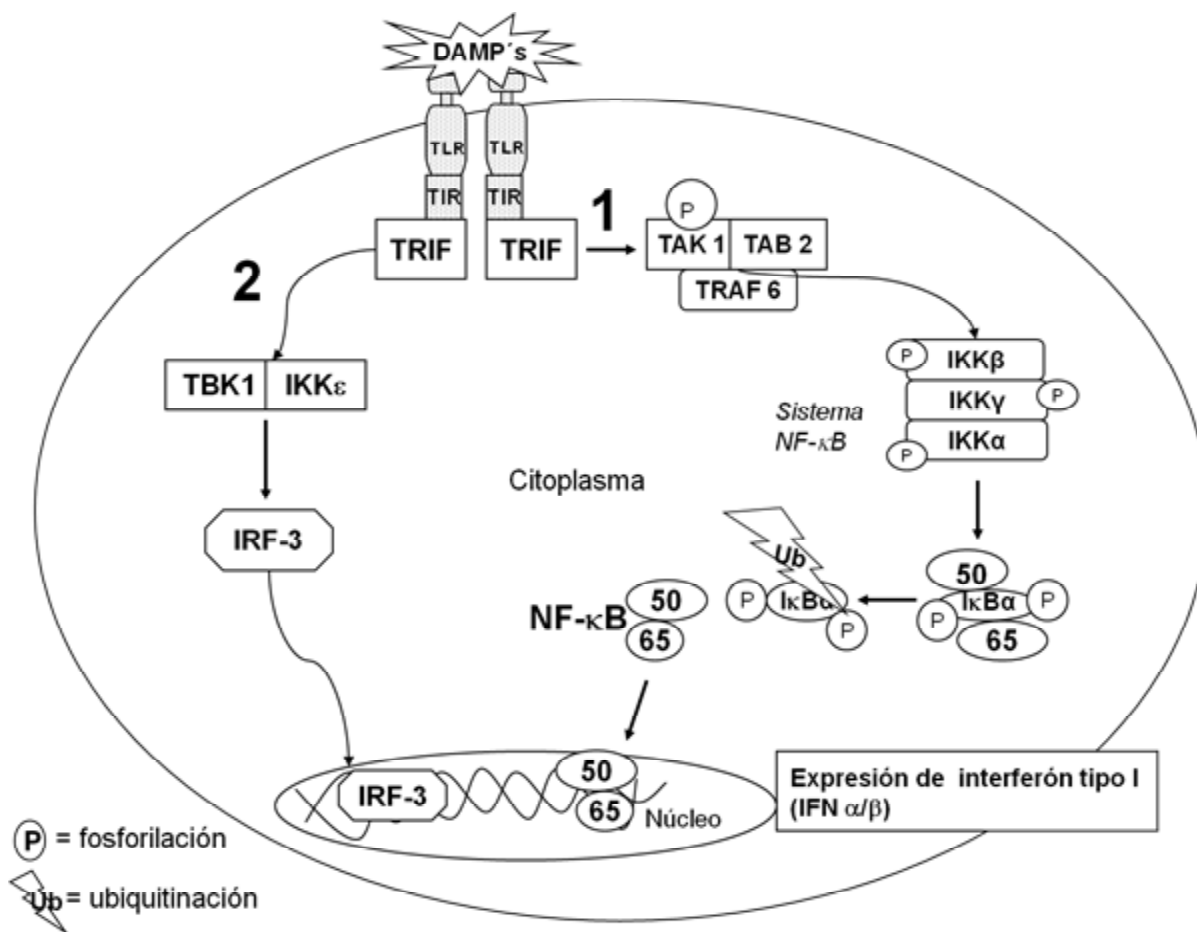


Figura 2. Activación de la vía de receptores tipo Toll independiente de la proteína acopladora MyD88 y dependiente de la proteína adaptadora TRIF que conduce a la expresión de la familia de interferón tipo I. Figura modificada de Ref. 9.

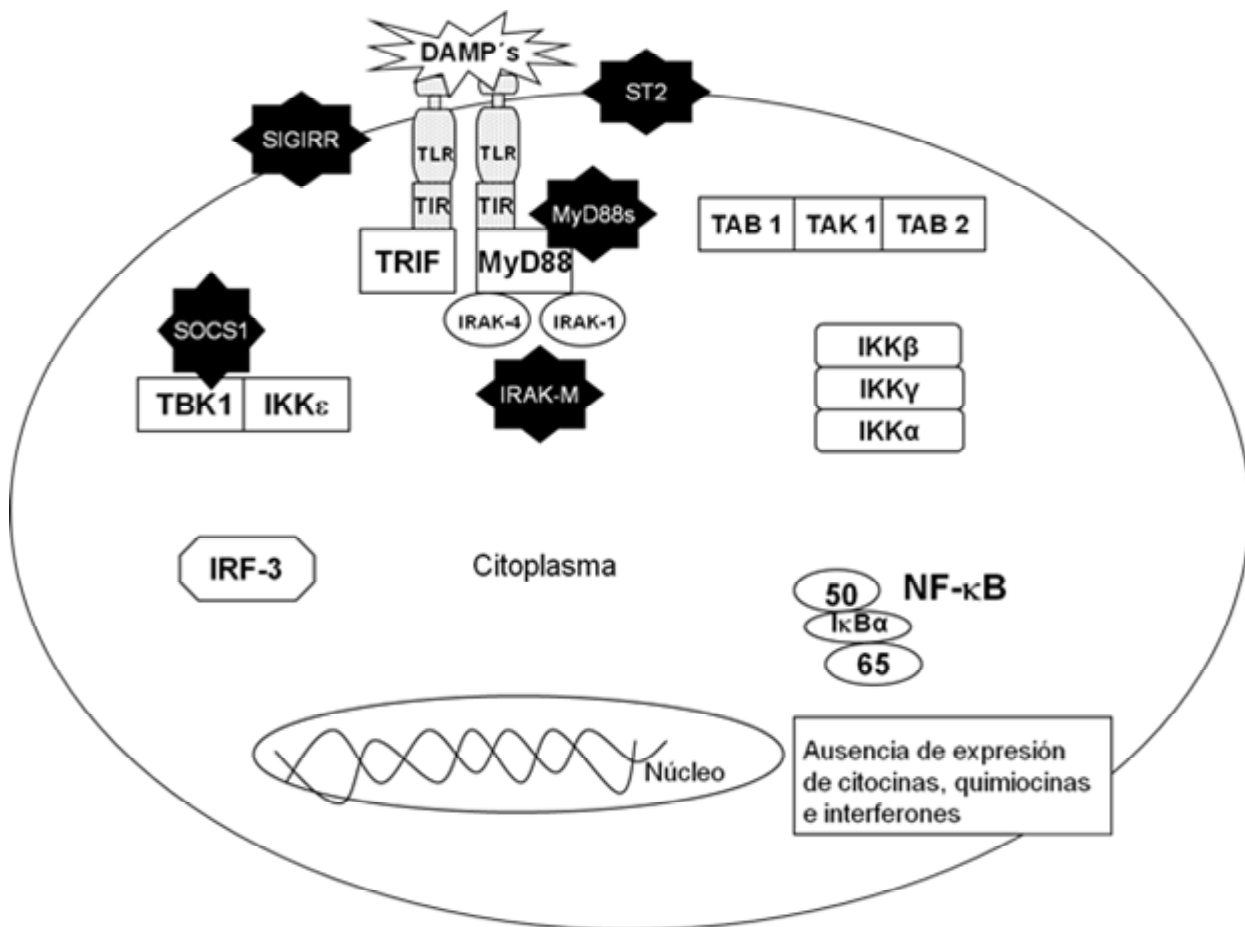


Figura 3. Moduladores negativos de las vías activadas por los TLRs, las estrellas negras representan diferentes tipos de moduladores de la vía. MyD88s: forma truncada de MyD88; IRAK-M: miembro de familia IRAK que carece de actividad enzimática; ST2 y SIGIRR: receptores transmembranales huérfanos; SOCS1: supresor tipo 1 de la señalización de citocinas.

sabe que interactúa con TLR4, IRAK y TRAF6.

La molécula SOCS-1 (supresor de la señalización de citocinas 1) pertenece a un grupo de proteínas involucrado en la regulación negativa de las vías de transducción de citocinas, en particular la activación de la vía de interferón tipo I (15).

PERSPECTIVAS

La inflamación, proceso generado por la inmunidad innata, representa en mamíferos la primera línea de defensa en respuesta a diversos tipos de agresión. A través de los TLR's, este

sistema protector detecta rápidamente DAMPs que reflejan la existencia de algún tipo de daño o la presencia de microorganismos patógenos en el hospedero; la activación de esta familia de receptores conduce a la expresión de los mediadores pro- y anti-inflamatorios que ayudan a combatir la lesión o la infección enfrentada por el individuo.

La inflamación es una respuesta benéfica, sin embargo, cuando se alteran sus mecanismos de control, se puede convertir en una patología en forma de una inflamación aguda exacerbada como el choque séptico o una

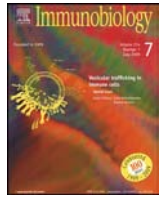
inflamación crónica como la artritis reumatoide. Aún es desconocido si la inflamación aguda está relacionada a una ausencia de reguladores de las vías activadas por los TLRs o si su producción prolongada provoque una inflamación crónica.

Estudios enfocados a resolver estas preguntas, brindarán información relevante que servirá para generar nuevos fármacos específicos que puedan bloquear las vías que mantienen estas respuestas inflamatorias anormales sin generar graves efectos secundarios en el individuo.

REFERENCIAS

1. Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* 19(1):24-32.
2. Bianchi M E (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: All we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81(1): 1-5.
3. O'Neill L A J (2004) TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol* 25(12): 687-693.
4. Karin M (1998) The NF- κ B activation pathway: Its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J Sci Am* 4(SUPPL. 1).
5. O'Neill L A J (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev* 226:10-18.
6. Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17(1):1-14.
7. Krieg A M (2007) TLR9 and DNA 'feel' RAGE. *Nat Immunol* 8(5):475-477.
8. Akashi-Takamura S, Miyake K (2008) TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20(4):420-425.
9. Li X X, Qin J Z (2005) Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med* 83(4):258-266.
10. Foster S L, Medzhitov R (2009) Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 130(1):7-15.
11. Horng T, Barton G M, Flavell R A, Medzhitov R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420 (6913): 329-333.
12. Jefferies C A, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, Walch E, Wirth T, O'Neill L A J (2003) Bruton's tyrosine kinase is a toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappa B activation by toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 278(28): 26258-26264.
13. Liew F Y, Xu D M, Brint E K and O'Neill L A J (2005) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5(6):446-458.
14. Janssens S, Burns K, Vercaemmen E, Tschopp J, Beyaert R (2003) MyD88(S), a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappa B- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett* 548(1-3):103-107.
15. Kobayashi K S, Flavell R A (2004) Shielding the double-edged sword Negative regulation of the innate immune system. *J Leukoc Biol* 75(3):428-433.

ANEXO 2



Human endotoxin tolerance is associated with enrichment of the CD14⁺ CD16⁺ monocyte subset



Aimée Domínguez-Nieto^a, Alejandro Zentella^{b,c}, José Moreno^d, José L. Ventura^c, Sigifredo Pedraza^b, Juan R. Velázquez^{a,*}

^a Departamento de Inmunogenética y Alergia, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

^b Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (ICMNSZ), Mexico City, Mexico

^c Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

^d Facultad de Medicina, Universidad La Salle, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2014

Received in revised form 5 August 2014

Accepted 6 August 2014

Available online 14 August 2014

Keywords:

CD14CD16

Endotoxin tolerance

CXCL10

MyD88

Monocytes

TNF

Toll-like receptor 4

ABSTRACT

Prior exposure to lipopolysaccharides (LPS) induces a state of cell resistance to subsequent LPS restimulation, known as endotoxin tolerance, mainly by repressing the expression of pro-inflammatory cytokines. We established an endotoxin tolerance model in human monocytes. Endotoxin-tolerant cells showed a decrease in $\kappa\text{B}\alpha$ degradation and diminished expression of Tumor necrosis factor (TNF) (both messenger RNA [mRNA] and protein content). The myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/MyD88 splice variant (MyD88s) ratio, an indirect way to test the Toll-like receptor 4 (TLR4) MyD88-dependent signaling cascade, did not change in endotoxin-tolerant cells when compared to LPS-stimulated or -unstimulated ones. Remarkably, cell population analysis indicated a significant increase of the CD14⁺ CD16⁺ subset only under the endotoxin-tolerant condition. Furthermore, endotoxin-tolerant cells produced higher amounts of C–X–C motif chemokine 10 (CXCL10), a typical MyD88-independent cytokine.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Human blood monocytes are not a homogeneous population of cells; they can be separated based on the expression of cell surface markers. Differential expression of CD14 and CD16 could define at least two subsets of monocytes with distinct functional properties. In general, CD14⁺ monocytes produce more cytokines. Additionally, monocytes with different combinations of CD14 and CD16 antigens on their surfaces produce characteristic cytokine profiles after lipopolysaccharide (LPS) challenge (Belge et al. 2002).

Pre-exposure of isolated adherent human monocytes to LPS leads to hyposensitivity to secondary LPS stimulation, known as endotoxin tolerance (Cavaillon and Adib-Conquy 2006). To date,

the underlying molecular mechanisms of endotoxin tolerance are not completely understood. LPS, a glycolipid component of the cell wall of Gram-negative bacteria, is a model molecule used to study inflammatory responses caused by exposure to bacteria (Vassallo et al. 2012). Toll-like receptor 4 (TLR4) is the main receptor for LPS (Takeda and Akira 2005); for signaling, TLR4 employs the Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain containing adaptor-inducing Interferon-beta (IFN- β) (TRIF) or myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent signaling pathways. TRIF-dependent signaling activates IFN regulatory factor 3 (IRF3) and the expression of type II IFN, such as C–X–C motif chemokine 10 (CXCL10) and Chemokine (C–C motif) ligand 5 (CCL5) (Yamamoto et al. 2003). Contrariwise, MyD88-dependent signaling activates the nuclear factor-kappa beta (NF- κB) and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) pathways (Janssens and Beyaert 2002) and the transcription of inflammatory genes such as TNF, interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, and IL-12 (Burns et al. 1998).

MyD88s is a product of an alternative splicing (exon 2 deletion) of MyD88 (Janssens et al. 2002). In mouse, MyD88s regulates the IL-1 β and LPS signaling pathways due to its inability to activate downstream signaling molecules (Burns et al. 2003); in humans, upregulation of MyD88s mRNA was reported in monocytes from

Abbreviations: $\kappa\text{B}\alpha$, I-kappa-B-alpha; IRF, IFN regulatory factor; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; LPS, lipopolysaccharide; MyD88, myeloid differentiation factor 88; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TLR4, toll-like receptor 4; TRIF, TIR domain containing adaptor-inducing IFN- β .

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Ismael Cosío Villegas, Calz. Tlalpan No. 4502, Col. Sección XVI, Deleg. Tlalpan, Distrito Federal, Mexico, CP 14080, Mexico. Tel.: +52 5554871740.

E-mail address: velazquez.juan@outlook.com (J.R. Velázquez).

patients with sepsis (Adib-Conquy et al. 2006). Other studies in septic patients showed changes in blood monocyte phenotypes, characterized by the proliferation of a CD16+ subset (Fingerle et al. 1993; Skrzeczynska et al. 2002). Differential expression of surface molecules on monocytes such as CD16 is likely related with the LPS response.

In this report, we induced endotoxin tolerance in freshly isolated, adherent human monocytes and examined which monocyte subpopulation best fits to a characteristic hypo-responsiveness state.

Materials and methods

Isolation and cell culture

Four female and five male healthy donors (without any type of treatment) were recruited at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) Blood Bank. Peripheral blood monocyte cells (PBMC) were collected using Ficoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) density gradients from leukocyte concentrates from healthy donors. Ten million PBMC were resuspended in RPMI 1640 medium (GIBCO Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS) and incubated in 5% CO₂ at 37°C in tissue culture 50 mm Petri dishes (Corning) during 1 h. Non adherent cells were removed by gentle washing and adherent cells remained in culture for experiments and these are called hereafter monocytes. After 24 h of incubation period monocytes remained unstimulated or were presensitized to generate an endotoxin-tolerant condition with 10 ng/ml LPS from *Escherichia coli* serotype 0111:B4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 24 h. After 48 h of incubation period, cells were washed twice with warm RPMI-1640, and the following conditions were included: Monocytes remained unstimulated (a) control, were treated with 10 ng/ml with sonicated LPS (b) single LPS stimulus, were treated with 10 ng/ml LPS + 10 µg/ml polymyxin B (Sigma) as a negative control because polymyxin B is an antibiotic binding to lipid A, which is the component of LPS responsible for receptor binding and cellular signaling, therefore polymyxin B block LPS activity (c) LPS + Polymyxin B, or were challenged a second time with 10 ng/ml LPS (d) LPS tolerant cells. IκBα content was analyzed 20 min after stimulation, expression of Tumor necrosis factor (TNF) messenger RNA (mRNA) was evaluated 60 min after stimulation, and TNF immunoreactivity was evaluated 3 h after stimulation.

RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from 10 × 10⁶ cells using Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's directions. RNA quantification was determined by absorbance measurement at 260 nm/280 nm in an ND-1000 NanoDrop®. For RT, no <1 µg of total RNA was mixed with Oligo-dT (12–18 mer) (Invitrogen Life Technologies, USA), 200 U of Superscript II (Invitrogen Life Technologies, Brazil), first strand buffer and mixed deoxyriboNucleotide triphosphate (dNTP) (Invitrogen Life Technologies, Brazil). Real time relative expression was performed in capillaries with 20 µl of reaction mix; quantitative Polymerase chain reaction (qPCR) for TNF was carried out by using a specific probe from the Universal ProbeLibrary (UPL) (Roche Applied Science, Salt Lake City, UT, USA) and unique primers. PCR master mix for TNF contained Light Cycler TaqMan Master, 0.5 µM PCR primer mix, and 0.2 µM of specific Human (UPL). All reactions were performed and analyzed in a LightCycler 2.0 instrument (Roche

Applied Science). Results were normalized against Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (UPL probe) expression.

Cytoplasmic extracts and Western blotting analysis

After incubation of monocytes in tissue culture dishes, under LPS and tolerance stimulation conditions previously described, cells were washed three times with ice-cold PBS and harvested. Supernatants were collected, and pellets were frozen following resuspension in 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 1 mM DTT. Cytoplasm was separated from nuclei by centrifugation (14,000 × g × 10 min), collected, and resuspended in anti-protease buffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). After adjusting protein concentration from extracts, samples were utilized immediately or stored at –70°C. For Western blotting analysis, equal protein amounts of cytoplasm extracts were boiled in Laemmli buffer, resolved in 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and transferred on a 0.45-µm Immuno-Blot Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). After blocking with nonfat milk, membranes were washed in TBS-T and probed with the rabbit anti-MyD88 polyclonal antibody raised against a peptide corresponding to amino acids 233–248 of human MyD88 (Chemicon International, Temecula, CA, USA) or with rabbit anti-IκBα polyclonal antibody raised against the C-terminus of human IκB-α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Following washing in Tris buffered saline with Tween 20 (TBS-T), membranes were incubated with secondary Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG. Bands were detected using Supersignal West Pico chemiluminescent substrate reagents (Pierce PERBIO, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

Milliplex assay

Supernatants were collected, frozen, and stored at –80°C until cytokine measurement. Assays were performed using a kit (Millipore's MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine kit) following the manufacturer's instructions. We assayed supernatants of nine donors for TNF, macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1β), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), CXCL10, and cytotoxic lymphocyte maturation factor 2 p40 (IL-12p40).

Flow cytometry

Expression of TLR4, CD14, CD16, and intracellular TNF were evaluated in monocytes from five individuals by flow cytometry. Cells were treated as previously described to generate endotoxin-tolerant cells. For TNF detection, cells were pretreated with Brefeldin A (Sigma). After incubation, cells were harvested and washed with staining buffer 2% (phosphate buffered solution [PBS] 2% fetal calf serum [FCS]). Supernatant was discarded and cells were resuspended in staining buffer and incubated with saturant amounts of anti-TLR4 PEcy7 (eBioscience, San Diego, CA, USA), Anti-CD14 (APC) (eBioscience), and anti-CD16 (FITC) (BD Pharmingen BD Biosciences, San Jose, CA, USA) antibodies for 15 min in the dark at room temperature. Cells were washed, centrifuged, and permeabilized with flow cytometry (FACS) permeabilizing solution BD Permz (BD Biosciences) for 15 min at room temperature. For intracellular TNF detection, we added anti-TNF (PE) (BD Pharmingen BD Biosciences) antibody for 30 min in the dark at room temperature. Cells were washed, centrifuged, and resuspended in 1% paraformaldehyde (Sigma) to be analyzed within 24 h. Event acquisition was performed using BD FACSDiva software (BD Bioscience) and a BD FACS Canto II flow cytometer (BD Bioscience). For each

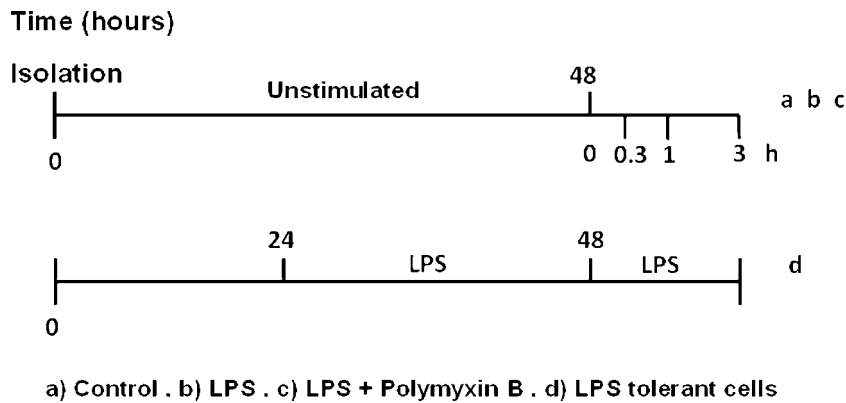


Fig. 1. Representation diagram of the endotoxin tolerance model. PBMC were resuspended in medium and incubated during 1 h, non adherent cells were removed and adherent cells remained in culture for experiments. After 48 h of incubation period, cells were washed twice with medium and the following conditions were included: (a) control, (b) single LPS stimulus, and (c) LPS + polymyxin B. To generate the endotoxin-tolerant condition (d), adherent human monocytes cells were pre sensitized with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS) 24 h before challenging cells with 10 ng/ml LPS for 20 min to study $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ activation, for 1 h to study Tumor necrosis factor (TNF) messenger RNA (mRNA) expression or for 3 h to analyze TNF and Toll-like receptor 4 (TLR4) production and cell typing of CD14 CD16.

condition, at least 30,000 events were acquired based on forward-scatter, side-scatter, and CD14 parameters. Monocyte analysis was performed using BD FACSDiva software (BD Bioscience) by assessing forward- and side-scatter parameters combined with CD14 positivity. Surface receptor expression was measured as Geometric mean fluorescence intensity (GMFI).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad PRISM version 5.00 for Windows GraphPad software (San Diego, CA, USA). CD14, CD16 analysis was conducted using the Mann–Whitney *U* test and all of the remaining data were subjected to paired *t*-test with two-tailed values, where $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Induction of LPS tolerance in enriched monocytes from PBMC

Freshly isolated, adherent human monocytes were presensitized to generate endotoxin tolerance condition with 10 ng/ml LPS 24 h prior to challenging cells for a second time with 10 ng/ml LPS for 20 min when studying $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ activation, 1 h for TNF mRNA expression, or 3 h when analyzing TNF production (Fig. 1).

TNF is one of the most well studied cytokines in endotoxin tolerance. Our monocytes showed a typical high production of TNF in response to a single stimulus of LPS and a significant decrease of TNF production after subsequent LPS stimulation. Relative expression of TNF mRNA was 100-fold upregulated by LPS treatment. Relative expression of both tolerant cells and monocytes treated with polymyxin B was slightly upregulated with respect to unstimulated cells (Fig. 2).

Average concentration of excreted TNF was 296 pg/ml in control cells. There was a high production of TNF in cells with a single LPS stimulus (21,024 pg/ml), if we consider this value as 100% activity, 4224 pg/ml in tolerant cells was equivalent to 10% activity and 3026 pg/ml of TNF in cells treated with LPS+ polymyxin B (Pol B) was equivalent to 5% activity. Statistical differences between LPS vs tolerant cells and LPS vs LPS + PolB were $p < 0.0001$ in both cases (Fig. 3a). Interestingly, MIP-1 β , another inflammatory cytokine showed a similar trend to that of TNF. The average of MIP-1 β production in control cells was 435 pg/ml. The concentration of MIP-1 β in cells with a single LPS stimulus reach 19,672 pg/ml; if we consider this value as 100% activity, 7418 pg/ml of MIP-1 β in tolerant

cells was equivalent to 33% activity and 4868 pg/ml of MIP-1 β in cells treated with LPS+ polymyxin B was equivalent to 22% activity. Statistical differences between LPS vs tolerant cells and LPS vs LPS + PolB were $p < 0.0001$ in both cases (Fig. 3b). In order to explore whether the NF- κ B signaling pathway was activated, we studied $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradation in our endotoxin-tolerant model. We found that $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ content in endotoxin-tolerant cells was 2.6-fold higher than in control cells and 3.3-fold higher than in cells treated only once with LPS (Fig. 4). These results confirmed impaired NF- κ B signaling in endotoxin-tolerant monocytes.

MyD88s protein expression in LPS-tolerant monocytes

Once our endotoxin tolerant model was established, we were interested in studying the contribution of MyD88s, a negative regulator of the TLR4-NF- κ B signaling pathway, in the endotoxin-tolerant phenotype. Semiquantitative protein amounts of MyD88 and MyD88s assessed by western blot were considered to establish the prevalence of one amount over the other using the MyD88/MyD88s ratio for all of the experimental conditions. Fig. 5 shows no significant ratio differences among untreated, single treated, and LPS-tolerant cells.

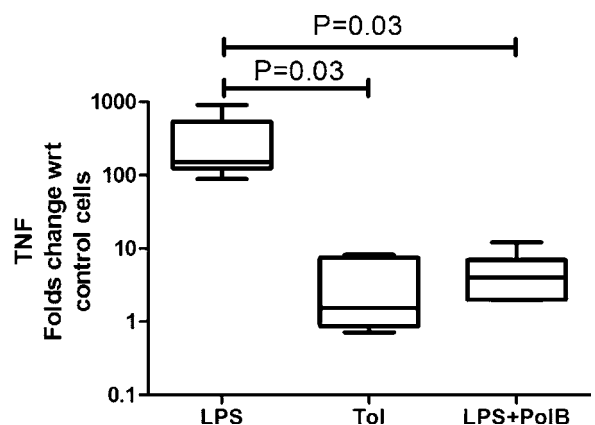


Fig. 2. Relative Tumor necrosis factor (TNF) messenger RNA (mRNA) expression in monocytes cells treated for 60 min with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS), 10 ng/ml LPS + 10 μ g/ml polymyxin B, or presensitized (to generate the endotoxin-tolerant condition) with 10 ng/ml LPS 24 h before treatment for 60 min with 10 ng/ml LPS. Results are from nine independent experiments. Whiskers correspond to minimal–maximal values. *P* values are shown above each comparison line.

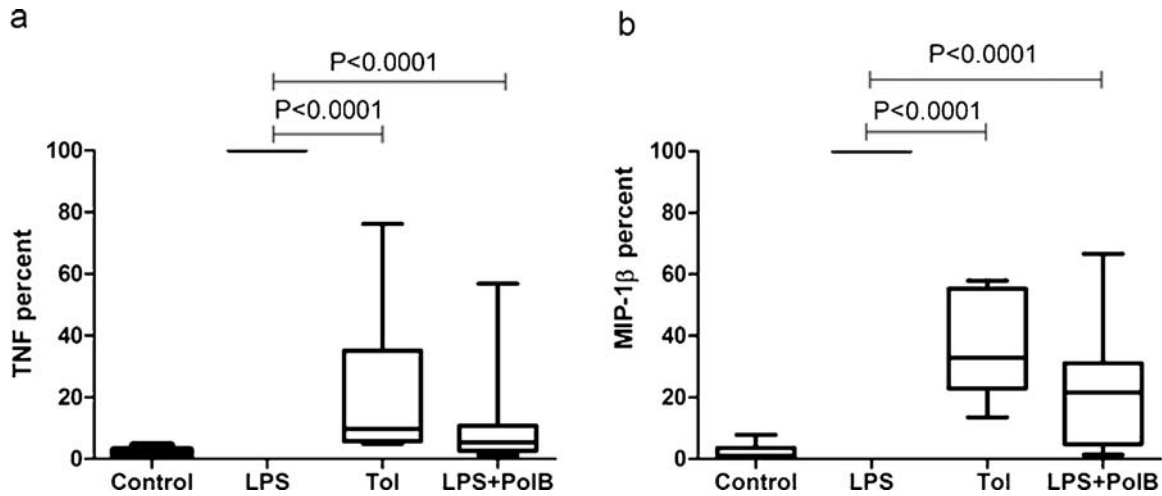


Fig. 3. (a) Tumor necrosis factor (TNF) and (b) macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1 β) protein production in adherent human monocytes cells treated for 3 h with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS), 10 ng/ml LPS + 10 μ g/ml polymyxin B, or presensitized (to generate the endotoxin-tolerant condition) with 10 ng/ml LPS 24 h before treatment for 3 h with 10 ng/ml LPS. Results are from nine independent experiments. Whiskers correspond to minimal–maximal values. Data were normalized considering LPS value as 100% in each individual. *P* values are shown above each comparison line.

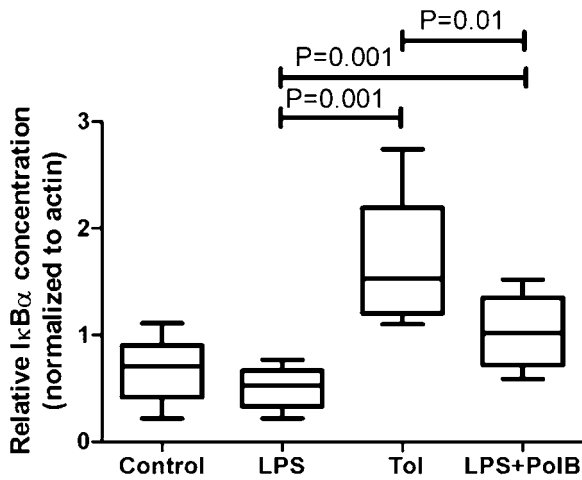


Fig. 4. I-kappa-B-alpha (I κ B α) protein densitometric values of adherent human monocytes cells treated for 20 min with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS), 10 ng/ml LPS + 10 μ g/ml polymyxin B, or presensitized (to generate the endotoxin-tolerant condition) with 10 ng/ml LPS 24 h before treatment for 20 min with 10 ng/ml LPS. Results are from nine independent experiments. Whiskers correspond to minimal–maximal values. *P* values are shown above each comparison line.

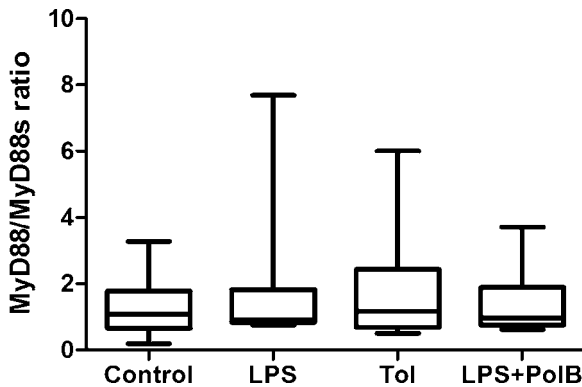


Fig. 5. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/MyD88 splice variant (MyD88s) protein densitometric values of adherent human monocytes cells treated for 20 min with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS), 10 ng/ml LPS + 10 μ g/ml polymyxin B, or presensitized (to generate the endotoxin-tolerant condition) with 10 ng/ml LPS 24 h before treatment for 20 min with 10 ng/ml LPS. Results are from nine independent experiments. Whiskers correspond to minimal–maximal values.

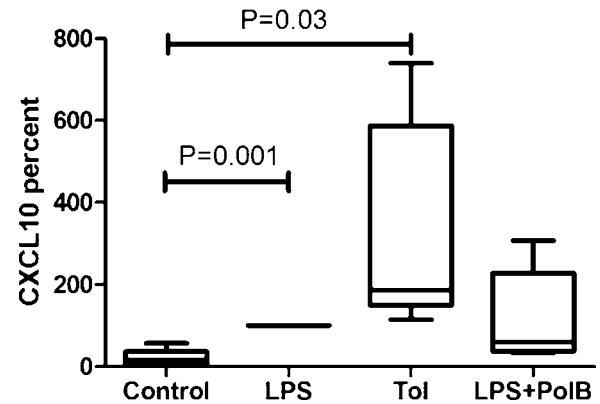


Fig. 6. C–X–C motif chemokine 10 (CXCL10) protein production in adherent human monocytes cells treated for 3 h with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS), 10 ng/ml LPS + 10 μ g/ml polymyxin B, or presensitized (to generate the endotoxin-tolerant condition) with 10 ng/ml LPS 24 h before treatment for 3 h with 10 ng/ml LPS. Results are from nine independent experiments. Whiskers correspond to minimal–maximal values. Data were normalized considering LPS value as 100% in each individual. *P* values are shown above each comparison line.

CXCL10 as an indicator of MyD88-independent pathway

Because we had already explored the behavior of the MyD88-dependent pathway in our endotoxin-tolerant model, we decided to determine the concentration of CXCL10 released, a typical MyD88-independent product (Fig. 6). As expected, we noted a CXCL10 production increase in single LPS-stimulated cells 7754 pg/ml, if we consider this value as 100% activity, 16,779 pg/ml of CXCL10 in tolerant cells was equivalent to 187%, suggesting that the MyD88 independent pathway is not disturbed in the endotoxin-tolerant phenotype. Statistical differences between Control vs LPS was $p = 0.001$ and control vs Tol was $p = 0.03$.

Effects of LPS tolerance on surface receptor expression

Our interest advanced to observe whether there was a monocyte phenotype associated with LPS tolerance. In six apparently healthy donors, two-color immunofluorescence analysis with CD14 and CD16 antibodies identified two cell subsets from monocytes. After a 48 h incubation period, we obtained two subsets, CD14+ CD16– 67.6% and CD14+ CD16+ 25.3% cells of all monocytes (Fig. 7).

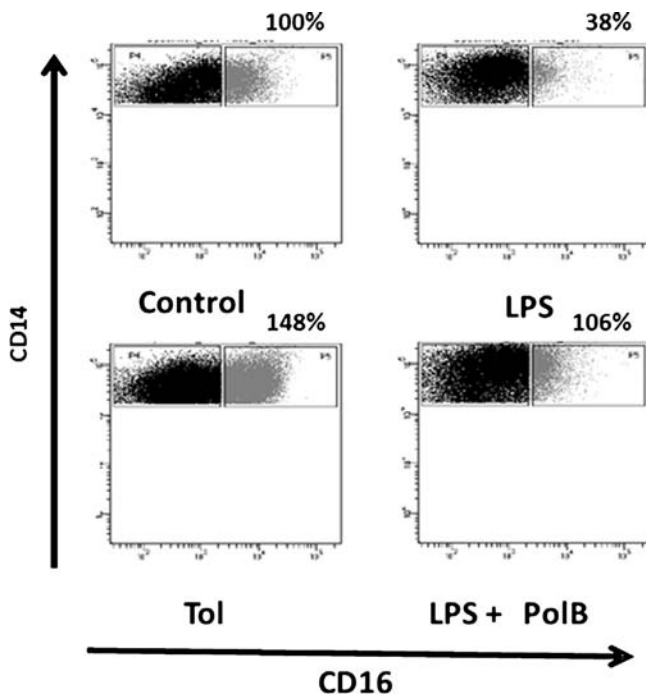


Fig. 7. The endotoxin-tolerant effect on CD14+ CD16+ cells. Representative experiment of adherent human monocytes cells treated for 3 h with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS), 10 ng/ml LPS + 10 μ g/ml polymyxin B, or presensitized (to generate the endotoxin-tolerant condition) with 10 ng/ml LPS 24 h before treatment for 3 h with 10 ng/ml LPS. After treatment, cells were stained with CD14 (APC) and CD16 Fluorescein isothiocyanate (FITC), and the percentage of CD14+ CD16+ cells was determined by flow cytometry (FACS) analysis. Results are from five independent experiments.

Taking unstimulated control cells as 100%, we found that the CD14+ CD16+ subpopulation decreased to 38% after a single stimulus of LPS, while this CD14+ CD16+ phenotype increased to 148% under tolerant condition.

The presence of polymyxin B induced a similar cell phenotype distribution to that of the unstimulated control cell (Fig. 7). Contrariwise, the CD14+ CD16- subset remained unchanged under all experimental conditions. Confirmation of endotoxin tolerance in the CD14+ CD16+ subset was carried out by determination of TLR4 on the surface, along with TNF intracellular content. A single LPS challenge during 3 h was considered as 100%. Normalized TLR4 was 26% in control, 7% in tolerant cells and 24% in LPS + Polymyxin B condition. Statistical differences between control vs LPS, LPS vs tolerant cells and LPS vs LPS + Polymyxin B were $p = 0.0005$, $p = 0.02$ and $p = 0.0006$, respectively (Fig. 8a).

Normalized TNF was 11% in control, 3% in tolerant cells and 10% in LPS + Polymyxin B condition. Statistical differences between control vs LPS, LPS vs tolerant cells and LPS vs LPS + Polymyxin B were $p = 0.0002$, $p = 0.02$ and $p = 0.0001$, respectively (Fig. 8b).

No significant difference in TLR4 or TNF production was observed in the CD14+ CD16- cell subpopulation after single or double LPS stimulation (Fig. 8c and d).

Discussion

Endotoxin tolerance is a monocyte refractory response to further LPS challenge. A plausible mechanism to explain endotoxin tolerance involves alterations in TLR signaling pathways. Regulation of key receptor molecules, such as TLR4 and CD14, on human monocytes has been associated with LPS response (Medvedev et al. 2002; Muzio et al. 2000). However, there is not sufficient evidence to support an endotoxin tolerance mechanism based

solely on downregulation of cell surface receptors (Fan and Cook 2004).

Conventionally, human monocytes can be separated into two general categories based on their expression of cell-surface markers. Ninety percent of human monocytes express CD14 and not CD16 and are referred as “classical monocytes”; the remainder are CD14+ CD16+ cells known as “non-classical monocytes” (Mosser and Edwards 2008). Moreover, the Nomenclature Committee of International Union of Immunological Societies (NC-IUIS) defines three types of monocytes: classical monocytes (CD14++ CD16-); intermediate monocytes (CD14++ CD16+), and non-classical monocytes (CD14+ CD16+) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Our endotoxin-tolerant model was optimized from monocytes cells which demands a great volume of blood for all experimental conditions. Controls of LPS pre culture without second LPS stimulus compromised the experiments. However (when it was feasible), we noticed that LPS pre culture at 24 h without a second LPS stimulation decreased CD14+CD16+ subpopulation and induces low production of TNF. Our monocyte population displayed 67.6% of CD14+ CD16- and 25.3% of CD14+ CD16+ phenotypes, which corresponds to those reported in the literature (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Non-classical CD14+ CD16+ cells have been reported as the highest TNF producing monocyte subset (Belge et al. 2002). We corroborated this, along with increased TLR4 cell surface expression in this monocyte phenotype. If we considered each monocyte subset to possess a distinct functional phenotype, the selective expansion of a particular monocyte subset may be involved in the response to LPS and in the development of endotoxin tolerance. We found the tolerant condition was associated with an enrichment of the CD14+ CD16+ monocyte phenotype. Further studies are required to explain whether that increase is due to a proliferation of the CD14+ CD16+ phenotype or to a further differentiation of the CD14+ CD16- subset.

There is indirect evidence of CD14+ CD16+ monocytes in endotoxin tolerance from studies of monocyte phenotypes in sepsis. This generalized inflammation caused by a severe infection disease is characterized by an early pro-inflammatory phase followed by an anti-inflammatory response that results in an immunosuppressive state. Patients with sepsis display monocyte functional alterations, including reduction of pro-inflammatory cytokines associated with an increased expression of anti-inflammatory cytokines. Moreover, monocyte cells are unresponsive to LPS as a consequence of mechanisms that negatively regulate TLR-associated signaling (Biswas and Lopez-Collazo 2009; Cavaillon et al. 2005). Several studies point to the CD14+ CD16+ monocyte subset phenotype as responsible for the endotoxin-tolerant state in sepsis (Adib-Conquy et al. 2006; Blumenstein et al. 1997).

We found that CD14+ CD16+ monocyte cells were associated with endotoxin tolerance, characterized by low intracellular TNF production and TLR4 receptor expression in response to a second LPS stimulus. Notwithstanding, we found different levels of I κ B alpha degradation with LPS stimulation among our donors. Interestingly, in our endotoxin-tolerant monocytes, we found no significant changes in the MyD88/MyD88s ratio compared with single LPS-stimulus and unstimulated cells, suggesting that MyD88s does not participate in the induction of the endotoxin-tolerant phenotype. Shalova et al. (2012) reported an increased proportion of CD14+ CD16+ monocytes with an upregulated expression of TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- β (TRIF)-dependent genes such as IFN- β , CCL5, and CXCL10 in patients with Gram-negative sepsis. Additionally, the authors also showed evidence of a role for CD16 in the induction of negative regulators of the TLR4/MyD88 pathway, such as interleukin-1 receptor-associated kinase mouse monoclonal antibody (IRAKM) and interleukin-1-Receptor antagonist (IL1-RA).

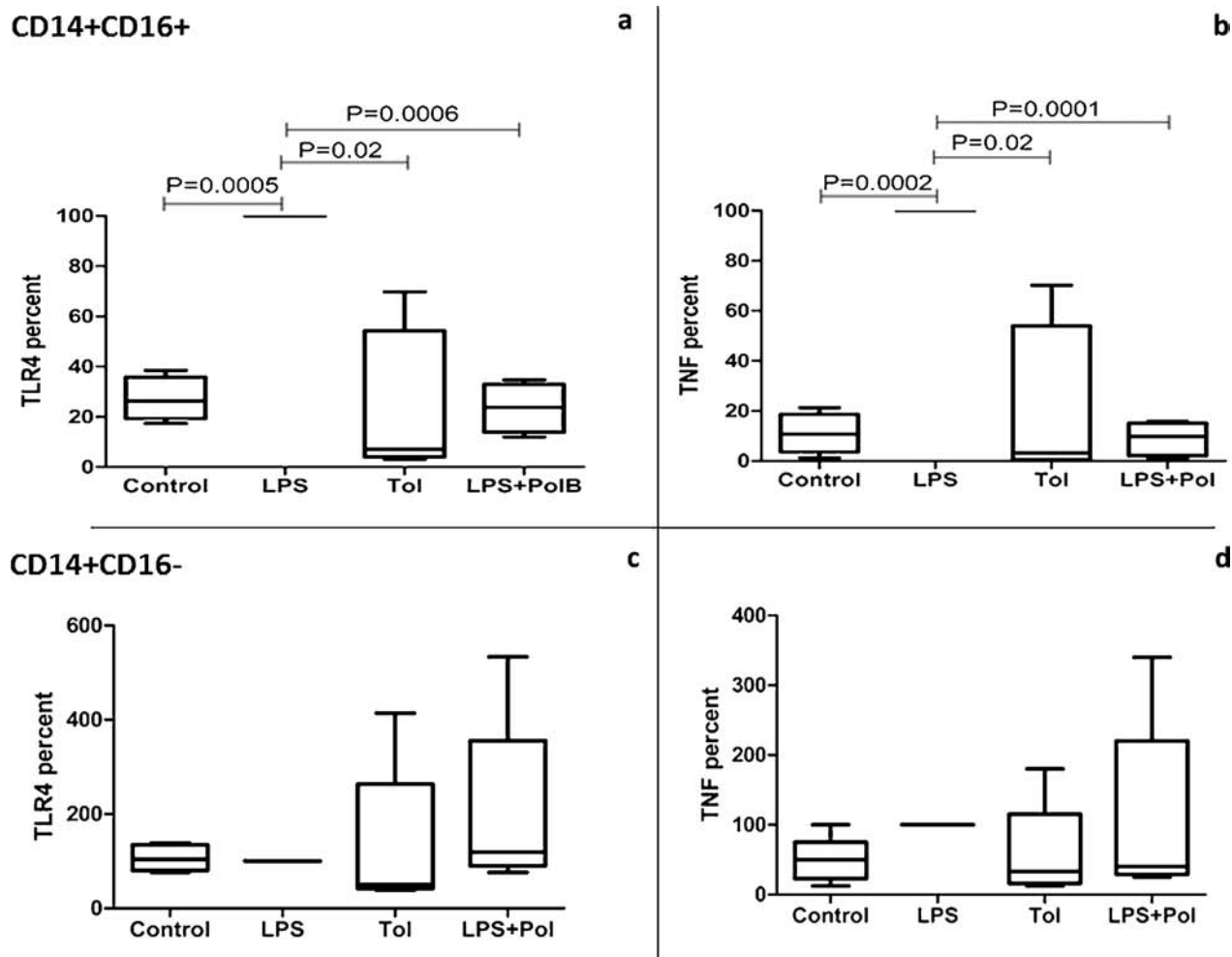


Fig. 8. Toll-like receptor 4 (TLR4) surface and Tumor necrosis factor (TNF) intracellular content in adherent human monocytes cells treated for 3 h with 10 ng/ml lipopolysaccharides (LPS), 10 ng/ml LPS + 10 μ g/ml polymyxin B, or presensitized (to generate the endotoxin-tolerant condition) with 10 ng/ml LPS 24 h before treatment for 3 h with 10 ng/ml LPS. After treatment, cells were stained with TLR4 (PECy7) and TNF (PE), and the expression of these proteins was determined by flow cytometry (FACS) analysis. Results are from five independent experiments. Whiskers correspond to minimal–maximal values. Data were normalized considering LPS value as 100% in each individual. P values are shown above each comparison line.

In that regard, when we analyzed CXCL10 production in our endotoxin-tolerant monocytes, we found elevated CXCL10 concentration in these cells. This is suggestive of a preferential MyD88 independent pathway in a refractory response to LPS in the tolerant phenotype. We cannot disregard the increase of MyD88 dependent cytokines (melanoma growth stimulatory activity) GRO- α , (monocyte chemotactic protein) MCP-1 and (interleukin-8) IL-8 in an endotoxin-tolerant model (Kaufmann et al. 2000). However, Kaufmann et al. did not mention which cellular population was involved in that tolerant state. Otherwise, their tolerant model like ours showed hypo responsiveness of TNF and MIP-1 β to a single LPS stimulus.

Certainly, more dedicated studies on CD16 monocytes, including classical and intermediate phenotypes, are necessary to clarify the role of that surface molecule possess in endotoxin tolerance and its associated signaling pathways.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D.Sc. degree for Aimée Domínguez-Nieto in the

Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México program. During the development of this project, AD-N was a fellowship recipient from the National Council of Science and Technology (CONACyT, grant 165493) and the Mexican Institute for Social Security (IMSS, grant 99091657) Mexico. Thanks to PhD Yolanda González for her cytometry technical support. The style review of the manuscript by Maggie Brunner, M.A., is greatly appreciated.

References

- Adib-Conquy, M., Adrie, C., Fitting, C., Gattoliat, O., Beyaert, R., Cavillon, J.M., 2006. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit. Care Med.* 34, 2377–2385.
- Belge, K.U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L., 2002. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 168, 3536–3542.
- Biswas, S.K., Lopez-Collazo, E., 2009. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30, 475–487.
- Blumenstein, M., Boekstegers, P., Fraunberger, P., Andreesen, R., Ziegler-Heitbrock, H.W., Fingerle-Rowson, G., 1997. Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* 8, 73–75.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., Tschopp, J., 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* 197, 263–268.

- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di, M.F., French, L., Tschopp, J., 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 12203–12209.
- Cavaillon, J.M., Adib-Conquy, M., 2006. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care* 10, 233.
- Cavaillon, J.M., Adrie, C., Fitting, C., Adib-Conquy, M., 2005. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J. Endotoxin Res.* 11, 311–320.
- Fan, H., Cook, J.A., 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J. Endotoxin Res.* 10, 71–84.
- Fingerle, G., Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Strobel, M., Ziegler-Heitbrock, H.W., 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82, 3170–3176.
- Janssens, S., Beyaert, R., 2002. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem. Sci.* 27, 474–482.
- Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., Beyaert, R., 2002. Regulation of interleukin-1 and lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by alternative splicing of MyD88. *Curr. Biol.* 12, 467–471.
- Kaufmann, A., Gemsa, D., Sprenger, H., 2000. Differential desensitization of lipopolysaccharide-inducible chemokine gene expression in human monocytes and macrophages. *Eur. J. Immunol.* 30, 1562–1567.
- Medvedev, A.E., Lentschat, A., Wahl, L.M., Golenbock, D.T., Vogel, S.N., 2002. Dysregulation of LPS-induced toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J. Immunol.* 169, 5209–5216.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., Mantovani, A., 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164, 5998–6004.
- Shalova, I.N., Kajiji, T., Lim, J.Y., Gomez-Pina, V., Fernandez-Ruiz, I., Arnalich, F., Iau, P.T., Lopez-Collazo, E., Wong, S.C., Biswas, S.K., 2012. CD16 regulates TRIF-dependent TLR4 response in human monocytes and their subsets. *J. Immunol.* 188, 3584–3593.
- Skrzeczynska, J., Kobylarz, K., Hartwich, Z., Zembala, M., Pryjma, J., 2002. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand. J. Immunol.* 55, 629–638.
- Takeda, K., Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14.
- Vassallo, M., Mercie, P., Cottalorda, J., Ticchioni, M., Dellamonica, P., 2012. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Viol. J.* 9, 174.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640–643.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M., Lutz, M.B., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80.

ANEXO 3

Universal ProbeLibrary for Human

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assay for:

[NM_000594.2](#) Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF), mRNA

Assay details:

Use Universal ProbeLibrary probe: #29, cat.no. 04687612001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	21	268 - 288	59	52	cagcctcttctccttctctgat
Right Primer	20	371 - 390	59	55	gccagagggctgattagaga
Amplicon (123 nt)					
cagcctcttctccttctctgatcgtggcaggcgccaccaagctcttctgacctgctgcactt tggagtgatcggccccagaggggaagagttccccagggacctctctctaatcagccctct ggc					

Download pack insert

PDF report

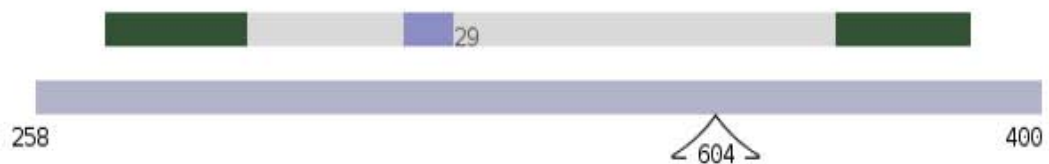
Text report

Order probes or set

Transcript overview:



Detailed view:



Universal ProbeLibrary for Human

ProbeFinder has designed the optimal real-time PCR assay for:

[L29382.1|L29382:EMBL|ENSG00000165704:Ensembl-Gn|ENST00000298556:Ensembl-Tr](#) Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA, 5' end.

Assay details:

Use Universal ProbeLibrary probe: #73, cat.no. 04688961001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	24	51 - 74	59	33	tgaccttgatttattttgcatacc
Right Primer	20	133 - 152	60	55	cgagcaagacgttcagtcct
Amplicon (102 nt)					
tgaccttgatttattttgcataccctaatacattatgctgaggatttggaagggtgtttat tcctcatggactaattatggacaggactgaacgtcttgctcg					

Download pack insert

PDF report

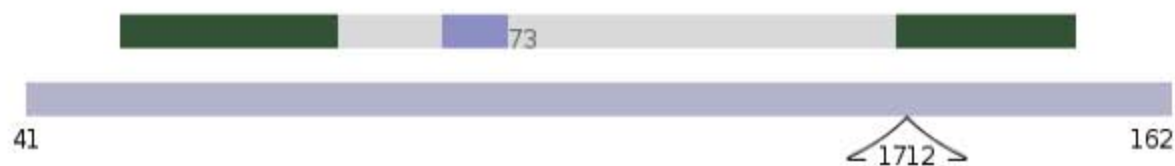
Text report

Order probes or set

Transcript overview:



Detailed view:



ABREVIATURAS Y GLOSARIO

AP1, Activator protein 1
Btk, Bruton's tyrosine kinase
CD11c/CD18, β leukocyte integrin
CD14, Cluster of differentiation 14
DD, Death domain
DEPC, Diethyl pyrocarbonate
ID, Intermediary domain
dNTP, Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT, Dithiothreitol
ERK, Extracellular-signal-regulated kinases
FACS, Fluorescence-activated cell sorting
GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMFI, Geometric mean fluorescence intensity
GRO- α , melanoma growth stimulatory activity
HPRT, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HRP, Horseradish peroxidase
IFN- β , Interferon β
IKKs, I κ B kinases
IL Interleukin
IP-10, Interferon gamma-induced protein 10
IRAK, Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRAK-M, interleukin-1 receptor-associated kinase M
IRF-3, Interferon regulatory factor 3
I κ B, Inhibitor of κ B
JNK, c-Jun N-terminal kinases
LBP, Lipopolysaccharide binding protein
LPS, Lipopolysaccharide
mRNA, Messenger RNA
MAP'k, Mitogen-activated protein kinases
mCD14, Membrane CD14
MCP-1, Monocyte chemotactic protein-1
MIP, Macrophage Inflammatory Protein
MSP, monocitos de sangre periférica
MyD88, Myeloid differentiation primary response gene 88
MyD88s, splice variant of MyD88
NF- κ B, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
p38, Mitogen-activated protein kinase
PBS, Phosphate buffered saline
PolB, PolimixinaB
PVDF, Polyvinylidene fluoride
rtPCR, real time PCR

RANTES, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RT, reverse transcription
sCD14, Soluble CD14
SIGIRR, Single Ig IL-1-related receptor
SOCS1, Suppressor of cytokine signaling 1
ST2, member of the TIR domain-containing superfamily
TAB1, TAK1 binding protein 1
TAB2, TAK1 binding protein 2
TAK1, TGF- β activated kinase
TBK1, Serine/threonine-protein kinase TBK1
TBS, Tris-buffered saline
TIR, Toll/interleukin-1 receptor homology domain
TIRAP, TIR domain-containing adapter protein
TLR, Toll like receptor
TNF, Tumor necrosis factor
TRAF-6, TNF receptor associated factor 6
TRAM, TRIF-related adaptor molecule
TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UPL, Universal Probe Library