



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**PARTICIPACIÓN DE LA INTERLEUCINA 17 EN LA
DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS Y SU IMPLICACIÓN EN LA
FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS**

TESIS

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

PRESENTA:

MARÍA DE LA PAZ SÁNCHEZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

VOCAL: **Profesor: Julio Cesar Martínez Álvarez**

SECRETARIO: **Profesor: Luis Chávez Sánchez**

1° SUPLENTE: **Profesor: Gibrán Pérez Montesinos**

2° SUPLENTE: **Profesor: Octavio Castro Escamilla**

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

ASESOR DEL TEMA:

DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ

SUSTENTANTE:

MARÍA DE LA PAZ SÁNCHEZ MARTÍNEZ

Este trabajo fue financiado por el programa del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número FIS/IMSS/PROT/G13/1221.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | i |
| Índice de figuras | iv |
| Introducción | 1 |
| Marco teórico | 2 |
| Enfermedades cardiovasculares..... | 2 |
| Lipoproteína de baja densidad..... | 3 |
| Aterosclerosis y el desarrollo de la placa aterosclerosa..... | 4 |
| Macrófagos en aterosclerosis..... | 7 |
| Interleucina-17 y su receptor..... | 8 |
| <i>Señalización del complejo IL-17RA e IL-17RC por la IL-17.</i> | 9 |
| Participación de interleucina-17 en la enfermedad..... | 11 |
| Planteamiento del problema | 12 |
| Objetivos | 13 |
| <i>Objetivo general.</i> | 13 |
| <i>Objetivos particulares.</i> | 13 |
| Hipótesis | 14 |
| Diseño experimental | 15 |
| Tipo de estudio..... | 15 |
| Población de estudio..... | 15 |
| Criterios de inclusión..... | 15 |
| Criterios de Exclusión..... | 15 |
| Criterios de Eliminación..... | 15 |
| Variables independientes..... | 16 |
| Variables dependientes..... | 18 |
| Metodología | 20 |
| Obtención de lipoproteína de baja densidad..... | 20 |
| Análisis de la LDL..... | 20 |
| Oxidación de la lipoproteína de baja densidad..... | 20 |
| Determinación del grado de oxidación de la lipoproteína de baja densidad..... | 21 |
| Detección de endotoxinas en la lipoproteína de baja densidad..... | 21 |
| Obtención de células mononucleares..... | 21 |

| | |
|---|----|
| Purificación de monocitos humanos por selección negativa..... | 22 |
| Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos..... | 22 |
| Estimulación para la formación de células espumosas..... | 23 |
| Determinación de la expresión de moléculas de superficie en macrófagos..... | 23 |
| Citometría de flujo..... | 23 |
| Evaluación de la formación de células espumosas..... | 23 |
| Análisis estadístico..... | 24 |
| Diagrama | 25 |
| Resultados | 26 |
| Estrategia de análisis de marcadores de superficie en macrófagos..... | 26 |
| Efecto de la IL-17 en la diferenciación de macrófagos en comparación con el fenotipo de macrófagos M1..... | 28 |
| Efecto de la IL-17 en macrófagos en comparación con el fenotipo de macrófagos M2..... | 29 |
| Participación/acción de macrófagos M1 en la formación de células espumosas..... | 30 |
| Participación de macrófagos M2 en la formación de células espumosas..... | 30 |
| Participación de los macrófagos diferenciados con la IL-17 en la formación de células espumosas. 10,20,31,65..... | 30 |
| Determinación de TLR2 y TLR4 en macrófagos M1, M2 y diferenciados con IL-17..... | 32 |
| Expresión de CD80, CD86 y HLA-DR en macrófagos M1 y diferenciados con IL-17 en presencia de la LDLox..... | 33 |
| Expresión de CD36 y CD206 en macrófagos M2 y diferenciados con IL-17..... | 34 |
| Determinación de TLR2 y TLR4 en macrófagos estimulados con LDLox..... | 35 |
| Discusión | 36 |
| Conclusiones | 38 |
| Perspectivas | 39 |
| Referencias | 40 |

Abreviaturas

| | |
|--------------------------------|---|
| Act1 | Activador 1 |
| Apo | Apolipoproteína |
| APC | Aloficocianina |
| BSA | Albúmina Sérica Bovina |
| c/EBP | Proteína de unión a promotor CCAAT |
| CCR | Receptor de quimiocinas |
| CD | Grupo de diferenciación |
| ECV | Enfermedades cardiovasculares |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| g | Gramo |
| GM-CSF | Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos |
| HLA | Antígeno de Leucocitos Humanos |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| IAM | Infarto Agudo del Miocardio |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular-1 |
| IFN-γ | Interferón- γ |
| IκB | Inhibidor del factor nuclear kappa-Beta |
| IKK | Cinasa de I κ B |
| IL | Interleucina |
| IMF | Intensidad Media de Fluorescencia |
| iNOS | Óxido Nítrico Sintetasa inducible |
| IRAK | Cinasa asociada al receptor de interleucina |
| IRF | Factor Regulatorio de Interferón |
| JNK | Cinasa Jun N terminal |
| KBr | Bromuro de potasio |
| KDa | Kilo Dalton |

| | |
|------------------------|--|
| LAL | Lisado de Amebocitos de Lymulus |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| LDL_n | Lipoproteína de baja densidad nativa |
| LDLox | Lipoproteína de baja densidad oxidada |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MAPK | Proteína cinasa activada por mitógeno |
| M-CSF | Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos |
| MCP-1 | Proteína quimiotáctica de monocitos 1 |
| MDA | Malonaldehído |
| MHC | Complejo Principal de Histocompatibilidad |
| MIP-2 | Proteína Inflamatoria de Macrófagos-2 |
| μg | microgramo |
| μl | microlitro |
| ml | mililitro |
| MMP | Metaloproteinasas de matriz |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| MyD88 | Gen de la respuesta primaria para diferenciación mieloide 88 |
| NFκB | Factor Nuclear κ-B |
| NK | Células asesinas naturales |
| NKT | Células asesinas naturales T |
| nm | nanometros |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| Pam3CSK4 | Lipopéptido sintético tripalmitoilatado |
| PAMP | Patrones Moleculares Asociados a Patógenos |
| PECAM-1 | Molécula de Adhesión de Plaquetas a Células Endoteliales-1 |
| PBS | Regulador de Fosfato Salino |
| PE | Ficoeritrina |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RORγt | Del inglés, “RAR-Related Orphan Receptor γt” |
| ROS | Especies Reactivas de Oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |

| | |
|--------------------------------|---|
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SMC | Células del músculo liso |
| TBA | Ácido 2-tiobarbitúrico |
| TBK1 | Cinasa de unión a TANK1 |
| TCR | Receptor de Células T |
| Th | Célula T cooperadora |
| TIR | Dominio homólogo al receptor Toll/ Interleucina-1 |
| TIRAP | Proteína adaptadora del dominio TIR |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante- β |
| TLR | Receptor Tipo Toll |
| TNF-α | Factor de Necrosis Tumoral- α |
| TRAF | Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral |
| TRIF | Proteínas adaptadoras asociadas al dominio TIR inductoras de interferón |
| VCAM | Molécula de Adhesión de Células Vasculares |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |

Índice de figuras

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Estructura de la lipoproteína de baja densidad. | 3 |
| Figura 2 | Desarrollo de la placa aterosclerosa. | 6 |
| Figura 3 | Familia de receptores de IL-17. | 9 |
| Figura 4 | Representación esquemática de las vías de señalización del complejo IL-17RA/IL-17RC. | 10 |
| Figura 5 | Estrategia para la identificación de macrófagos con base en la expresión de CD80. | 27 |
| Figura 6 | Expresión de moléculas de superficie características de macrófagos M1: CD80, CD86 y HLA-DR. | 28 |
| Figura 7 | Expresión de moléculas de superficie características de macrófagos M2. | 29 |
| Figura 8 | Formación de células espumosa en los diferentes tipos de macrófagos. | 31 |
| Figura 9 | Expresión de TLR2 y TLR4 en los diferentes tipos de macrófagos. | 32 |
| Figura 10 | Expresión de moléculas de superficie CD80, CD86 y HLA-DR en macrófagos estimulados con LDLox. | 33 |
| Figura 11 | Expresión de moléculas de superficie CD36 y CD206 en los diferentes tipos de macrófagos estimulados con LDLox. | 34 |
| Figura 12 | Expresión de TLR2 y TLR4 en los diferentes tipos de macrófagos después de la estimulación con LDLox. | 35 |

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en México y comprenden trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Estas incluyen un amplio grupo de padecimientos que comprenden la cardiopatía isquémica, la cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca, entre otras. La aterosclerosis es la principal causa que contribuye al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. La aterosclerosis es considerada un padecimiento inflamatorio crónico, en la cual las citocinas son esenciales. En este sentido, se ha demostrado que la IL-17 favorece el desarrollo de la placa aterosclerosa. También, existe evidencia que la IL-17 induce una reducción de CCR2 y CXCR4 en monocitos, así como un incremento en la expresión en los genes de IL-1, IL-6, CCL2 y CCL8 entre otros, en macrófagos. Estos resultados sugieren un efecto pro-inflamatorio de la IL-17 en monocitos/macrófagos.

A pesar de la evidencia existente se desconoce si la IL-17 afecta la diferenciación de macrófagos, así como su papel en la formación y activación de células espumosas. Por esta razón, el proyecto se dirige a contestar la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de la IL-17 en la diferenciación de macrófagos y en la formación de células espumosas?

Marco teórico

Enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Estas incluyen un amplio grupo de padecimientos que comprenden la cardiopatía isquémica, la cardiopatía coronaria, cardiopatía congénita, enfermedades cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca, arteriopatías periféricas, trombosis venosas profundas y embolias pulmonares entre otras [1]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECV son las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo [2]. En 2012 fueron responsables de 17,5 millones de muertes, que representan el 46% de las muertes por enfermedades no transmisibles en todo el mundo. De estas muertes, se estima que 7,4 millones se debieron a ataques al corazón (cardiopatía isquémica) y 6,7 millones se debieron a accidentes cerebrovasculares [3]. En México en 2013 el 24% de las muertes ocurridas fueron a causa de enfermedades cardiovasculares, ocupando el primer lugar de causa de muerte, siendo las principales las enfermedades isquémicas del corazón. Respecto con grupos de edad, las ECV ocupan el primer lugar de muerte en adultos mayores de 65 años; el tercer lugar en los adultos de 45-64 años y el quinto en personas de 25-44 años [4]. Predicciones futuras de la OMS sugieren que en 2030 el número de muertes por ECV podría llegar a 23,3 millones [5].

Los factores de riesgo asociados con las ECV son: dislipidemias, diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo, síndrome metabólico, obesidad e inactividad física, además de algunas infecciones por microorganismos tales como citomegalovirus y *Chlamydia pneumoniae*, entre otros [6-8]; de estos, las dislipidemias y en particular niveles elevados de colesterol total en suero y elevadas concentraciones de lipoproteína de baja densidad (LDL), así como bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), han cobrado importancia como uno de los factores más importantes de riesgo de aterosclerosis.

Lipoproteína de baja densidad.

Las lipoproteínas son estructuras de naturaleza proteica conjugadas con lípidos, es decir, con una parte proteica o apoproteína y un grupo prostético de naturaleza lipídica [9], lo que les confiere ser moléculas anfipáticas y debido a esta propiedad pueden transportar partículas hidrofóbicas, por lo que su función principal consiste en el transporte de lípidos en el organismo a través del sistema circulatorio [10]. La LDL es una molécula esférica con 2nm de diámetro y 2500 KDa de peso molecular, esta proteína consiste en un núcleo hidrofóbico de alrededor de 1600 moléculas de ésteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos rodeada por una monocapa superficial de 700 moléculas de fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina, y 600 moléculas de colesterol libre, embebida en la monocapa se localiza la apolipoproteína B-100 (ApoB-100), constituida de 4536 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 500 KDa, la cual es susceptible a oxidación [11,12].

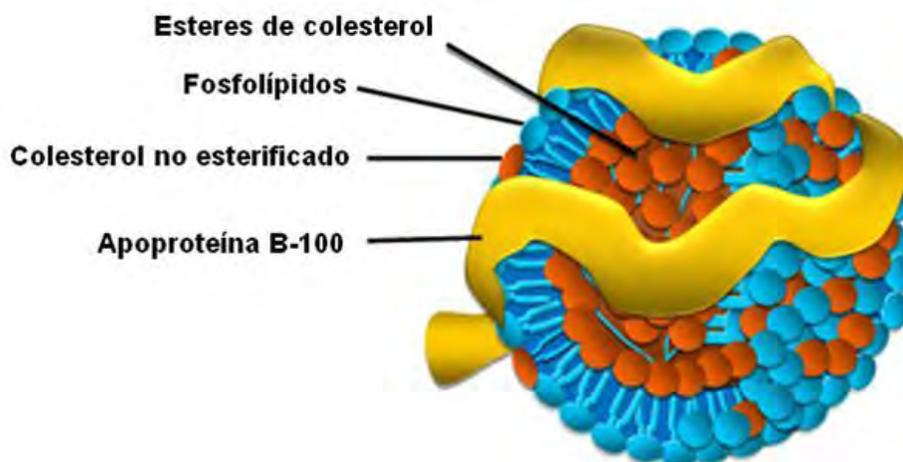


Figura 1. Estructura de la lipoproteína de baja densidad. La LDL es una molécula esférica compuesta por la ApoB-100, fosfolípidos, ésteres de colesterol y colesterol no esterificado [modificado de 11].

Aterosclerosis y el desarrollo de la placa aterosclerosa.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que puede afectar todas las arterias, particularmente cardíacas, cerebrales y renales [6]. El proceso aterogénico inicia con la disfunción endotelial, que representa uno de los primeros estadios en la patogénesis. La primera fase consiste en una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio (anti-adhesiva, anti-agregante, anti-proliferativa, anti-oxidante, anti-trombótica y reguladora del tono vaso motor) y como consecuencia (en presencia de un endotelio disfuncional) se observa la expresión de moléculas de adhesión tales como las selectinas (E y P), moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales (PECAM-1)-1, moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM) mediante las cuales se produce la interacción entre los monocitos circulantes con las células endoteliales (figura 2A) [7,14,15]; además, las células del endotelio liberan quimioatrayentes como la CCL2, CCL5, CXCL10 y CX3CL1 [7,31]; que estimulan la migración de monocitos al sitio de la lesión [7]. Estos cambios tempranos que preceden a la formación de la lesión aterosclerosa incluyen un aumento en la permeabilidad endotelial a la LDL que es retenida por interacciones de los grupos positivos de lisina y arginina que interactúan con cargas negativas de grupos sulfatos de cadenas de glicosaminoglicanos de proteoglicanos. La LDL es modificada por lipoperoxidación en el espacio subendotelial por especies reactivas de oxígeno (ROS), generándose una forma oxidada de LDL con propiedades quimioatrayentes de monocitos y linfocitos; el aumento de partículas de LDL en el espacio subendotelial inicia la formación de la placa aterosclerosa [7,8].

En la lesión existe un infiltrado de macrófagos que expresan en su superficie celular receptores “scavenger” clase A tipo I y II, clase B y CD36 mediante los cuales identifican y endocitan partículas de LDL modificada oxidativamente y se transforman en células espumosas (figura 2B) [16], que se acumulan para crear estrías grasas que posteriormente inducirán los ateromas [17].

El proceso inflamatorio estimula la migración de células del musculo liso (SMC) desde la capa media hasta la íntima, en donde secretan agentes quimiotácticos que atraen más células inflamatorias. Además, las SMC sintetizan matriz extracelular, lo que provoca la progresión de la placa [18]. Otro evento que se inicia es la muerte celular de macrófagos por interferón (IFN)- γ que puede ser generada por la acumulación de lípidos promoviendo el avance del núcleo necrótico en la placa (figura 2C).

En la última etapa de la aterosclerosis ocurre ruptura o ulceración de la placa fibrosa; la vulnerabilidad de la placa se origina por un adelgazamiento de la lesión y ocurre por inhibición de la secreción de matriz proveniente de células musculares lisas a través de IFN- γ secretado por linfocitos T, los macrófagos degradan la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa intersticial, gelatinasa y estromilisina. La degradación de la capa fibrosa frecuentemente se origina en los hombros de la lesión y puede conducir a una hemorragia, donde las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo y la oclusión de la arteria (figura 2D) [7,8].

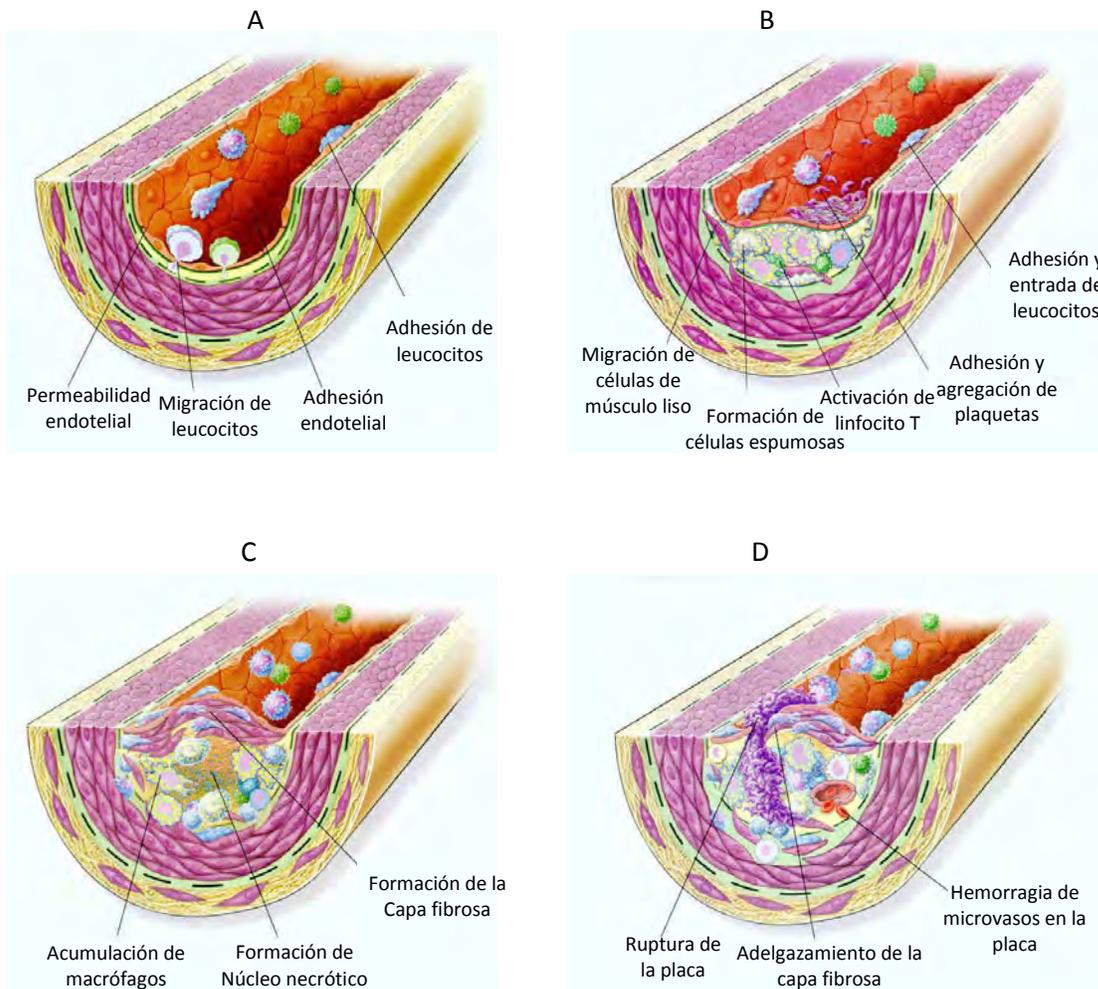


Figura 2. Desarrollo de la placa aterosclerosa. (2A) La lesión se origina por un daño al endotelio, lo que permite un incremento en la permeabilidad endotelial, ocasionando la migración y adhesión de leucocitos. (2B) En la siguiente etapa de la lesión, las células de músculo liso migran a la lesión, los macrófagos se transforman a células espumosas, los linfocitos T presentes se activan, las plaquetas se adhieren y agregan a la lesión y continúa el arribo de leucocitos. (2C) En la lesión ocurre una acumulación de macrófagos los cuales mueren por apoptosis o necrosis, generándose el núcleo necrótico y formación de la capa fibrosa. (2D) En las etapas finales la lesión sufre un adelgazamiento de la capa fibrosa, ruptura de la placa y hemorragias de microvasos [modificado de 8].

Macrófagos en aterosclerosis.

Los macrófagos pueden derivar de los monocitos o provenir de un progenitor mieloide-eritroide que se desarrolla en el saco vitelino durante el desarrollo embrionario. Los macrófagos se encuentran en diversos tejidos donde muestran una amplia diversidad funcional en la biología del organismo que incluyen: homeostasis, reparación de tejidos y respuesta inmune, y resultan ser una población celular altamente heterogénea que puede cambiar rápidamente sus funciones en respuesta a señales del microambiente local. Con respecto a esto último, el IFN- γ en combinación con lipopolisacárido (LPS) o con factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) inducen la activación clásica de macrófagos (macrófagos M1). Por otro lado, los macrófagos activados alternativamente (macrófagos M2) pueden ser inducidos con; IL-4 o IL-13 (M2a), complejos inmunes o glucocorticoides (M2b), IL-10 o TGF- β (M2c). En particular, utilizamos M2 como un nombre genérico para las diversas formas de macrófagos activados alternativamente. Los macrófagos M1 secretan altos niveles de IL-12, IL-23 y bajos niveles de IL-10. También, los macrófagos M1 expresan niveles elevados de CD80 y CD86. Mientras tanto los macrófagos M2 producen IL-10 y bajos niveles de IL-12, además expresan CD36 y receptor de manosa (CD206) entre otros, por lo que son considerados células anti-inflamatorias [19-23].

Los macrófagos son esenciales en todas las etapas de la aterosclerosis. Durante el desarrollo temprano de la aterosclerosis en el ratón hay un predominio de macrófagos M2 y se sugiere que tienen un efecto ateroprotector debido a que las lesiones aterosclerosas son pequeñas. En contraste en estados avanzados de la aterosclerosis en el ratón predominan los macrófagos M1, los cuales expresan altos niveles de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) lo que contribuye al desarrollo de la placa [24]. También, los macrófagos M1 podrían causar la vulnerabilidad de la placa debido a que se encuentran localizados en las regiones de los hombros de placa y secretan metaloproteinasas (MMP) como la MMP-1 y la MMP-10 que pueden causar la ruptura de la placa y subsecuentemente infarto agudo del miocardio (IAM) [25]. Las subpoblaciones de macrófagos también son cruciales en

la formación de células espumosas. Al respecto los macrófagos M2 rápidamente acumulan LDLox, pero no los macrófagos M1, estos resultados sugieren que los macrófagos M2 podrían contribuir también en el desarrollo de la placa aterosclerosa [26]. Más aún la diferenciación de los macrófagos puede ser afectada por las distintas citocinas que se encuentran en el microambiente como la IL-17.

Interleucina-17 y su receptor.

Las células Th17 producen diversas citocinas, la más estudiada es la IL-17A (IL-17), la cual también es secretada por macrófagos, células dendríticas, células NK, células NKT y células T $\gamma\delta$ [27].

Actualmente se conoce que existen 6 moléculas de la familia IL-17: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F, estas moléculas se presentan como homodímeros, además del heterodímero IL-17A/F. El producto del gen de la IL-17A humano es una proteína de 150 aminoácidos con un peso molecular de 15 kDa y se secreta como un homodímero de 30 a 35 kDa unido por puentes disulfuro [28]. El homodímero IL-17A/A, es quien tiene una mayor actividad, seguido por el heterodímero IL-17A/F. Esta familia de citocinas, provee una nueva vía de comunicación entre la inmunidad innata y adaptativa [28,29].

Los efectos biológicos de la IL-17 son mediados por la interacción con su receptor, el cual es una glicoproteína transmembranal de tipo I, que se encuentra ampliamente distribuido en distintos tejidos y células del sistema inmune como: monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y neutrófilos [28,29]. Hasta la fecha se han descrito cinco miembros de receptores para la familia de la IL-17 e incluye al receptor para IL-17 (IL-17RA), y los receptores IL-17RB, IL-17RC, IL-RD e IL-17RE (figura 2) [30].

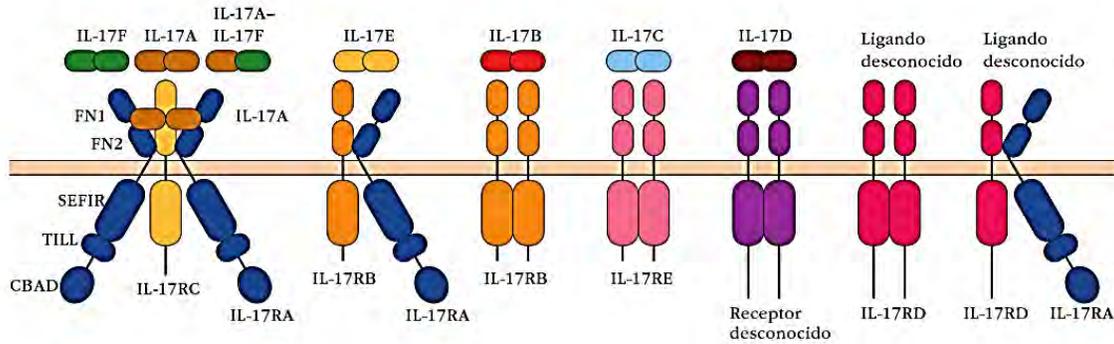


Figura 3. Familia de receptores de IL-17. Se han identificado seis miembros de la familia de citocinas de IL-17 (IL-17A a la IL-17F) y cinco proteínas que constituyen la familia de receptores de la IL-17 (IL-17RA al IL-17RE). Los receptores forman complejos a través de los cuales reconocen sus ligandos, estos se encuentran dispuestos en homodímeros, heterodímeros y trímeros. Cada proteína de receptor incluye uno o más dominios de fibronectina (FN), así como un dominio SEF/IL-17R (*SEFIR*) citoplasmático. La proteína IL-17R también incluye un dominio tipo TIR (*TILL*). El receptor para IL-17D se desconoce, así como los ligandos para para el IL-17RD o para el complejo conformado por el IL-17RD/IL-17RA [modificado de 32].

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

La IL-17 induce la activación de un complejo heterodimérico conformado por los receptores IL-17RA e IL-17RC. Posteriormente, en el dominio intracelular SEFIR y TILL de los receptores de IL-17, se recluta Act1 que actúa como una molécula adaptadora que se asocia a TRAF6, entonces la auto-poliubiquitinación de TRAF6 permite la asociación con el complejo TAK1 (TAK1-TAB2-TAB3), activando el complejo IKK para la activación de NF- κ B. TRAF6 es también requerido para la activación de JNK inducido por la IL-17. La señalización de NF- κ B por la IL-17 suprime la expresión de miR-23b para detener su efecto supresor sobre sus blanco TAB2 y TAB3, ocasionando un incremento en la activación de NF- κ B. También, se requiere de Act1 para la activación de C/EBP. Act1 señala de manera independiente de TRAF6 pero dependiente de TRAF2 y TRAF5 y se denomina la vía dependiente para la estabilización de mRNA de múltiples genes. En condiciones normales SF2 se une al mRNA provocando su degradación. Sin embargo, la

estimulación de IL-17 induce el reclutamiento de SF2 al complejo Act1/TRAF5/TRAF2 induciendo la liberación y estabilización del mRNA. La cinasa IKKi media la asociación de Act1 o TRAF5 a través de la fosforilación directa de la serina 311 de Act1 [323]. La activación de esta vía de señalización induce la producción de moléculas pro-inflamatorias como CXCL1 e IL-1 [34]. Por otro lado, la señalización de IL-17RA/IL17RC por la IL-17 es desregulada por la proteína HSP90, la cual interactúa con Act1, lo que ocasiona una desregulación de la activación de la vía de señalización de complejo IL-17RA/IL17RC por la IL-17 [3332]. Otro mecanismo de regulación se induce a través del receptor soluble IL-17RA, el cual inhibe selectivamente la actividad de IL-17, mientras que el receptor soluble IL-17RC inhibe a IL-17F (figura 4) [35].

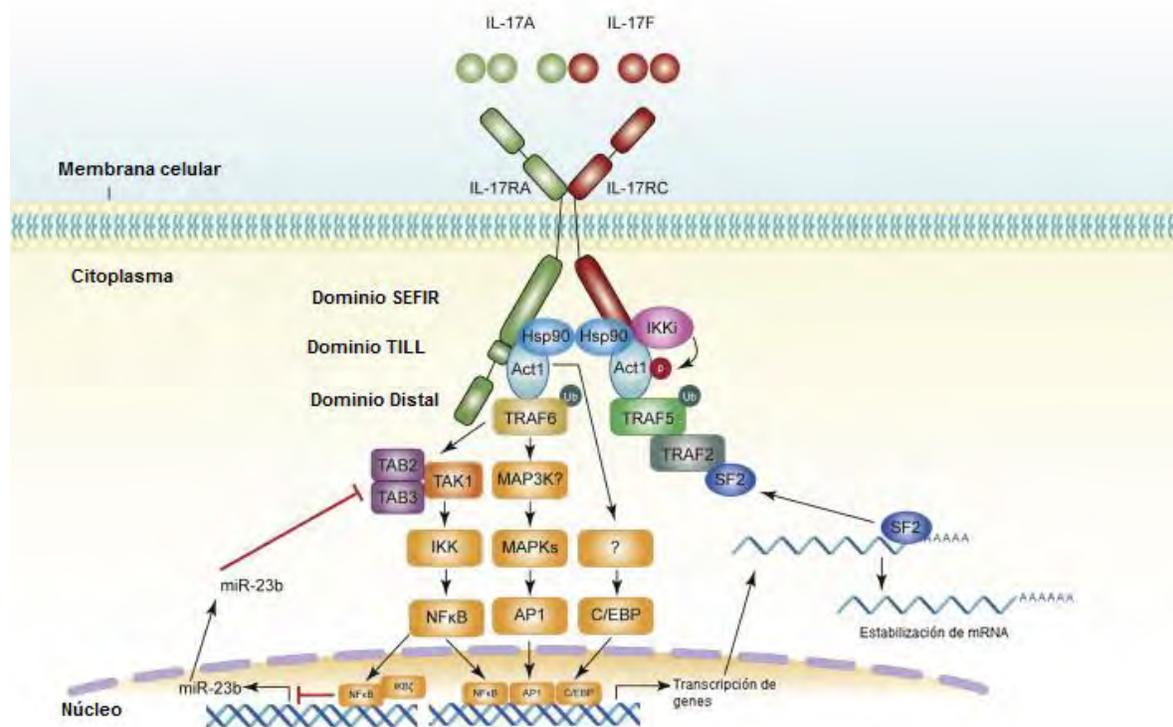


Figura 4. Representación esquemática de las vías de señalización del complejo IL-17RA/IL-17RC. La señalización del complejo IL-17RA/IL-17RC se inicia cuando reconocen a la IL-17. El complejo IL-17RA/IL-17RC señala a través de la vía dependiente de TRAF6 e inician una compleja señalización la cual involucra diversas proteínas, resultando en la activación de NF-κB lo que genera la

expresión de citocinas pro-inflamatorias. También, el complejo IL-17RA/IL-17RC señala a través de una vía independiente de TRAF6 pero dependiente de TRAF2 y TRAF5 lo cual desencadena la estabilización de mRNA de múltiples genes (Act1: activador 1; TRAF: factor asociado al receptor factor de necrosis tumoral (TNF)- α ; IKKi: cinasa de I κ B; I κ B: Inhibidor del factor nuclear kappa.B; NF- κ B: Factor nuclear κ B; MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos; c/EBP: proteína de unión a promotor CCAAT; ERK: cinasa regulada por señal extracelular [modificado de 31].

Participación de interleucina-17 en la enfermedad.

En las enfermedades inflamatorias y autoinmunes en humanos y modelos animales se ha establecido que la IL-17 es uno de los principales actores en la respuesta inflamatoria. En este contexto, se ha descrito la presencia de linfocitos Th17 en las placas aterosclerosas de humanos [36]. Inclusive, el incremento de la frecuencia de linfocitos Th17 correlaciona con la severidad y la progresión de la aterosclerosis en ratones y humanos [37,38]. Además, el número de linfocitos Th17 en sangre periférica se encuentra elevado en pacientes con IAM y se ha descrito una asociación entre los niveles de IL-17 y la severidad de la enfermedad cardiovascular [36-39]. Sin embargo, el papel de la IL-17 es controversial, estudios *in vivo* en ratones han establecido que la atenuación de la IL-17 inhibe el desarrollo de la placa aterosclerosa a través de una disminución en las moléculas de adhesión como VCAM-1 y de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, y TNF, así como una disminución en el infiltrado celular particularmente de macrófagos [40], en la placa. En contraste, otros autores sugieren que la deficiencia de IL-17 acelera la formación de una placa inestable en ratones propensos a desarrollar aterosclerosis [41]. A pesar de las evidencias existentes no se tiene evidencia clara del efecto de la IL-17 en la diferenciación de macrófagos, así como en la formación y activación de células espumosas; por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál será el efecto de la IL-17 en la diferenciación de macrófagos humanos y en la formación de células espumosas?

Planteamiento del problema

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica que involucra la respuesta inmune innata y adaptativa. Múltiples evidencias han demostrado que la IL-17 juega un papel en la respuesta inmune en la salud, a través de la activación de monocitos y macrófagos induciendo la migración y producción de citocinas para la eliminación de hongos y bacterias patógenas. Sin embargo, el papel de la IL-17 en la aterosclerosis está poco entendido; más aún se desconoce cómo la IL-17 afecta la diferenciación de macrófagos y formación de células espumosas; por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál es el efecto que juega la IL-17 en la diferenciación de macrófagos y en la formación de células espumosas?

Objetivos

✧ *Objetivo general.*

Determinar si la IL-17 induce la diferenciación de macrófagos y si modula la formación de células espumosas.

✧ *Objetivos particulares.*

- ✓ Determinar la diferenciación de macrófagos al estímulo de la IL-17.
- ✓ Determinar la expresión de diferentes moléculas de superficie en macrófagos inducidos con la IL-17.
- ✓ Evaluar la formación de células espumosas en presencia de IL-17.
- ✓ Determinar la activación de células espumosas a través de la expresión de moléculas de superficie.

Hipótesis

La IL-17 afectará de manera diferencial la expresión de las moléculas de superficie HLA-DR, CD80, CD86, CD206 y CD36; además afectará la formación y activación de células espumosas en macrófagos de sujetos sanos.

Diseño experimental

Tipo de estudio.

Se realizó un estudio experimental.

Población de estudio.

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

Criterios de inclusión.

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

Criterios de Exclusión.

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

Criterios de Eliminación.

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

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

Variables independientes.

I. Células provenientes de los donadores: Sujetos sanos.

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal

II. Interleucina 4 (IL-4).

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

Definición conceptual: es una citocina pleiotrópica producida por células T activadas, participa en la regulación de respuestas inmunes, en el reclutamiento de mediadores de crecimiento celular, y en la diferenciación de células T y macrófagos.

Definición operacional: citocina recombinante humana, utilizada para la diferenciación de macrófagos M2 durante 24 horas a una concentración de 50 ng/ml.

III. Interleucina 17 (IL-17).

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

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

Definición operacional: citocina recombinante humana, utilizada para estimular a los macrófagos durante 6 días a una concentración de 60 ng/ml.

IV. Interferón gamma (IFN- γ).

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

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

Definición operacional: citocina recombinante humana, utilizada para estimular a los macrófagos durante 6 días a una concentración de 25 ng/ml.

V. *Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).*

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

Definición conceptual: es un factor de crecimiento hematopoyético y un modulador inmune. Es producida por una variedad de tipos de células incluyendo las células T, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos.

Definición operacional: citocina recombinante humana, utilizada para estimular a los macrófagos durante 6 días a una concentración de 40 ng/ml.

VI. *Lipopolisacárido (LPS).*

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

Definición conceptual: es una molécula glicolípídica anclada a la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeñan una importante función en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante de este tipo de bacterias.

Definición operacional: molécula glicolípídica, utilizada para estimular a los macrófagos durante 6 días a una concentración de 100 ng/ml.

VII. *Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).*

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

Definición conceptual: citocina producida por una serie de células, incluyendo fibroblastos, monocitos, macrófagos activados, células epiteliales, células endoteliales activadas por LPS o citocinas, y células estromales de médula ósea. Es el principal regulador de la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de los macrófagos.

Definición operacional: citocina recombinante humana, utilizada para estimular a los macrófagos durante 6 días a una concentración de 50 ng/ml.

VARIABLES DEPENDIENTES.

I. Molécula CD36.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Definición conceptual: receptor de LDLox.

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

II. Molécula CD80.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua

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

Definición operacional: molécula analizada a través de anticuerpos anti-CD80 por citometría de flujo.

III. Molécula CD86.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

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

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

IV. Molécula CD206.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Definición conceptual: receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que pertenece a la superfamilia de lectina tipo C.

Definición operacional: molécula analizada a través de anticuerpos anti-CD206 por citometría de flujo.

V. Molécula HLA-DR.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Definición conceptual: molécula involucrada en la presentación de antígeno.

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

VI. Molécula TLR2.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Definición conceptual: receptor para LPS, peptidoglicano entre otros.

Definición operacional: molécula analizada a través de anticuerpos anti-TLR2 por citometría de flujo.

VII. Molécula TLR4.

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de variable: Cuantitativa continua.

Definición conceptual: receptor para LPS.

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

Metodología

Obtención de lipoproteína de baja densidad.

La LDL se obtuvo a partir de plasma humano de donadores sanos, la cual se ajustó a una densidad de 1.2 g/ml con KBr (J.T. Baker), posteriormente se colocaron 2.5 ml de plasma (densidad: 1.2 g/ml) y 2.5 ml de solución salina (densidad: 1.006g/ml) libre de pirógenos en ocho tubos y se centrifugaron durante 4 horas a 80,000 rpm a 4°C en microultracentrifuga (Sorvall Discovery M150 SE en rotor S80ST3). Posteriormente, se separó la fase superior correspondiente a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) localizada a una densidad de 1.006 g/ml. El resto del volumen se le adicionaron 2 ml de solución salina a una densidad de 1.065 g/ml usando KBr (J.T. Baker), se homogenizó. Tras esto se realizó una segunda centrifugación durante 4 horas a 80,000 rpm a 4°C. Finalizado el tiempo de centrifugación se separó la fase superior la cual corresponde a la LDLn, esta se recuperó en una membrana de nitrocelulosa (Sigma) y se dializó contra 1 litro de SSI a un pH de 7.4 toda la noche a 4°C.

Análisis de la LDL.

El análisis del colesterol total se realizó por el método de colesterol esterasa y oxidasa de colesterol (Dade Behring, Deerfiel, Illinois, USA). La concentración de triglicéridos se determinó por la actividad de la glicerol cinasa (Dade, Behring). Para la medición de la lipoproteína de alta densidad (HDL), se aplicó la técnica de precipitación de sulfodextrano y sulfato de magnesio (Dade Behring).

La concentración de LDL se obtuvo empleando la fórmula de Friedewald:

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{trigliceridos}/5)$$

Oxidación de la lipoproteína de baja densidad.

La oxidación de la proteína se llevó a cabo mediante la adición de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mM (Sigma-Aldrich) a una concentración final de $10\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación la proteína oxidada se dializó en una membrana de nitrocelulosa (Sigma)

contra 1 litro de solución salina isotónica 0.9%-EDTA 0.5 mM en agitación a 4°C durante 24 horas, para eliminar el CuSO₄ y detener la oxidación.

Determinación del grado de oxidación de la lipoproteína de baja densidad.

El grado de oxidación de la proteína se determinó mediante el método de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico. En tubos separados se colocaron 100 µg/ml de LDL y de LDLox, y se adicionaron 400 µl de amortiguador Tris-preset 7.2 mM a pH 8.0 (J.T. Baker) y 1 ml del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA al 0.375%) (Sigma Aldrich), se mezcló y se incubó 15 minutos en baño de agua en ebullición. Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo y se les adicionó 0.5 ml de HCl 0.2 N. Se preparó una curva estándar con malonaldehído (MDA) (Sigma-Aldrich), bajo las condiciones de reacción de las muestras y se determinó la densidad óptica a 535nm.

Detección de endotoxinas en la lipoproteína de baja densidad.

A todas las preparaciones de LDLox, se les realizó la detección de endotoxinas de acuerdo a las especificaciones del kit de lisado de Limulus amoebocyte (LAL) por el método de “gel clot” (Charles River Endosafe, Charleston S.C.). El estándar de endotoxinas (LPS de Escherichia coli) y el reactivo de LAL se reconstituyeron en agua libre de endotoxinas. En tubos por separado se colocaron 100µl de LDLox y se adicionaron 100 µl del reactivo LAL, se incubaron las muestras a 37°C por una hora en baño maría. Se realizó una curva estándar con el LPS de 0.03 EU/ml a 0.5 EU/ml bajo las condiciones del fabricante. Las lecturas de las muestras se realizó de la siguiente manera, los tubos se invirtieron 180°, si se observa la formación de un gel intacto que no se desprende del tubo se considera resultado positivo, cualquier otra condición se interpretó como resultado negativo.

Obtención de células mononucleares.

Las células mononucleares fueron aisladas de concentrados leucocitarios “buffy coat”, proporcionados por el servicio de Banco de Sangre de CMN SXXI, mediante un gradiente de densidades de la siguiente manera. La sangre se diluyó 1:2 en solución salina isotónica 0.9%, posteriormente en tubos de 50 ml con 15 ml de Lymphoprep (Axis-Shield, Cambridgeshire, UK) se les adicionó la sangre diluida y

se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos; concluido el tiempo de centrifugación se recuperó el anillo de la interfase correspondiente a la células mononucleares y se lavaron con solución salina isotónica 0.9% a 1200 rpm por 15 minutos y dos lavados más a 900 rpm 15 minutos; descartando el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI al 10% de suero fetal bovino (SFB).

Purificación de monocitos humanos por selección negativa.

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

Diferenciación de monocitos humanos a macrófagos.

Los monocitos fueron cultivados en placas de 96 pozos y en placas de 8 pozos a una concentración de 400,000 células por pozo, con medio de cultivo RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA), al 10% con SFB. Posteriormente se estimularon bajo las siguientes condiciones: IL-17 (60 ng/ml), GM-CSF (40 ng/ml), M-CSF (50 ng/ml) y como control negativo los monocitos se cultivaron solo con medio de cultivo, durante 6 días a 37°C y 5% de CO₂, con cambio de medio y estímulo cada tercer día, recuperando sobrenadantes.

Al día 5 las células estimuladas con GM-CSF se polarizaron 24 horas con IFN- γ (25 ng/ml) y LPS (100 ng/ml) y los monocitos estimulados con M-CSF se polarizaron

con IL-4 (50 ng/ml). Posteriormente, las células se recuperaron o se estimularon con LDLox para la posterior tinción de moléculas de superficie o tinción con rojo oleoso.

Estimulación para la formación de células espumosas.

Transcurridos los 6 días de incubación de las células, se incubaron con LDLox (30 ng/ml) durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Determinación de la expresión de moléculas de superficie en macrófagos.

Terminado el tiempo de incubación de las células se lavaron dos veces con FACS buffer (PBS 1x pH 7.4, BSA 0.5%, ázida de sodio 0.01%, EDTA 2mM) para la tinción de viabilidad de las células con el anticuerpo Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend), dejándolo en un periodo de incubación de 30 minutos a 4°C. Posteriormente se realizó la tinción de moléculas de superficie con anticuerpos anti-humanos: anti-CD80-PECy5 (Biolegend), anti-CD86-PE (Biolegend), anti-HLA-DR-PECy7 (Biolegend), anti-TLR4-PE (Biolegend), anti-TLR2-PE (Biolegend) para los macrófagos M1; anti-CD36-FITC (R&D System), anti-DC206-PE (Biolegend), anti-TLR4-PE (Biolegend), anti-TLR2-PE (Biolegend) para los macrófagos M2. Para los macrófagos estimulados con IL-17 y los macrófagos sin estímulo se les realizó la tinción de moléculas con todos los anticuerpos mencionados para macrófagos M1 y M2. Posterior a la adición del anticuerpo se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Después, se lavaron las células con FACS buffer a 1500 rpm por 5 minutos. Las células se resuspendieron en FACS buffer para su evaluación en el citómetro de flujo.

Citometría de flujo.

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

Evaluación de la formación de células espumosas.

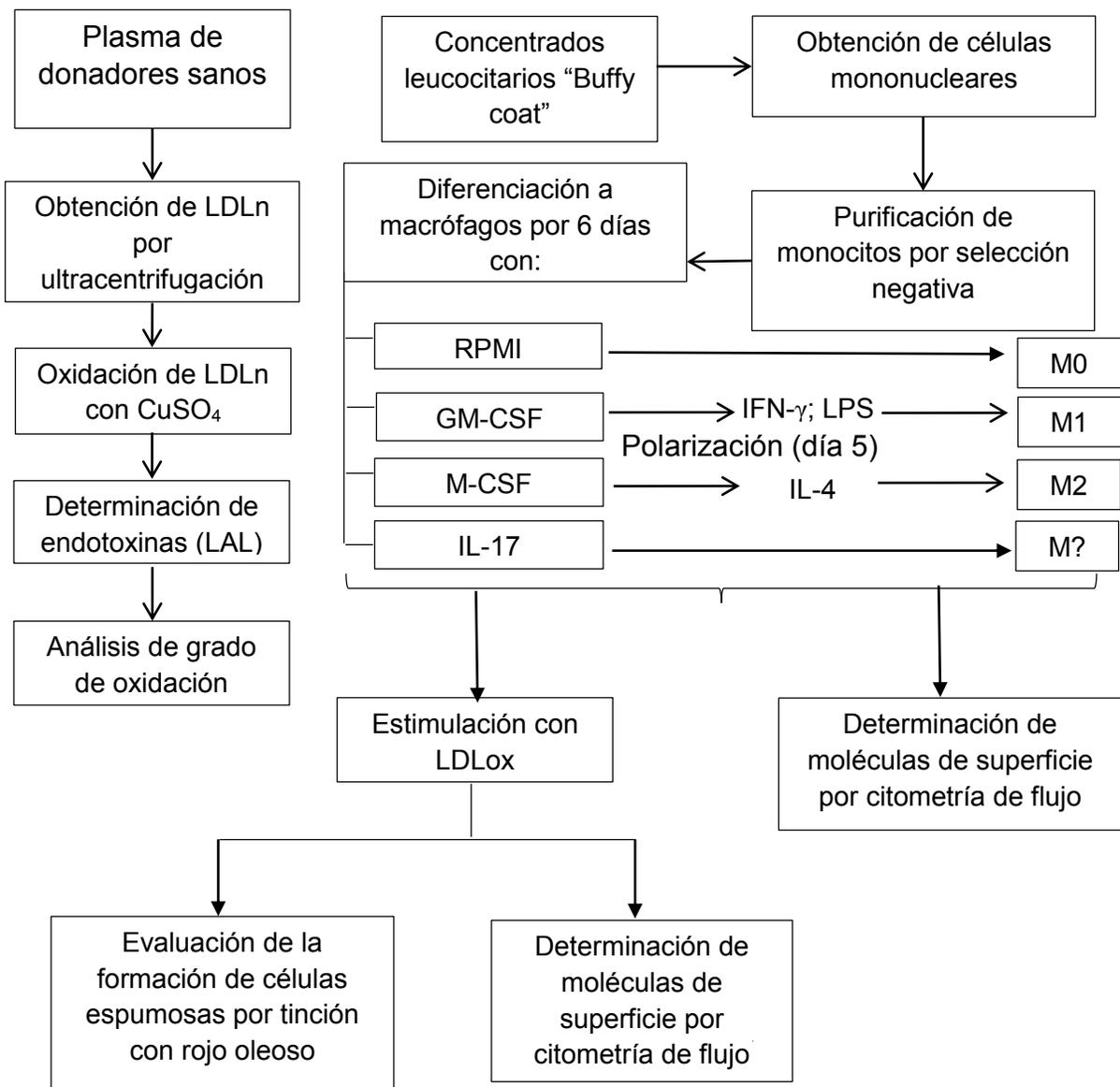
Los macrófagos diferenciados se incubaron con LDLox (30 µg/ml) durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂, concluida la incubación se recuperaron sobrenadantes y se

lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos, posteriormente se realizó la tinción de lípidos con rojo oleoso al 0.3% (en isopropanol al 90%) durante 10 minutos, después se lavaron las células con isopropanol al 60% y fueron contrastados con hematoxilina por dos minutos y se examinaron en el microscopio confocal a un aumento de 63x (*Microscopio de escaneado láser confocal Leica TCS SP8*), las células espumosas positivas se observan teñidas de color rojo. El conteo celular de 5 experimentos independientes fue realizado por dos personas de manera independiente contando un total de 100 células.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de Mann-Whitney para evaluar diferencias significativas entre los grupos experimentales. Muestras con $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes. El análisis fue realizado utilizando el programa de cómputo SPSS 12.0 para WINDOWS. Las gráficas muestran media + SEM.

Diagrama



Resultados

Estrategia de análisis de marcadores de superficie en macrófagos.

Los monocitos se purificaron por selección negativa (obteniendo purezas mayores al 95%), posteriormente se cultivaron 6 días para su diferenciación a macrófagos de acuerdo a los diferentes tratamientos, incluyendo en el día cinco la polarización con IFN- γ y LPS para la diferenciación a macrófagos M1 para los cultivados en presencia de GM-CSF, por lo mismo a los macrófagos diferenciados con M-CSF, fueron polarizados con IL-4, para un desarrollo del fenotipo M2. Posterior a esto se les determinó la expresión de moléculas de superficie, llevando a cabo primero la tinción de células vivas con la posterior tinción de marcadores de superficie como se indica en la metodología.

El análisis de citometría de flujo fue utilizado para evaluar la expresión de las distintas moléculas propuestas en los posteriores experimentos. A partir de una gráfica de singletes (figura 5A) se realizó una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad, donde se permitió identificar a la población de macrófagos (figura 5B), a partir de esta se realizó una ventana de puntos de complejidad contra la expresión del marcador de viabilidad, en donde las células vivas corresponde a las células no teñidas (figura 5C), de la cual se realizó una cuarta ventana que permitió identificar a los macrófagos positivos para el marcador analizado (figura 5D). Esta estrategia fue utilizada para el análisis de las distintas moléculas determinadas en los macrófagos, en sus distintos tratamientos.

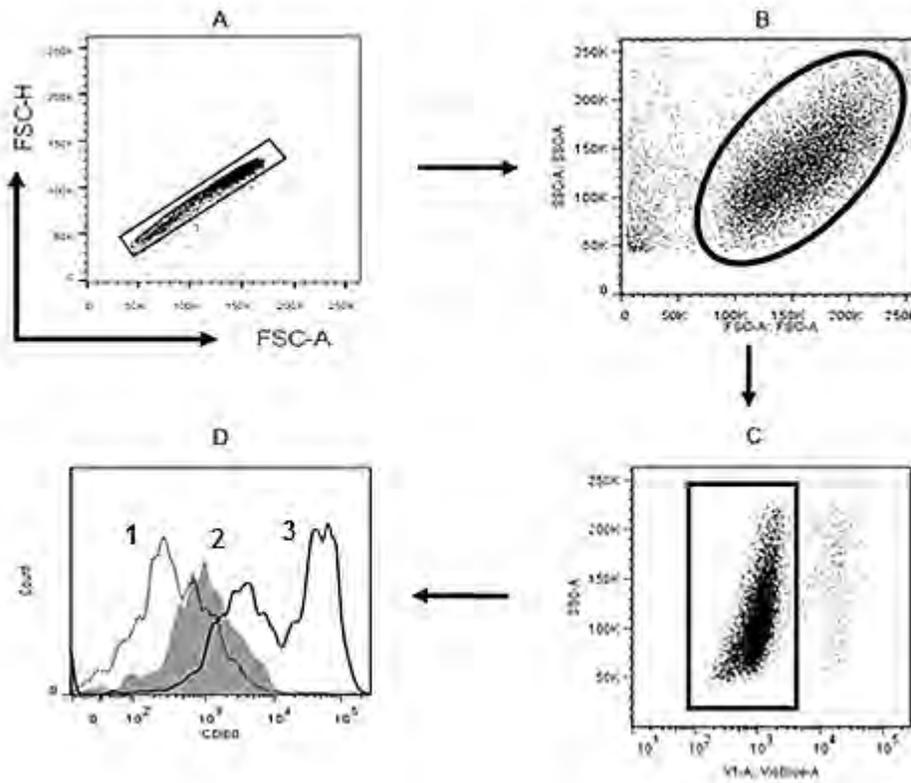


Figura 5. Estrategia para la identificación de macrófagos con base en la expresión de CD80. A) Gráfica de singletes; B) Gráfica de puntos de tamaño contra granularidad; C) Ventana de puntos de complejidad contra la expresión del marcador de viabilidad; D) Histograma representativo de la expresión de CD80 en macrófagos (histograma 1 correspondiente a macrófagos diferenciados con la IL-17; histograma 2 corresponde a macrófagos M0 y por último el histograma 3 corresponde a macrófagos M1).

Efecto de la IL-17 en la diferenciación de macrófagos en comparación con el fenotipo de macrófagos M1.

Los macrófagos diferenciados con GM-CSF (40 ng/ml) por 6 días polarizando en el día 5 con IFN- γ (25 ng/ml) y LPS (100 ng/ml) por 24 horas, expresan niveles elevados de CD80, CD86 y de HLA-DR en comparación con los macrófagos cultivados solo con medio de cultivo (figura 6A, B y C). El fenotipo obtenido de los macrófagos en presencia de GM-CSF corresponde a macrófagos M1. Mientras tanto, los macrófagos diferenciados por seis días en presencia de IL-17 (60 ng/ml) muestran niveles similares a los macrófagos solo con medio de cultivo como se muestra en la figura 6, lo que sugiere que la IL-17 no afecta la expresión de moléculas de superficie relacionadas al fenotipo de macrófagos M1.

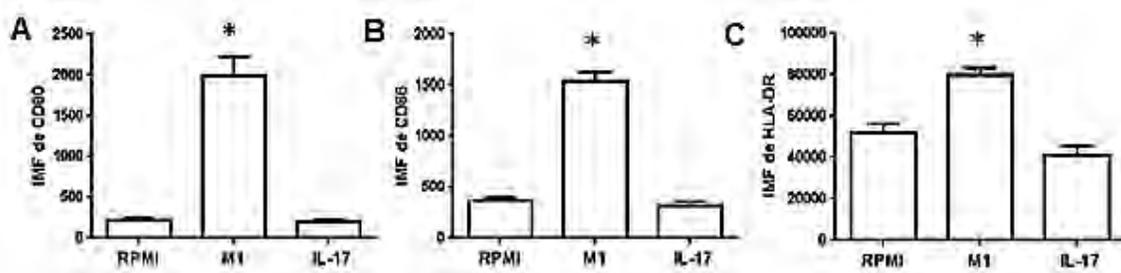


Figura 6. Expresión de moléculas de superficie características de macrófagos M1: CD80, CD86 y HLA-DR. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de CD80 (A), CD86 (B) y HLA-DR (C) en macrófagos con el tratamiento de RPMI, GM-CSF e IL-17 (* $p < 0.05$). Datos promedio de 6 experimentos independientes por duplicado.

Efecto de la IL-17 en macrófagos en comparación con el fenotipo de macrófagos M2.

Los macrófagos diferenciados con M-CSF (50 ng/ml) por 6 días y polarizando en el día 5 con IL-4 (50 ng/ml) durante 24 horas, expresan niveles elevados de CD36 y CD206 en comparación con solo los macrófagos cultivados solo con medio de cultivo. El fenotipo obtenido de los macrófagos en presencia de M-CSF corresponde a macrófagos M2. Sin embargo, los niveles de expresión de las moléculas en macrófagos diferenciados con IL-17 (60ng/ml) son similares a los macrófagos cultivados solo con medio de cultivo (figura 7), lo que sugiere que la IL-17 no afecta la expresión de moléculas de superficie relacionadas al fenotipo de macrófagos M2.

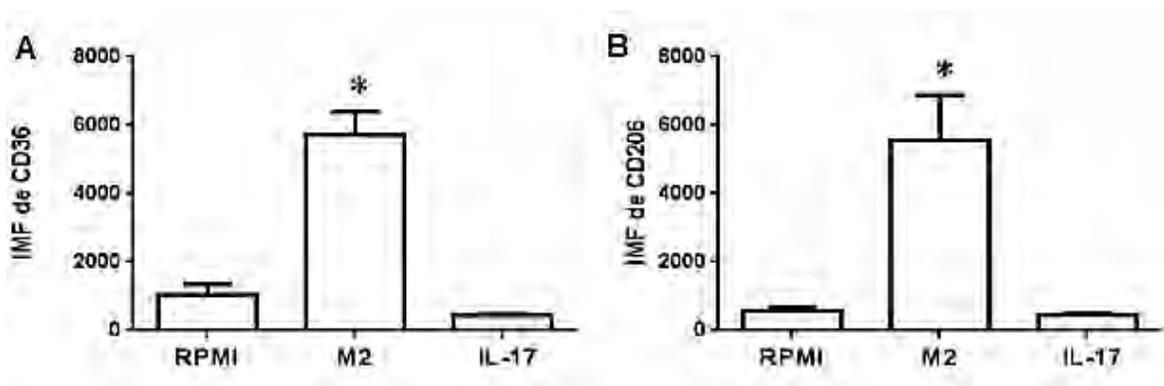


Figura 7. Expresión de moléculas de superficie características de macrófagos M2. A) Expresión de CD36 en macrófagos; B) Expresión de CD206 en macrófagos. Los tratamientos evaluados fueron los correspondientes a macrófagos M0 (macrófagos estimulados solo con medio de cultivo RPMI al 10 % con SFB), M2 y los estimulados con la IL-17. IMF: Intensidad media de fluorescencia (* $p < 0.05$). Datos promedio de 6 experimentos independientes por duplicado.

Participación/acción de macrófagos M1 en la formación de células espumosas.

A pesar de que la IL-17 no induce un incremento en los niveles de expresión de moléculas de superficie relacionados con macrófagos M1 y M2, decidimos evaluar el efecto de la IL-17 en la formación de células espumosas, debido a que la formación de células espumosas juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Para ello se diferenciaron macrófagos con GM-CSF por seis días con su respectiva polarización en el día cinco; entonces los macrófagos fueron estimulados con LDLox (30 µg/ml) por 24 horas. La tinción con rojo oleoso, reveló que los macrófagos M1, exhiben un incremento del contenido de “droplets” de lípidos (figura 8B), así como un aumento en el número de células espumosas ya que induce en un 33% la formación de estas células en comparación con macrófagos estimulados con medio de cultivo (M0), los cuales solo un 10% presentaron cambio a células espumosas (figura 8E).

Participación de macrófagos M2 en la formación de células espumosas.

Se diferenciaron macrófagos con M-CSF (50 ng/ml) por seis días de acuerdo a lo ya mencionado en la metodología; entonces los macrófagos M2 fueron estimulados con LDLox (30 µg/ml) por 24 horas. La tinción con rojo oleoso, reveló que los macrófagos M2, exhiben un incremento del contenido de “droplets” de lípidos (figura 8C), así como un aumento de casi el doble en el número de células espumosas en comparación con macrófagos M1 (figura 8E).

Participación de los macrófagos diferenciados con la IL-17 en la formación de células espumosas.

Se diferenciaron macrófagos con IL-17 por 6 días; entonces los macrófagos fueron estimulados con LDLox (30 µg/ml) por 24 horas. La tinción con rojo oleoso reveló que los macrófagos estimulados con IL-17, exhiben un incremento del contenido de “droplets” de lípidos (figura 8D), así como una mayor formación de células espumosas (20% del total de células) en comparación con macrófagos M0 (9.5%),

sin embargo, presentan una menor proporción que los macrófagos M1 y M2 (figura 8E), lo que sugiere que la IL-17 participa en la formación de células espumosas pero en menor grado que los macrófagos M1 y M2.

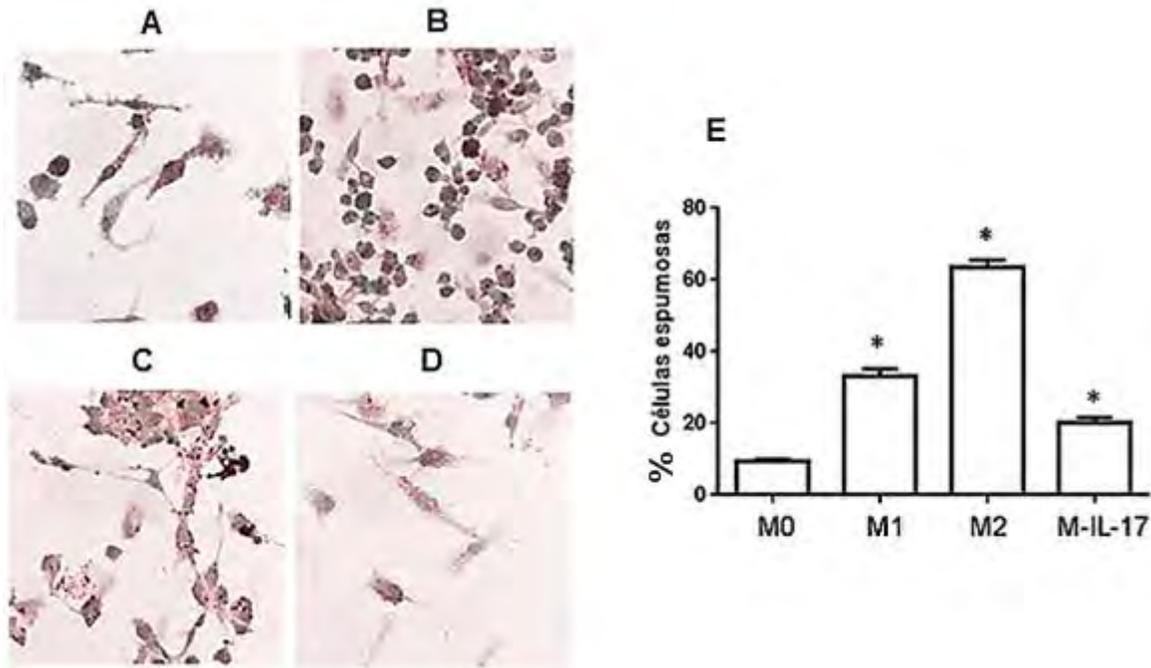


Figura 8. Formación de células espumosa en los diferentes tipos de macrófagos. Microfotografías de los diferentes cultivos de células espumosas, donde las células positivas se observan teñidas de color rojo. A) Células espumosas desarrolladas en macrófagos M0 en presencia de LDLox; B) Macrófagos M1 en presencia de LDLox; C) Macrófagos M2 en presencia de LDLox; D) Macrófagos diferenciados con la IL-17 en presencia de LDLox; (microfotografías tomadas a un aumento de 63x con *Microscopio de escaneado láser confocal Leica TCS SP8*). Datos representativos de 6 experimentos. E) Cuantificación en porcentaje de células espumosas formadas a partir de los diferentes tipos de macrófagos, las cuales se determinaron por su positividad al rojo oleoso (* $p < 0.05$). Datos promedio de 6 experimentos independientes por duplicado.

Determinación de TLR2 y TLR4 en macrófagos M1, M2 y diferenciados con IL-17.

El incremento en el contenido de “droplets” de lípidos (figura 8D), así como un aumento en el número de células espumosas por la IL-17 (figura 8E), además de la carencia de un incremento de los niveles de CD36 al estímulo de la IL-17 (figura 7A), sugiere que otros receptores podrían estar involucrados en la formación de células espumosas por la IL-17, por lo que determinamos los niveles de TLR2 y TLR4. Interesantemente, encontramos que los macrófagos M2 son los que expresan los niveles más elevados de TLR2, después los macrófagos M1 y en menor grado los macrófagos diferenciados con IL-17, en comparación con los macrófagos cultivados solo con medio de cultivo, los cuales expresan niveles muy bajos de TLR2 (figura 9A). Por otro lado, los macrófagos M1 y M2 expresaron de manera similar altos niveles de TLR4; también la IL-17 indujo un alto incremento de TLR4 en comparación con los macrófagos cultivados solo con medio de cultivo (figura 9B), estos resultados sugieren que la IL-17 aumenta la expresión de TLR2 y TLR4; y podrían participar en la formación de células espumosas.

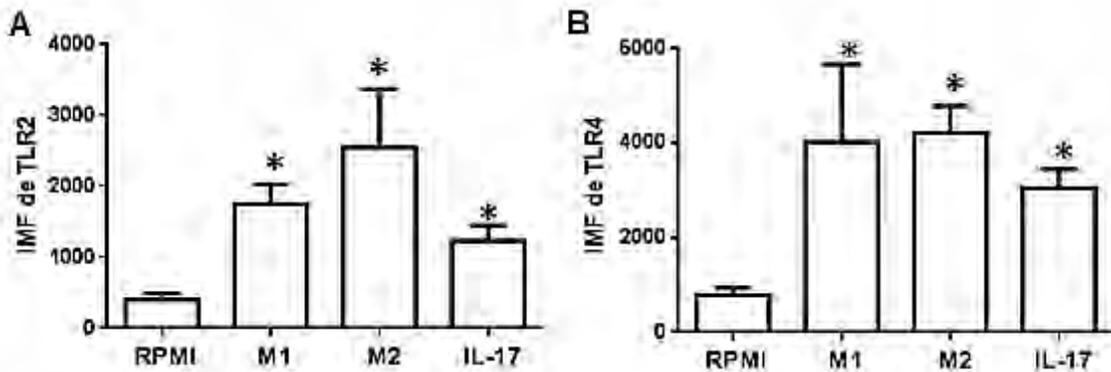


Figura 9. Expresión de TLR2 y TLR4 en los diferentes tipos de macrófagos. A) Expresión de TLR2 en macrófagos; B) Expresión de TLR4 en macrófagos. Ambos marcadores medidos en macrófagos M0, M1, M2 y macrófagos diferenciados con IL-17. IMF: intensidad media de fluorescencia (*p<0.05). Datos promedio de 6 experimentos independientes por duplicado.

Expresión de CD80, CD86 y HLA-DR en macrófagos M1 y diferenciados con IL-17 en presencia de la LDLox.

La LDLox induce un aumento en la expresión de CD86 en los macrófagos M0. Mientras tanto, los macrófagos M1 estimulados con LDLox expresan niveles elevados de CD80, CD86 y HLA-DR (figura 10A, B y C, respectivamente). Por otro lado, la IL-17 en presencia de LDLox parece inducir un aumento en los niveles de CD80 en comparación con los macrófagos obtenidos solo con medio de cultivo en presencia de la LDLox, sin embargo no es de manera significativa (figura 10A). Mientras tanto, los niveles de CD86 y HLA-DR no se afectan en los macrófagos diferenciados con IL-17 en presencia de la LDLox (figura 10B y C).

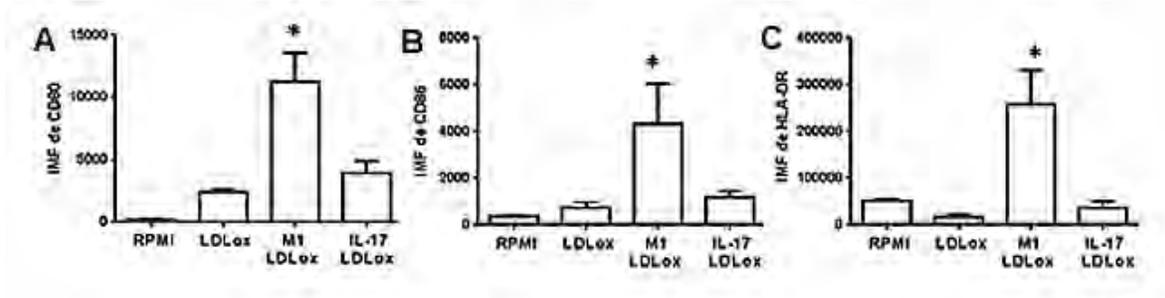


Figura 10. Expresión de moléculas de superficie CD80, CD86 y HLA-DR en macrófagos estimulados con LDLox. A) Expresión de CD80 en macrófagos; B) Expresión de CD86 en macrófagos y C) Expresión de HLA-DR en macrófagos, todos los tipos de macrófagos bajo el estímulo de LDLox por 24 horas después de haber realizado su diferenciación con los diferentes tratamientos. IMF: intensidad media de fluorescencia (* $p < 0.05$). Datos promedio de 6 experimentos independientes por duplicado.

Expresión de CD36 y CD206 en macrófagos M2 y diferenciados con IL-17.

La LDLox por sí sola no afecta la expresión de CD36 y CD206 en los macrófagos M0 (figura 7A y B respectivamente). Por otro lado, los macrófagos M2 estimulados con LDLox expresan significativamente niveles elevados de CD36 y CD206 (figura 11A y B). Mientras tanto los macrófagos diferenciados con IL-17 en presencia de la LDLox incrementan los niveles de CD206 (figura 11B), no así la expresión de CD36 (figura 11A).

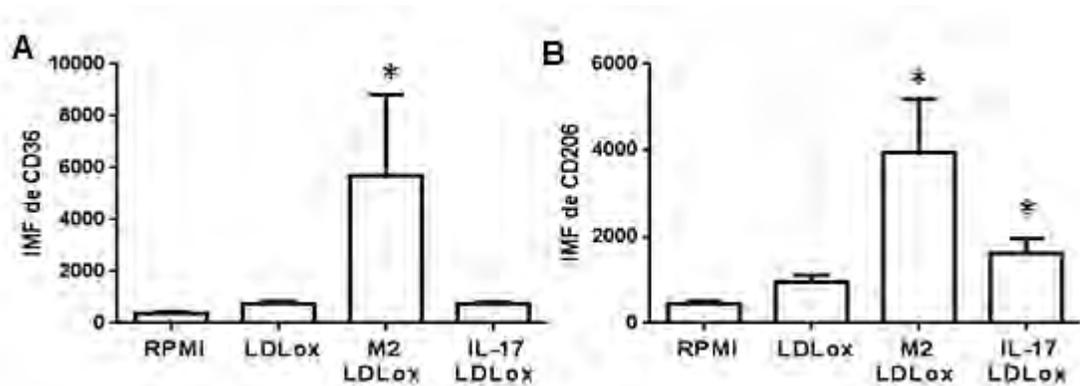


Figura 11. Expresión de moléculas de superficie CD36 y CD206 en los diferentes tipos de macrófagos estimulados con LDLox. A) Expresión de CD36 en los diferentes tipos de macrófagos; B) Expresión de CD206 en los diferentes tipos de macrófagos. Los monocitos humanos se diferenciaron a macrófagos con el tratamiento de RPMI al 10 % con SFB, M-CSF e IL-17, durante 6 días, cada 2 días se cambió el medio de acuerdo al tratamiento. Estimulando con LDLox durante 24 horas, terminado el periodo de diferenciación. IMF: intensidad media de fluorescencia (* $p < 0.05$). Datos promedio de 6 experimentos independientes por duplicado.

Determinación de TLR2 y TLR4 en macrófagos estimulados con LDLox.

La expresión de TLR2 después de la estimulación con LDLox (30µg/ml) se mantuvo alta en los macrófagos M1, M2 y en los diferenciados bajo el estímulo de la IL-17 (figura 12A), de la misma manera para TLR4 (figura 12B), manteniéndose baja la expresión de ambos TLRs en macrófagos estimulados solo con LDLox (figura 12A y B). Lo cual nos indica que la LDLox no presenta un efecto para el aumento en la expresión de estos marcadores.

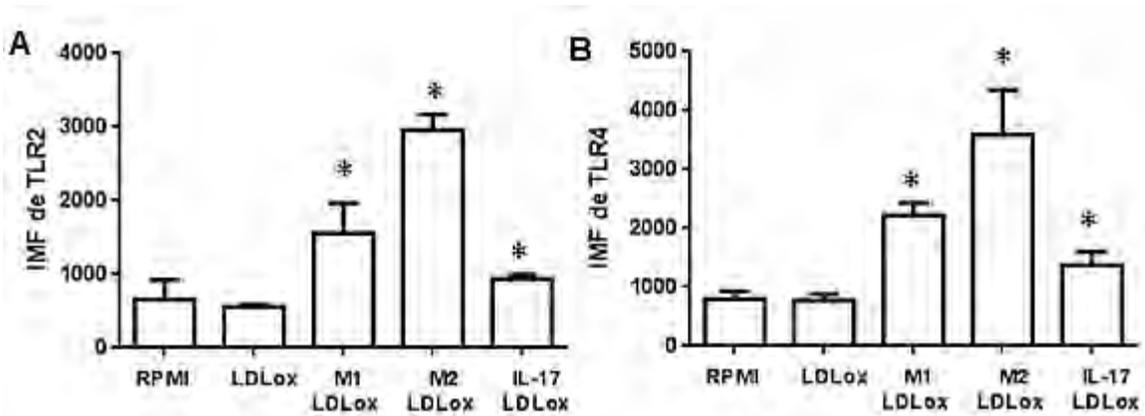


Figura 12. Expresión de TLR2 y TLR4 en los diferentes tipos de macrófagos después de la estimulación con LDLox. A) Expresión de TLR2 en los diferentes tipos de macrófagos; B) Expresión de TLR4 en los diferentes tipos de macrófagos. La cuantificación se llevó a cabo posterior a la estimulación con LDLox (24 horas). IMF: intensidad media de fluorescencia (*p<0.05). Datos promedio de 6 experimentos independientes por duplicado.

Discusión

La aterosclerosis se caracteriza como una enfermedad inflamatoria crónica, progresiva y multifactorial, en la cual hay una compleja interacción entre diversos tipos de células y redes de citocinas. En este contexto, los macrófagos son actores clave en el desarrollo, progresión y estabilidad de la placa aterosclerótica, debido a que contribuyen a la formación del núcleo y la degradación de la capa fibrosa. Por otro lado, los macrófagos pueden adoptar diversos fenotipos de acuerdo al microambiente al que estén expuestos [42].

En este estudio demostramos que la IL-17 no afecta la expresión de marcadores característicos de macrófagos M1 (CD80, CD86, HLA-DR), tampoco de marcadores M2 como CD36 y CD206, lo que sugiere que la IL-17 no afecta la diferenciación hacia un fenotipo M1 o M2. Estas observaciones coinciden con lo que se ha reportado en un estudio, que demuestra que la IL-17 no afecta la expresión de marcadores de macrófagos M1 y M2 [43], pero si se ha encontrado que la IL-17 dispara la secreción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos [44].

En la aterosclerosis se ha demostrado que moléculas endógenas como LDLox participan en el desarrollo de la lesión [45], más aún la LDLox participa en la formación de células espumosas [46]. En este sentido, nosotros decidimos investigar la participación de la IL-17 en la formación de células espumosas. Los resultados obtenidos muestran que los macrófagos diferenciados con IL-17 forman más células espumosas que los macrófagos M0. También en este estudio, demostramos que los macrófagos M1 son resistentes en la formación de células espumosas; en contraste, los macrófagos M2 fueron los que generaron el mayor número de células espumosas, y con respecto a nuestra pregunta inicial, los resultados sugieren que la IL-17 es capaz de participar en la formación de células espumosas, las cuales son esenciales en el desarrollo de la placa aterosclerótica. Al respecto, se ha demostrado en placas de pacientes humanos la presencia de la IL-17 que se co-localiza con macrófagos [47], en el mismo contexto, se ha demostrado

un incremento de los niveles de IL-17 en circulación de pacientes con enfermedad cardiovascular y se ha asociado con la vulnerabilidad de la placa [48].

Evidencias previas han demostrado que CD36 es esencial en la formación de células espumosas [46]. Sin embargo, nosotros no encontramos que la IL-17 afecte la expresión de CD36. Por lo tanto, decidimos analizar la expresión de TLR2 y TLR4, los cuales también se han reportado como moléculas clave para la formación de células espumosas [46]. Interesantemente, los resultados muestran que la IL-17 induce un incremento de TLR2 y TLR4, similar al encontrado en los macrófagos M1 y M2, lo que sugiere que la IL-17 podría inducir la formación de células espumosas a través de los receptores TLR2 y TLR4. Más aún se ha reportado que la IL-17 favorece la captación de LDL modificada a través de macropinocitosis, lo que podría contribuir en la formación de células espumosas [49].

La LDLox es una molécula pro-aterogénica e induce la activación de macrófagos [50], por lo que decidimos investigar la participación de macrófagos diferenciados con IL-17 al estímulo de la LDLox en la expresión de marcadores de activación relacionados con los macrófagos M1 y M2. Los resultados obtenidos muestran que los macrófagos diferenciados con la IL-17 en presencia de la LDLox aumentan la expresión de CD206, un marcador asociado a macrófagos M2, y se observa una tendencia a aumentar CD86 relacionado con macrófagos M1, lo que sugiere que la IL-17 en presencia de la LDLox induce un macrófago distinto al reportado para M1 y M2. Estudios previos sugieren, que la IL-17 puede inducir indirectamente macrófagos anti-inflamatorios donde se demuestra, que depende de un estímulo adicional como IL-10 y glucocorticoides [51]. En contraste macrófagos estimulados con IL-17 en presencia de M-CSF o GM-CSF inducen la producción de CCL4 y CCL5, quimiocinas involucradas en el reclutamiento de linfocitos y monocitos hacia los sitios de inflamación [52].

Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que IL-17 no induce per se la diferenciación específica de macrófagos M1 o M2. Por otro lado, la IL-17 induce la formación de células espumosas, así como un incremento en la expresión de TLR2 y TLR4 en macrófagos humanos. Además la IL-17 en presencia de la LDLox induce un aumento en la expresión de CD206 y una tendencia en el aumento de CD80, estos resultados en su conjunto sugieren que la IL-17 puede contribuir en la patogénesis de la aterosclerosis.

Perspectivas

Con base en estos resultados se propone analizar la secreción de citocinas en los diferentes tipos de macrófagos antes y después de la estimulación con la LDLox, así como, determinar el papel de la IL-17 en la formación de células espumosas a través de TLR2 y TLR4.

Referencias

1. Kordalewska M., Markuszewski M. J. Metabolomics in cardiovascular diseases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015; 113: 121-136.
2. Organización mundial de la Salud. Programas y proyectos: Epidemias mundiales desatendidas: tres amenazas crecientes. [Consultado el 19 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/whr/2003/chapter6/es/index1.html>
3. World Health Organization. GLOBAL STATUS REPORT. [Consultado el 19 de agosto de 2015]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Principales causas de mortalidad en hombres; mujeres; y por grupos de edad. [Consultado el 19 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo124&s=est&c=23588>.
5. Mohana T, Vijayan A, Jamuna S, Sakeena M, Niranjali S. Inhibition of differentiation of monocyte to macrophages in atherosclerosis by oligomeric proanthocyanidins –In-vivo and in-vitro study. *Food and Chemical Toxicology* 2015; 82: 96-105.
6. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson K. Immunomodulation of Atherosclerosis: Myth and reality. *J Intern Med.* 2000; 247:397-495.
7. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002; 420:866-874.
8. Ross R. Mechanisms of disease. *New Engl J Med.* 1999; 340:115-126.
9. Voet D, Voet J. Bioquímica. *Medica Panamericana*. Buenos Aires, Argentina 2006, 3a edición. Pp. 397-422.
10. Steinberg D. Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272, 20963-20966.
11. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001; 42: 1346-1367.

12. Krisko A, Etchebest C. Theoretical model of human apolipoprotein B-100 tertiary Structure. *Proteins* 2007; 66: 358-432.
13. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA Jr. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 14871-14876.
14. McLaren J, Daryn R, Tim G, Dipak P. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research* 2011; 50: 331-347.
15. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology* 2011; 12: 204-212.
16. Rahaman SO, Lennon DJ, Febrario M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36- dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006; 4: 211-221.
17. Rader DJ, Puré E. Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: Beyond the foam cell?. *Cell Metabolism* 2005; 1: 223-230
18. Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis – A matter of unresolved inflammation. *Seminars in Immunology* 2015; 27: 184-193
19. Innate Immune System Cells in Atherosclerosis
20. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010; 32: 593-604.
21. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005; 23: 344-346.
22. Fenyo IM, Gafencu AV. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology* 2013; 218: 1376-1384.
23. Brochériou, Isabelle et al. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010; 214: 316 - 324

24. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 2010; 5: e8852.
25. Huang WC, Sala-Newby GB, Susana A, et al. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor-kB. *PLoS One* 2012; 7: e42507.
26. Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LA, Stalenhoef AF. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: A crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis* 2011; 345-349.
27. D. J. Cua and C. M. Tato. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 479-489.
28. S. Liu, X. Song, B. Chrnyk, S. Shanker, L. R. Hoth, E. S. Marr and M. C. Griffor. Crystal structures of interleukin 17-A and its complex with IL-17 receptor A. *Nature Communications* 2013; doi:10.1038/ncomms2880
29. B. W. Kirkham, A. Kavanaugh and K. Reich. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology* 2013; 141: 133-142.
30. M. Mallett, P. Atzei, A. Horgan, E. Hams, T. Floss, W. Wurst, et al. Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nature Communications* 2012; doi: 10.1038/ncomms2127.
31. S. L. Gaffen. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol* 2009; 9 (8): 556-567.
32. Owen JA, Punt J, Stranford SA. Kuby Inmunología. *Mc Graw Hill*. México, 2014 7ª edición. Pp: 116-128.
33. Song X. and Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* 2013; 62: 175-182.
34. K. Bulek, C. Liu, S. Swaidani, L. Wang, R. C. Page, M. F. Gulen, et al. The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation. *Nat Immunol* 2011; 12: 844-852.

35. S. L. Gaffen. An overview of IL-17 Function and Signaling. *Cytokine* 2008; 43 (3): 402-407.
36. R. E. Eid, D. A. Rao, J. Zhou, S. L. Lo, H. Ranjbaran, A. Gallo, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2009; 119: 1424-1432.
37. Z. Liu, F. Lu, H. Pan, Y. Zhao, S. Wang, S. Sun, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication. *Atherosclerosis* 2012; 221: 232-241.
38. X. Cheng, X. Yu, Y. Ding, Q. Fu, J. Xie, T. Tang, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol* 2008; 127: 89-97.
39. P. Miossec and J. K. Kolls. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 763-776.
40. Erbel C, Chen L, et al. Inhibition of IL-17A Attenuates Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 2009; 183: 8167-8175.
41. Danzaki K, Matsui Y, et al. Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2012; 32: 273-280.
42. Medbury HJ, Williams H and Fletcher JP. Clinical significance of macrophage phenotypes in cardiovascular disease. *Clin Transl Med*. 2014. doi: 10.1186/s40169-014-0042-1.
43. Erbel C, Akhavanpoor M, Okuyucu D, Wangler S, Dietz A, Zhao L, et al. IL-17A Influences Essential Functions of the Monocyte/Macrophage Lineage and Is Involved in Advanced Murine and Human Atherosclerosis. *J Immunol*. 2014 1; 193(9): 4344–4355.
44. Jovanovic D. V., Di Battista J. A, Martel-Pelletier J., et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol*. 1998; 160 (7): 3513-3521.

45. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84:1086-1095.
46. Chávez-Sánchez L, Garza-Reyes MG, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F. The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans. *Hum Immunol*. 2014; 75: 322-9.
47. Erbel C, Dengler TJ, Wangler S, et al. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res Cardiol* 2011; 106: 125–34.
48. Liu Z, Lu F, Pan H, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication. *Atherosclerosis* 2012; 41: 221- 232].
49. Daryn RM, Tim GA, Charlotte D, Hayley G, Stoneman T, Buckley M, Ramji D. Differential regulation of macropinocytosis in macrophages by cytokines: Implications for foam cell formation and atherosclerosis. *Cytokine* 2013; 64: 357-361.
50. Chávez-Sánchez L, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Montoya-Díaz E, Blanco-Favela F. Innate immune system cells in atherosclerosis. *Arch Med* 2014; 45: 1-14.
51. Gaetano Zizzo and Philip L. Cohen. IL-17 Stimulates Differentiation of Human Anti-Inflammatory Macrophages and Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils in Response to IL-10 and Glucocorticoids. *J Immunol* 2013; doi:10.4049/jimmunol.1203017.
52. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, Wu L, Ong S, Quader F, Chen P, Zheng D, Caturegli P, Rose NR, Ciháková D. Macrophages participate in IL17-mediated inflammation. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 726-36. doi: 10.1002/eji.201141737.