



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**Efecto Modulador del FILM en el reclutamiento de la
proteína acopladora MyD88 y expresión de las citocinas
IL-8 e IL-10**

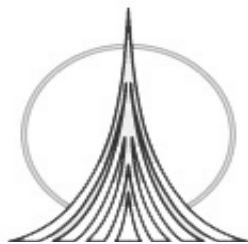
T E S I S :

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CRICEYRA YAZMÍN VÁZQUEZ SALINAS



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Director: JUAN R. VELÁZQUEZ RODRÍGUEZ
Asesor: RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

México, D. F.

Abril del 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Índice general.....	ii
Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras.....	vi
Introducción.....	1
Marco teórico.....	3
1 Factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM)	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Estructura y propiedades	5
2 Inflamación.....	6
3 Inmunidad innata.....	6
3.1 Componentes del sistema inmune innato	7
3.1.1 Barreras epiteliales.....	7
3.1.2 Proteínas efectoras circulantes.....	7
3.1.3 Citocinas.....	8
3.2 Características relevantes en la respuesta inflamatoria y función de la interleucina 8 (IL-8)	8
3.3 Características relevantes en la respuesta inflamatoria y función de la interleucina 10 (IL-10)	9
3.4 Células efectoras	10
3.4.1. Leucocitos polimorfonucleares (PMN)	10
3.4.1.2 Leucocitos neutrófilos.....	10
3.4.1.3 Eosinófilos.....	11
3.4.1.4 Basófilos.....	12
3.4.2 Leucocitos mononucleares.....	12
4. Activación celular.....	13
4.1. Características bioquímicas y funcionales del LPS.....	13
4.2. Sistema de receptores tipo Toll (TLR)	14
4.2.1. TLR en mamíferos.....	15
4.2.2. Organización genética.....	16
4.2.3. Características estructurales.....	16

4.2.4. Función.....	17
4.2.5. TLRs y sus ligandos	17
4.2.5.1. TLR 4.....	17
5. Factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88)	19
5.1. Características bioquímicas	19
5.2. Función.....	20
5.3. Cascada de señalización.....	21
5.3.1. Señalización dependiente de MyD88.....	21
5.3.1.1. Sistema de señalización NF- κ B.....	23
5.3.1.2. Sistema de señalización MAPK.....	24
5.3.1.2.1. Activación de JNK.....	24
5.3.1.2.2. Activación de p38.....	25
5.4. Señalización independiente de MyD88.....	26
Planteamiento del problema.....	28
Objetivo.....	28
Hipótesis.....	28
Métodos.....	29
Aislamiento de mononucleares de sangre periférica.....	30
PCR tiempo real.....	30
Microscopía confocal.....	30
ELISA.....	30
Método estadístico.....	31
Resultados.....	33
PCR tiempo real.....	34
IL-8.....	34
IL-10.....	35
ELISA.....	36
IL-8.....	36

IL-10	37
Microscopía confocal	37
Discusión	39
Conclusiones	42
Anexos	44
1. Separación de mononucleares de sangre periférica por el método de Ficoll- Hypaque	45
2. Extracción de RNA por el método de Trizol	48
3. PCR tiempo real	50
4. Citocentrifugados	51
5. Microscopía confocal	52
6. ELISAS	53
IL-8	53
IL-10	55
Abreviaturas	56
Referencias	59

Índice de tablas	pag.
Tabla I Efectos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de IL-8.....	7
Tabla II Phyla en los cuales se han identificado TLRs.....	14
Tabla III Cromosomas que codifican TLRs.....	15
Tabla IV Miembros de la familia de TLRs.....	17

Indice de figuras	pag.
Figura 1 Estructura conformacional del FILM.....	3
Figura 2 Estructura de LPS.....	12
Figura 3 Componentes estructurales de las proteínas Toll en <i>Drosophila</i> y mamíferos.....	14
Figura 4 Los receptores Toll y sus ligandos.....	16
Figura 5 Formación del complejo LBP-CD14-MD2-LPS-TLR4 para la señalización de LPS.....	17
Figura 6 Señalización dependiente de MyD88.....	21
Figura 7 Señalización de NF- κ B dependiente de MyD88.....	22
Figura 8 Señalización de MAPK.....	24
Figura 9 Señalización de NF- κ B independiente de MyD88.....	25

Introducción

Desde la década de los 80's un grupo de investigadores observó que en las infecciones provocadas por *Entamoeba histolytica* ocurría una inflamación, la cual no se llevaba a cabo de manera normal, hecho que les llamó la atención para iniciar una nueva línea de investigación, pues dicho fenómeno les hizo suponer que era un método de defensa del parásito para no ser atacado por los leucocitos.

A partir de ese momento se inician los proyectos para identificar el mecanismo de defensa de la *E. histolytica*, con ellos se llega a descubrir y describir un pentapéptido al que denominaron FILM, dicha molécula tiene efectos variados sobre diferentes linajes celulares, pero la mayoría apunta hacia un efecto antiinflamatorio, motivo por el cual se estructuró este proyecto, donde se trata de dilucidar el mecanismo de acción del FILM, siguiendo un camino específico (cascada de señalización producida por el LPS), donde se involucran citocinas pro y antiinflamatorias.

Marco teórico

1. Factor inhibidor de la locomoción de monocitos (FILM)

1.1 Antecedentes

La amibiasis es una patología que afecta principalmente a países subdesarrollados. Esta enfermedad es causada por el protozooario extracelular *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), que tiene como único hospedero natural al hombre. Mundialmente, la amibiasis causa cerca de 100, 000 muertes al año.¹

Desde el siglo XVII se ha estudiado el comportamiento de *E. histolytica* y se ha observado que el parásito es capaz de invadir tejidos, producir úlceras y lesiones en diferentes órganos.² Como respuesta al daño tisular, el hospedero presenta diferentes mecanismos de defensa; entre los cuales se encuentra el fenómeno inflamatorio. La inflamación es la suma de una serie de eventos que se desencadena en respuesta, por ejemplo, a la presencia de microorganismos invasores. Ésta se caracteriza por un proceso agudo (temprano) seguido por otro tardío³. El fenómeno inflamatorio en el absceso hepático amibiano (AHA) producido por la invasión de *E. histolytica* es atípico, pues cursa con poca inflamación y en los casos tratados con éxito hay restitución completa de tejido, sin cicatrización.⁴ Típicamente, la inflamación aguda se hace acompañar por polimorfonucleares (PMN) y en la fase tardía por fagocitos mononucleares. La característica peculiar del AHA es que induce una reacción inflamatoria aguda intensa y escasa inflamación tardía en los estadios avanzados. Este y otros hallazgos llevaron a algunos investigadores a estudiar los cultivos axénicos de *E. histolytica* para indagar si este protozooario tenía o liberaba alguna sustancia con efecto sobre la locomoción (quimiotaxis y quimiocinesis) de los leucocitos (PMN y mononucleares). Se encontró que los sobrenadantes de cultivos axénicos de *E. histolytica* inhibían la quimiotaxis y quimiocinesis de mononucleares pero no la de PMN.⁵ Posteriormente, se descubrió que el causante era una sustancia a la que se le dió el nombre de Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM).

1.2 Estructura y propiedades

La estructura química del FILM se descifró empleando técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas y secuenciación. El FILM es un pentapéptido constituido por Met-Gln-Cys-Asn-Ser, con peso molecular de 581 Da. **(fig. 1)** Una vez dilucidada su estructura, se sintetizó y se probó. El resultado fue que el FILM sintético posee las mismas propiedades biológicas que el FILM nativo.⁶

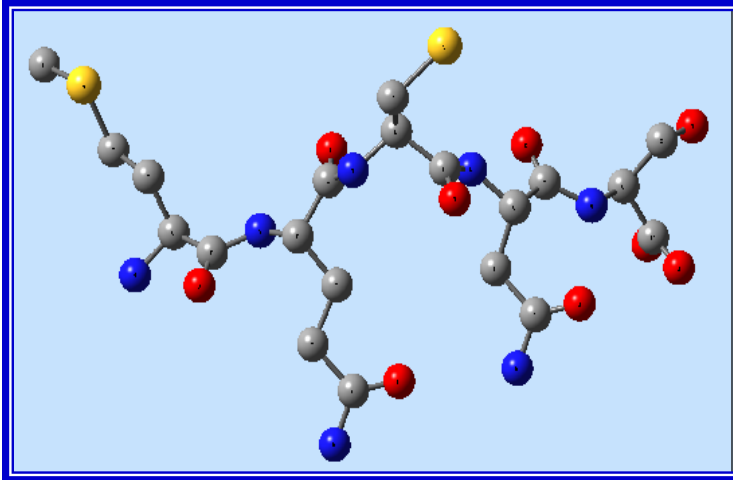


Figura 1. Estructura conformacional del FILM

El efecto del FILM sobre la locomoción de monocitos, sugirió la idea de que éste pudiera actuar sobre estructuras celulares involucradas directamente en la quimiotaxis. Un estudio mostró que el factor aumentaba el número de microtúbulos.⁷

Otra característica del FILM es que cancela el estallido respiratorio en PMN y mononucleares, pero no en los eosinófilos.⁸ Se sabe también que el FILM inhibe en cobayos y gerbos la hipersensibilidad retardada cutánea al dinitroclorobenceno (DNCB)⁹ y disminuye la expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 y VCAM-1.¹⁰ Estudios recientes muestran que el pentapéptido afecta la expresión de algunas quimiocinas pro-inflamatorias. El FILM abate la expresión inducida por PMA de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β , I-309 y el receptor CCR1.¹¹

Los estudios arriba mencionados sugieren un mecanismo de acción del FILM, en rutas de señalización intracelular que involucran la expresión de diversas citocinas.

2. Inflamación

La inflamación es un proceso vital de defensa contra agresiones provenientes de traumatismos, microorganismos patógenos y diferentes daños tisulares. El rubor, calor, dolor y tumefacción, son los signos característicos y diagnósticos del fenómeno inflamatorio.¹²

La respuesta al trauma inicia siempre con la vasodilatación de arteriolas localizadas en y alrededor del lugar afectado. La vasodilatación trae como consecuencia un aumento en el riesgo vascular, lo cual produce rubor (eritema) y calor. Al avanzar la vasodilatación, las células endoteliales limitantes se retraen alejándose una de otra, provocando hendiduras microscópicas en la membrana basal endotelial. Esta retracción culmina con una mayor permeabilidad de la pared venular, lo cual permite el escape de líquido vascular a los tejidos afectados produciendo edema (inflamación).¹²

La dilatación y permeabilidad de vasos sanguíneos son el producto de dos fenómenos: el primero es un reflejo medular donde los receptores del dolor estimulados por el daño tisular transmiten señales a la médula espinal, actuando sobre las neuronas motoras autónomas y provocando la relajación del músculo liso arteriolar en el sitio del trauma; el segundo es la respuesta desencadenada por mediadores inflamatorios producidos en el sitio del trauma entre los que se encuentran histamina, prostaglandinas y leucotrienos (vasodilatadores potentes)^{12, 13}

La inflamación de manera general no se considera una reacción inmune, porque no sólo se desencadena por infección bacteriana, sino también por trauma contuso, quemaduras, obstrucción vascular, etc. Sin embargo ambas, reacción inmune y reacción inflamatoria, se relacionan, se promueven y favorecen entre sí.

3. Inmunidad innata

La inmunidad innata o natural es la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos.

La inmunidad innata consiste en todas las medidas de resistencia congénita que están

presentes y se activan, inclusive antes de que haya tenido lugar un encuentro con microorganismos.¹³

De manera general, la inmunidad innata es la respuesta inicial a patógenos que evita la infección del huésped, también se debe mencionar que tanto la inmunidad innata como la adaptativa se complementan entre sí. La inmunidad adaptativa en ocasiones hace uso de mecanismos efectores de la inmunidad natural y ésta última estimula e interfiere en la inmunidad adaptativa.¹²

La inmunidad innata está constituida por varios componentes, estos le confieren cierta especificidad, porque cada uno tiene la capacidad de reconocer las estructuras características de los patógenos y diferencian los propios de los del huésped. Los productos microbianos reconocidos por el sistema inmune innato generalmente son vitales para los microorganismos.¹³

3.1. Componentes del sistema inmune innato

3.1.1. Barreras epiteliales

Las superficies epiteliales son barreras físicas que impiden la entrada de agentes extraños a los tejidos del huésped, dichas barreras son la piel y mucosas. Los epitelios producen defensinas, las cuales tienen la propiedad de ser antibióticos naturales de amplio espectro. Las células epiteliales del intestino también secretan criptocidinas que son péptidos microbicidas. En los espacios que hay en las células epiteliales y las cavidades serosas podemos encontrar linfocitos T y la subpoblación B-1 del linaje celular de tipo B, ambos poseen toda la maquinaria para atacar a los microorganismos invasores.¹²

3.1.2. Proteínas efectoras circulantes

Muchas proteínas plasmáticas participan en la respuesta inmune innata, algunas tienen carácter antimicrobiano, algunas son proteínas de unión y otras se encuentran en el sistema de complemento. Una de las proteínas antimicrobianas es la defensina, también podemos

mencionar a las lisozimas, las cuales actúan digiriendo a los peptidoglucanos de la pared celular bacteriana, principalmente de bacterias Gram positivas.

Las proteínas de unión, entre las cuales se mencionan a la lectina de unión a mananos (MBL), es una proteína que proviene del hígado y que actúa como una opsonina. La proteína C reactiva, se une a los fosfolípidos bacterianos.

La proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) es esencial en el reconocimiento de bacterias Gram negativas.

Otro sistema que tiene un papel crucial en la inmunidad innata es el sistema del complemento, el cual se compone de varias proteínas plasmáticas que están íntimamente relacionadas con el reconocimiento de patógenos.^{12,13}

3.1.3. Citocinas

Las citocinas son moléculas proteicas solubles que forman un grupo diverso de péptidos y glicoproteínas de señalización intracelular.^{12, 13}

El papel de las citocinas es vital porque su función es activar y reclutar leucocitos, también promueven la proliferación de algunas células efectoras. Algunas de estas citocinas son Interleucina (IL)-1, Factor de necrosis tumoral (TNF), Interferón (IFN), IL-6, IL-8 e IL-10.^{14, 15, 16}

3.2. Características relevantes en la respuesta inflamatoria y función de la interleucina 8 (IL-8)

La IL-8 integra la familia de citocinas inflamatorias de bajo peso molecular a las que se les refiere como quimiocinas.¹³ Esta molécula es el miembro mejor caracterizado de la familia CXC.¹⁴

Este tipo de citocinas presentan 4 residuos conservados de cisteína.¹³ Actúa como factor quimiotáctico y activante de neutrófilos, células T, basófilos y eosinófilos.¹⁵

La interleucina 8 es producida por fagocitos, monocitos, linfocitos T activados, neutrófilos, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliales, plaquetas, queratinocitos, hepatocitos, condrocitos, astrocitos y células asesinas (NK).¹³

El gen de la IL-8 consiste de 4 exones y 3 intrones,¹⁶ este gen se localiza en el locus 4q12-21.¹⁷

La IL-8 ejerce un gran número de actividades pro-inflamatorias. Produce degranulación de los neutrófilos, induce la expresión de moléculas de adhesión y favorece así la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales.¹³ La IL-8 tiene efectos biológicos *in vivo* e *in vitro*.¹⁶ **tabla 1**

Efectos <i>in vitro</i>	Efectos <i>in vivo</i>
Incrementa la adherencia en células endoteliales	Induce la infiltración de neutrófilos y linfocitos
Aumenta las moléculas de adherencia de granulocitos	Induce permeabilidad vascular
Incrementa los componentes receptores tipo 1	Destruye la membrana sinovial y alveolar asociada con la infiltración de neutrófilos y linfocitos
Aumenta la unión de la proteína del complemento C3bi	

Tabla 1. Efectos *in vivo* e *in vitro* de IL-8

3.3. Características relevantes en la respuesta inflamatoria y función de la interleucina 10 (IL-10)

La IL-10 fue inicialmente descrita como factor inhibidor de la síntesis de citocinas.¹³ Esta citocina es producida por diferentes tipos celulares, entre los que encontramos células T, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células cebadas, células B, eosinófilos, queratinocitos, células epiteliales y varias líneas celulares tumorales.^{13, 18}

El gen de esta interleucina se encuentra en el cromosoma 1, es una proteína de 160 aminoácidos que contiene 5 residuos de cisteína conservados; tiene un peso molecular de 18 kD.¹³

Aún no está completamente claro el mecanismo de retroalimentación de la IL-10, sin embargo, se conocen los efectos que causa en monocitos/macrófagos y neutrófilos, tales como inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a lipopolisacárido (LPS).¹⁸

La IL-10 presenta acciones pleiotrópicas, tiene efectos supresores y en ocasiones estimuladores. Inhibe la producción de IL-12, que trae como consecuencia el abatimiento de IFN- γ e IL-2, también regula la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II y es un potente inmunosupresor de los macrófagos, en los que evita la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12).¹⁸

La IL-10 aumenta su actividad inhibitoria al activar al receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra).¹⁹

3.4. Células efectoras

Los leucocitos participan en la defensa del hospedero. La primera línea de defensa son los polimorfonucleares (PMN), los cuales están integrados por neutrófilos, eosinófilos y basófilos.¹²

13, 20

3.4.1. Leucocitos polimorfonucleares (PMN)

3.4.1.2. Leucocitos neutrófilos

Estas células poseen núcleo multilobulado, el citoplasma contienen dos tipos de gránulos: 1) los gránulos primarios (azurófilos) que contienen mieloperoxidasa, proteínas básicas ricas en arginina, mucopolisacáridos sulfatados y fosfatasa ácida; 2) gránulos secundarios que son ricos en fosfatasa alcalina, lisozima y animopeptidasas. Los primeros se presentan en etapas tempranas del neutrófilo y los segundos en la etapa madura del neutrófilo; sin embargo ambos tipos de gránulos son de gran importancia en la destrucción y digestión a través de enzimas del patógeno ingerido por el neutrófilo.²¹

Los neutrófilos actúan fagocitando a los microorganismos en las primeras etapas de la respuesta inmune innata.^{13, 20}

Los neutrófilos reconocen a los microorganismos por medio de diferentes receptores que actúan estimulando la migración de las células al sitio de infección, intervienen en la fagocitosis y estimulan la producción de sustancias microbicidas que destruyen al agente patógeno.

Los receptores de los neutrófilos se unen a moléculas de adhesión específicas que presentan las células epiteliales, como primer paso para iniciar la migración al sitio de infección, esto hace que dichas células disminuyan su velocidad e inicien la migración. Una vez en el sitio infectado, los neutrófilos utilizan los receptores para reconocer los productos microbianos, unirse a los microorganismos y fagocitarlos.¹²

3.4.1.3. Eosinófilos

Los eosinófilos se forman en la médula ósea a partir de las células troncales. En su superficie membranal poseen receptores para IgE, IgA, IgG y para los componentes del complemento C3b y C4, juegan un papel muy importante en la destrucción de parásitos.¹³

Los eosinófilos tienen un diámetro de 13-17 μm , poseen tres tipos diferentes de gránulos. Gránulos pequeños que se encuentran en los estadios maduros de estas células, su función es modular la producción de leucotrienos a través de enzimas. Los gránulos primarios están presentes en los promielocitos. En los gránulos secundarios localizamos proteínas tales como la proteína básica principal (MBP), la cual tiene una fuerte afinidad por colorantes ácidos, como la eosina, a ello se debe la tinción rosa de los gránulos; otra de sus funciones es inducir la liberación de histamina de los basófilos.¹³ El gránulo secundario posee moléculas entre las que encontramos a la proteína básica eosinófila (EBP), que resulta tóxica para helmintos;²¹ la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) que es una potente neurotoxina y helmintotoxina;¹³ y la peroxidasa del eosinófilo (EPO) que provoca la muerte de microorganismos que incluyen a bacterias, micoplasma, virus, hongos, helmintos y otros parásitos por medio de la oxidación de algunas moléculas.¹³

3.4.1.4. Basófilos

Los basófilos provienen del mismo precursor de la línea de los neutrófilos y monocitos. Maduran en médula ósea, cuentan con un diámetro de 5-7 μm . Representan no más del 1% de las células nucleadas en médula ósea o sangre periférica.^{12, 13}

Los basófilos se distinguen por sus voluminosos gránulos púrpuras o azul negruzco que contienen mucopolisacáridos ácidos a los cuales deben su color.²¹

El basófilo es fuente importante de histamina, además media la reacción alérgica por la interacción con IgE, esta unión provoca la formación de productos de la ciclo-oxigenasa, lipoxigenasa y del PAF, todos estos son mediadores de la inflamación.^{12, 13, 21}

Cantidades moderadas de basófilos se acumulan en los tejidos en diversos padecimientos inflamatorios que afectan la piel.^{12, 13}

3.4.2. Leucocitos mononucleares

Los macrófagos forman parte del sistema fagocítico mononuclear, el cual engloba a un conjunto de células (monoblastos, promonocitos, monocitos y macrófagos) derivadas de un precursor común y una de cuyas funciones principales es la fagocitosis. Junto con los neutrófilos, el sistema fagocítico mononuclear constituye el principal mecanismo de defensa del organismo frente a agentes extraños como los microorganismos.²⁰

Los monocitos son células relativamente grandes (12-20 μm de diámetro) con núcleo en forma de riñón y poseen lisosomas; de estas células se derivan los macrófagos, los cuales fagocitan microorganismo en la fase tardía. El monocito es más pequeño que su progenitor inmediato, el promonocito, pero tiene una capacidad fagocítica y un sistema lisosomal más desarrollado. Normalmente, el monocito pierde su capacidad proliferativa, aunque en ciertas condiciones, puede llegar a dividirse.

Así, la generación basal de monocitos en la médula ósea es un proceso regulado por el balance entre los factores de crecimiento, producidos por las propias células durante su diferenciación. El monocito es capaz de dejar la médula ósea, pasar al torrente circulatorio y, desde allí, a los

tejidos, gracias a la interacción entre moléculas de adhesión (adhesinas e integrinas) existentes en la superficie de los monocitos y de las células del endotelio vascular.^{12, 20}

Una vez en los tejidos, el monocito culmina su maduración y se convierte en un macrófago. De manera general, los macrófagos son células de baja velocidad en el torrente circulatorio, toman muestras del microambiente a través de pinocitosis, para detectar citocinas o alguna otra sustancia que indique infección. Cuando detectan algún mediador inflamatorio lleva a cabo el proceso de activación, el cual consiste en un aumento en el índice metabólico, motilidad y actividad fagocitaria. Los macrófagos tisulares son capaces de proliferar en dichos tejidos en condiciones basales (no activados) gracias a la presencia o a la producción autocrina de M-CSF, así como a la presencia de citocinas y de otros factores de crecimiento no específicos como el GM-CSF y la IL-3.^{13, 22}

Los macrófagos expresan en su membrana receptores específicos para algunos componentes de los microorganismos, entre los que se encuentran el receptor de manosa, CD14 y la recientemente descubierta familia de receptores tipo TOLL (TLR).

4. Activación celular

4.1 Características bioquímicas y funcionales del LPS

El LPS, también conocido como endotoxina, es uno de los componentes estructurales de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas. Desde el punto de vista estructural, el LPS está compuesto por tres regiones: una región central formada por polisacáridos, una estructura de tipo antígeno-O y una tercera, (en este caso la más importante) la llamada lípido A, que representa la estructura biológicamente activa.^{23, 24} **Fig 2**

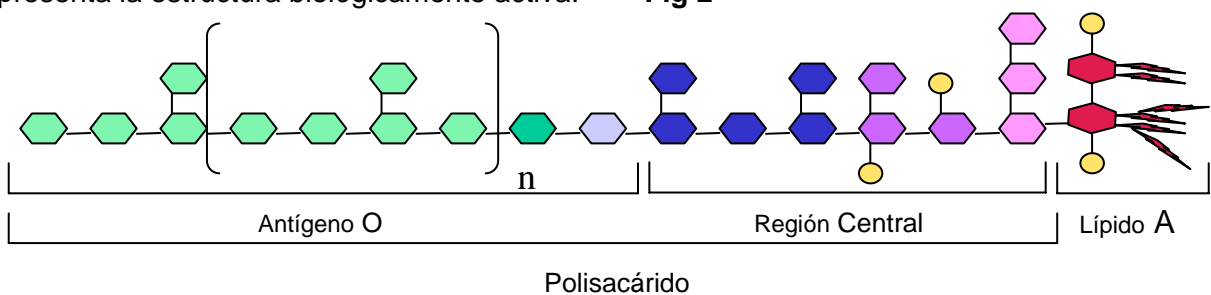


Figura 2 Estructura del Lipopolisacárido (LPS)

En los macrófagos, el LPS induce la síntesis de citocinas, tales como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α/β , TGF- β , metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) y otros lípidos bioactivos (factor activador de plaquetas, etc), péptidos quimiotácticos como MIP-1 α , y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.^{14, 15}

Mientras que una respuesta inflamatoria local generada por el LPS es benéfica para luchar contra las infecciones de bacterias Gram negativas, la respuesta inmunológica generalizada y exagerada debido a la presencia de LPS en la circulación puede conducir a un shock tóxico, capaz de causar la muerte a un individuo.¹²

4.2. Sistema de receptores tipo Toll (TLR)

Los receptores tipo Toll forman una familia de proteínas transmembranales.

El nombre Toll se debe a la exclamación que pronunció uno de sus descubridores, cuando trabajando con embriones de *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) observó que el embrión no salió del huevo ni desarrolló células de tipo laterales. La falta de desarrollo se tradujo en un embrión carente de mesodermo y sistema nervioso. Al verlo Nüsslein-Volhard exclamó “toll!”, palabra que en alemán se utiliza como sinónimo de “vistoso” o “genial”.²⁴

Alrededor de 1980 se descubrió el receptor Toll en *D. melanogaster*, a través de un barrido mutagénico para genes que contienen patrones dorsoventrales en embriones de *Drosophila*.²⁴ Este acontecimiento abrió un panorama amplio en la investigación de las proteínas Toll en *D. melanogaster*.

Hay nueve genes que codifican para las proteínas Toll en *Drosophila* (dToll 1 - dToll 9), el miembro de la familia mejor caracterizado es dToll1, el cual tiene un papel crucial en el patrón dorsoventral en embriones de moscas, así como en la defensa contra hongos en moscas adultas.²⁶

Además de dToll1, también están implicados en la respuesta inmune, dToll 5/Tehao y dToll 9.²⁷

Después del descubrimiento de los genes Toll en *Drosophila*, se encontró un homólogo en

humanos.²⁸ Actualmente conocido como TLR4. Estudios posteriores descubrieron varias proteínas relacionadas estructuralmente con TLR4, las cuales ahora constituyen la familia Toll-Like Receptors (TLR), con 11 miembros TLR1- TLR11.²⁴

La caracterización de las proteínas Toll mostró que pertenecen a una familia de receptores transmembranales tipo 1. Tienen un dominio extracelular variable de repeticiones ricas en leucina. También poseen una región conservada intracelular carboxi-terminal llamada Toll/receptor de Interleucina 1 (IL-1R), mejor conocido como dominio TIR. La región rica en leucina es esencial para el reconocimiento de cada una de las moléculas estructurales o producidas por los patógenos.

La diferencia entre IL-1R, dToll 1 y TLR4 humano, es que los dos últimos tienen en el dominio extracelular repeticiones ricas en leucina (LRR) y están flanqueados por secuencias ricas en cisteína, mientras que IL-1R contiene inmunoglobulinas.²⁵ **Fig. 3**

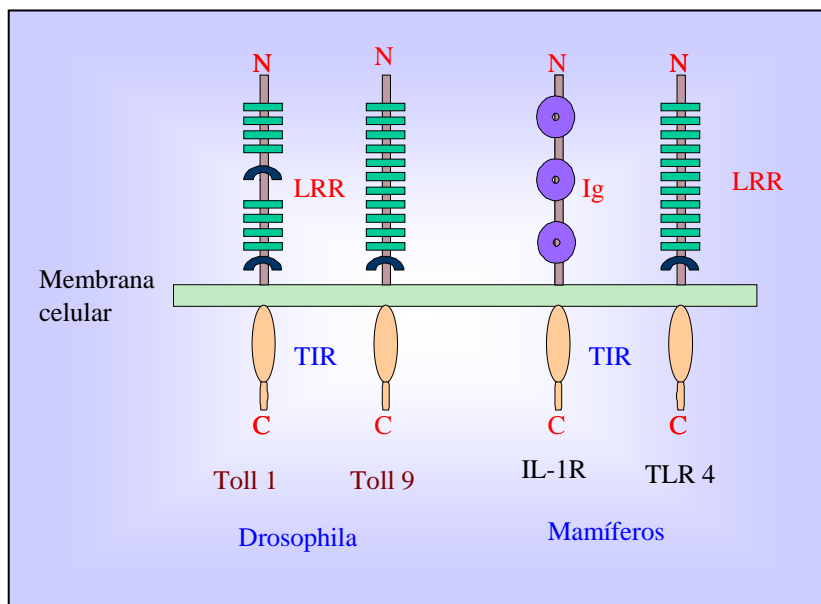


Figura 3 Componentes estructurales de las proteínas Toll en *Drosophila* y Mamíferos.

4.2.1. TLR en mamíferos

Estudios posteriores permitieron el descubrimiento de las proteínas Toll en al menos cuatro Phyla. Entre los cuales se encuentra el phylum Chordata.²⁹ **tabla 2**

Phylum	Especies Representativas
Nematoda	Caenorhabditis y Strongyloides
Artropoda	Drosophila y Anópheles
Echinodermata	Strongylocentrotus
Chordata	Humano y Ratón

Tabla 2. Phyla en los cuales se han identificado TLRs.

La primera línea de defensa involucra diferentes tipos celulares, dependiendo del tejido que se encuentre afectado, será el tipo celular que se active. Algunos estudios se han enfocado en conocer la expresión de cada uno de los integrantes de la familia de TLR en las células que participan en la respuesta inmune.^{30, 31}

4.2.2. Organización genética

El estudio del mapeo genético reveló que los genes involucrados con la expresión de los TLRs humanos, están distribuidos en el genoma.³⁰ **Tabla 3**

Cromosoma	TLR
1	TLR 5
3	TLR 5
4	TLR1, TLR2, TLR3, TLR6 y TLR10
9	TLR4
X	TLR7 y TLR8

Tabla 3 Cromosomas que codifican a los TLRs

4.2.3. Características estructurales

Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que tienen una sola función en la respuesta inmune.

Los dominios LRRs están involucrados en el reconocimiento de los componentes estructurales de los diferentes patógenos. La característica de los LRRs es la secuencia consenso, $L(X_2)LXL(X_2)NXL(X_2)L(X_7)L(X_2)$, en el cual X es algún aminoácido y L es una leucina. La región LRR en los TLRs está separada por una región transmembranal llamada dominio LRR carboxiterminal, compuesto por cisteína. La región carboxi-terminal posee el motivo consenso $CXC(X_{23})C(X_{17})C$.

El dominio TIR de las proteínas Toll es un módulo de interacción proteína-proteína, en el cual también se encuentran proteínas citoplásmicas y transmembranales en animales.³³

4.2.4. Función

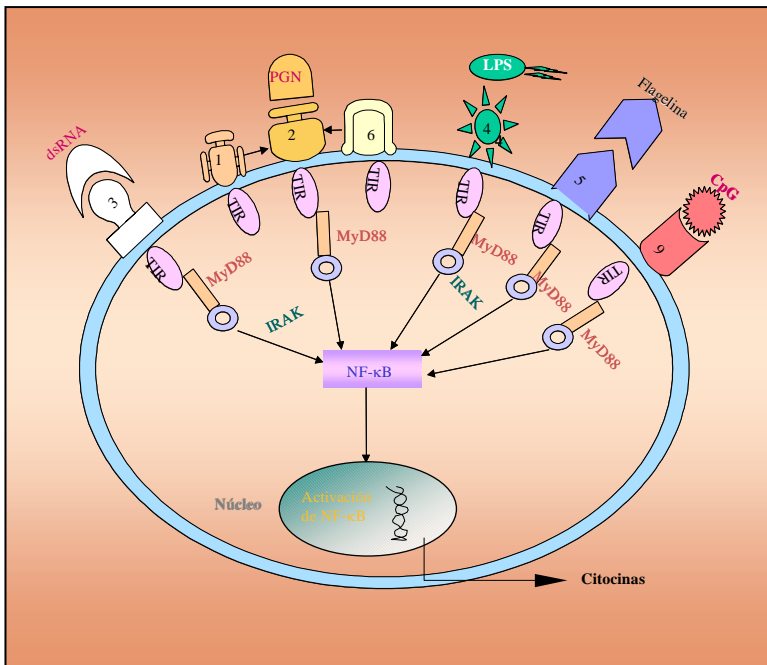
La principal función de los TLRs es alertar al sistema inmune cuando detecta la presencia de microorganismos. Al unirse los TLRs con su respectivo ligando, activa varios mecanismos que tienen como finalidad la producción de componentes, tales como citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y moléculas efectoras, dependiendo del tipo celular que se active.³⁴

4.2.5 TLRs y sus ligandos

Los TLRs reconocen patrones microbianos específicos. Desde que se descubrió el primer TLR, se ha incrementado su estudio y con ello también ha aumentado el número de miembros que forman a la familia de TLRs **Tabla 4**. Hasta ahora se han descubierto 13 TLRs en mamíferos, así como también se han identificado la mayoría de sus respectivos ligandos. **Fig. 4**

4.2.5.1. TLR4

El TLR4 fue el primer Toll de mamífero caracterizado. TLR4 funciona como receptor de LPS. El reconocimiento de LPS requiere un complejo de varias moléculas accesorias. La formación del complejo provoca diversas respuestas inmunoestimuladoras. Un efecto inflamatorio al inducir la expresión de IL-12, TNF, sintetasa de óxido nítrico, etc.²⁸



TLR4 sólo se activa con aquel LPS que proviene de *Escherichia coli* o *Salmonella*. Varios estudios han demostrado que los LPS que provienen de *Leptospira* y *Porfiromonas* no se unen a TLR4.²⁴

TLR4 reconoce, además, a otros ligandos, por ejemplo, se une a Taxol que es un diterpeno derivado de plantas. También es sensible a una proteína que genera el virus sincisial respiratorio (RSV).

TLR4 puede activarse por moléculas producidas en la respuesta inflamatoria o en el tejido dañado, tales como fibronectina o colágena que son productos de la degradación de la matriz extracelular.²⁴

Para que se lleve a cabo el reconocimiento del LPS, y posterior señalización intracelular a través de TLR4, se necesita que el LPS se encuentre unido a la proteína denominada proteína de unión a LPS (LBP).³⁹ LBP retiene y transporta al LPS, lo cual facilita la unión del LPS con el CD14 presente en las células mieloides.²⁴ El CD14 es una glicoproteína que puede encontrarse anclada a una molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) en la membrana de monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, o bien, soluble en la circulación.²⁴ El CD14 se

asocia físicamente con un complejo proteico que incluye al TLR4 y una proteína accesoria, MD-

2.^{41, 42} **Fig. 5**

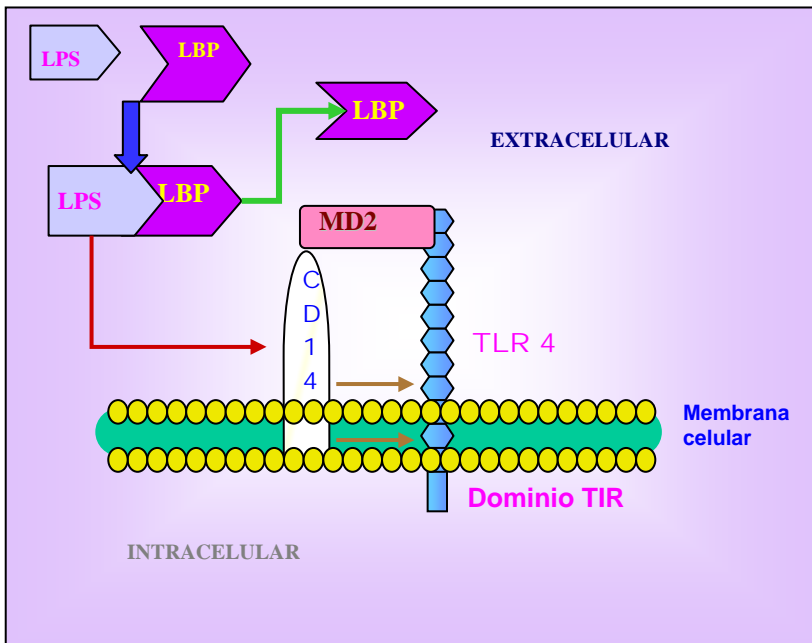


Figura 5 Formación del complejo LBP-CD14-MD2-LPS-TLR4 para la señalización de LPS

5. Factor 88 de diferenciación mieloide (MyD88)

5.1 Características bioquímicas

MyD88 originalmente fue identificado como un marcador de diferenciación en precursores mieloides murinos, de ahí su nombre.⁴³ Estudios posteriores mostraron que MyD88 está codificada en el cromosoma 3 en el locus 3p 21.3-p22.

MyD88 es una proteína con 296 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 33.2 kDa. Está compuesta de 5 exones y 4 intrones. El primer exón codifica para el dominio de muerte (DD), el cual se encuentra integrado por la región que va del aminoácido 1 hasta el aminoácido 109, el segundo codifica para el dominio intermedio (ID), este dominio está constituido por los aminoácidos 110 al 155 y el tercer exón codifica para el dominio TIR, formado por los aminoácidos 156 al 296.^{34, 44, 46, 47}

TLR	Patógeno	Ligando
TLR 2	Bacterias Gram-positivas	Lipoproteínas Acido lipoteicoico Lipopéptidos
	Micoplasma	Lipoproteínas
	Micobacterias	Lipopéptidos
	Espiroquetas	Lipoarabinomananas
	Porfiromonas	LPS
	Hongos	Zimosan
	Trypanosoma cruzi	Glicosilfosfatidil inositol
TLR 3	Neisseria meningitidis	Factor soluble
TLR 4	Virus	RNA de doble cadena
TLR 5	Bacterias Gram-negativas	LPS
	Bacterias Gram-positivas	Acidos lipoteicoicos
	Plantas	Taxol
	Virus Sincisial Respiratorio	Proteína de fusión
TLR 7	Flagelina	Bacterias flageladas Gram-positivas y Gram-negativas
TLR 9	Compuestos químicos	Imidazoquinolinas
TLR 8, TLR 10	Bacteria	DNA CpG no metilado
TLR 1, TLR 6	Desconocido	
	Cofactores para TLR 2	

Tabla 4. Miembros de la familia de TLRs y sus ligandos

5.2. Función

Inicialmente MyD88 se describió, como un gen de respuesta a la diferenciación mieloide.⁴³ Posteriormente se encontró expresado en una gran variedad de tejido no mieloide, lo cual indicó que podría tener diversas funciones biológicas. También se reportó que MyD88 activa el gen promotor de IL-8, dependiente de NF- κ B, en células Cos7.⁴⁴ Otro grupo de investigadores señala que MyD88 juega un papel crucial en la señalización de IL-1, al reclutar IRAK y activar NF- κ B.^{45, 47}

Las proteínas que contienen dominio de muerte se relacionan con la apoptosis, sin embargo la sobre-expresión de MyD88 no induce la respuesta apoptótica inmediatamente; aunque en

periodos largos (2-3 días de estímulo) aparece un efecto citotóxico retrasado sólo en las células que expresan niveles altos de MyD88.⁴⁸

En ratones deficientes de MyD88 no hay proliferación de células T, ni inducción de citocinas en respuesta al estímulo de IL-1. La producción de INF- γ y la activación de células NK se suprime cuando se estimula con IL-18, además se bloquea la activación de NF-kB y JNK. Esto demuestra que MyD88 es muy importante en la cascada de señalización mediada por IL-18R e IL-1R.⁴⁹

MyD88 también forma parte de la señalización de la familia hToll, este dato se obtuvo al analizar versiones truncadas de MyD88 en el dominio de muerte y el dominio TIR.^{35, 50}

Las similitudes que presentan la familia IL-1R con los miembros de familia Toll llevó a la hipótesis de que MyD88 también era importante en la señalización de TLR4. Para confirmar dicha hipótesis Kawai, et al., trabajaron con ratones knockout MyD88 a los cuales estimularon con LPS para activar la señalización dependiente de TLR4, donde encontraron que las funciones mediadas por LPS se suprimieron por completo.⁵¹

Estos resultados mostraron que MyD88 es esencial en la señalización de TLR4 mediada por LPS. MyD88, no sólo está íntimamente relacionada con TLR4, sino también es indispensable en la señalización mediada por moléculas estimuladoras que forman parte de la pared celular bacteriana.⁵²

5.3 Cascada de señalización

5.3.1 Señalización dependiente de MyD88

Una vez que el LPS interactúa con todo el complejo proteico del receptor TLR4, se produce la dimerización del receptor y el consiguiente reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88, enseguida viene una segunda molécula, que es la proteína adaptadora de MyD88 (Mal).⁵³ Se realizaron estudios en ratones deficientes de Mal, en los cuales se mostró que Mal es esencial para trabajar junto con MyD88.^{54, 55, 56} Se describió una resistencia al efecto tóxico a LPS y una

producción nula de IL-6, TNF o IL-12p40, inducida por LPS; también hay retraso en la activación de NF- κ B y MAPK, sugiriendo ello que Mal es esencial para que MyD88 sea reclutada y para actuar con esta proteína.⁵⁷

Al ser reclutada MyD88, interactúa la región del dominio TIR de ésta con la región homóloga (TIR) del TLR 4 (interacción homofílica). Mientras tanto el dominio de muerte de MyD88 atrae a IRAK-1 para unirse con éste.^{58, 47} Dicho complejo no es suficiente para fosforilar a IRAK-1, por lo que el complejo MyD88-IRAK-1 recluta a otra cinasa, IRAK-4. IRAK-4 se une al complejo receptor para catalizar la fosforilación de IRAK-1. Una vez que se activa IRAK-1, se inicia una autofosforilación que culmina con un IRAK-1 hiperfosforilado, fenómeno que permite que el complejo se asocie con el Factor 6 asociado al receptor de necrosis tumoral (TRAF-6).⁵⁹

Esta asociación permite que TRAF6 se una con una MAPKK Kinasa, TAK-1 a través de una proteína adaptadora denominada TAB2. TAK-1 está relacionada en la activación del factor de transcripción NF- κ B mediante la fosforilación del inhibidor I κ B.^{52,53} La activación de TRAF6 puede también transmitir la señal iniciada por el LPS a través de la proteína adaptadora señalización intermedia conservada evolutivamente (ECSIT) que actuaría de puente entre TRAF6 y la activación de MEKK1.⁶⁰ El resultado final de este proceso conduce a la activación de dos vías; por un lado la activación de las MAP quinasas y por otro lado la de NF- κ B. **Fig. 6**

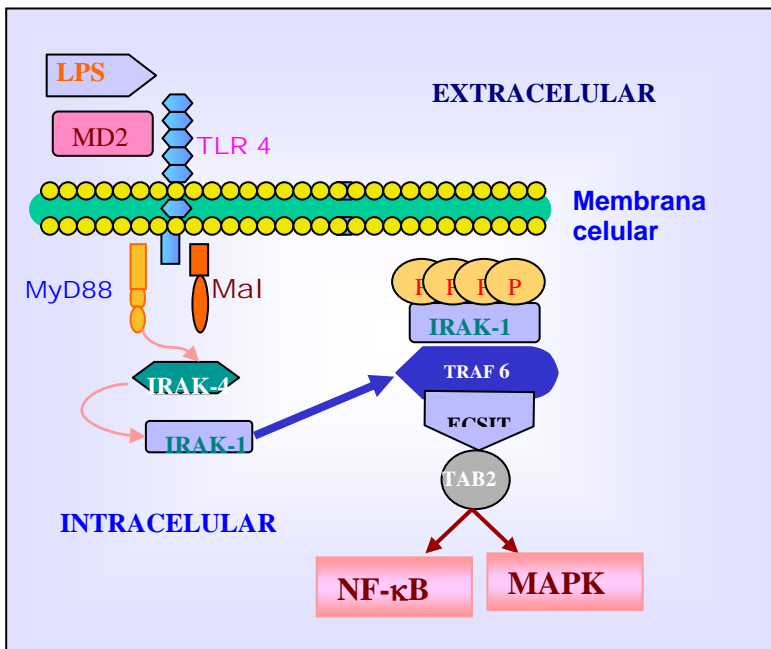


Figura 6 Señalización dependiente de MyD88

5.3.1.1. Sistema de señalización NF-κB

La familia de factores de transcripción NF-κB contiene a cinco miembros. NF-κB₁ (p105/p50), NF-κB₂ (p100/p52), Rel A (p65), Rel B y cRel. Todos los componentes de esta familia están involucrados en la unión, dimerización e interacción con la familia IκB.⁶¹

Cuando se une NF-κB con IκB, se forma un complejo que se mantiene inactivo en el citoplasma.⁶² Este complejo activa a las cinasas de IκB (IKK) las cuales fosforilan a IκB. Son al menos tres cinasas presentes en esta familia, IKKα, IKKβ y NEMO/IKKγ.^{63, 64, 65}

La fosforilación de IκB provoca su ubiquitinación y la posterior degradación de la misma. NF-κB entonces está libre para trasladarse hacia el núcleo e iniciar la producción de citocinas.

La activación de NF-κB conlleva a la expresión de diferentes genes, entre los que se encuentran quimiocinas, moléculas de adhesión, citocinas pro y anti-inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF, etc).

La producción de los genes dependientes de MyD88 a través de la activación de NF-κB dependerá en gran medida del estímulo, pero sobre todo de la estirpe celular que sea estimulada.^{34, 35, 37} **Fig. 7**

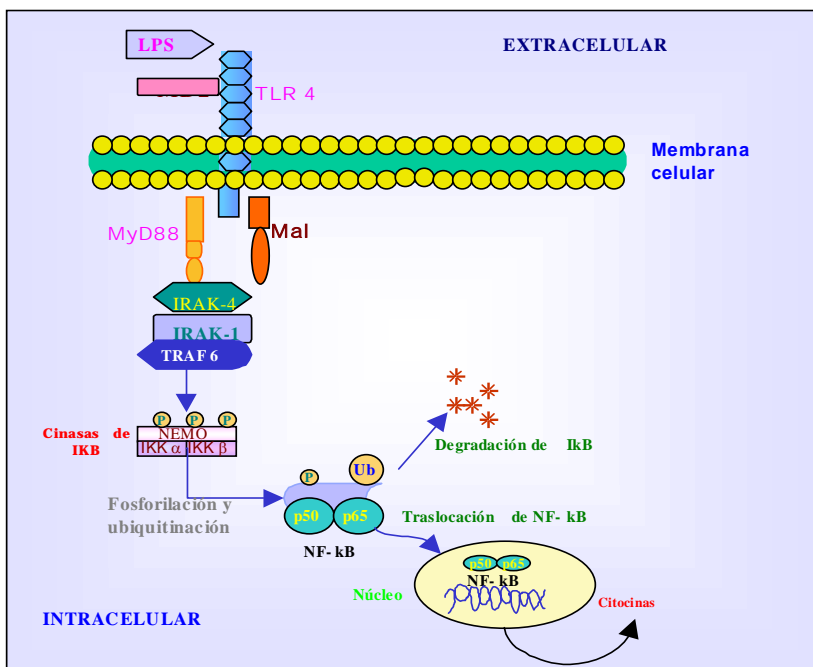


Figura 7 Señalización de NF-κB dependiente de MyD88

5.3.1.2 Sistema de señalización MAPK

La activación del receptor del LPS induce la fosforilación en tirosina de un gran número de proteínas citoplasmáticas. MAP quinasas y p38 son las principales cinasas activadas en respuesta a LPS y a otros estímulos de estrés celular.

5.3.1.2.1. Activación de JNK

La cinasa JNK representa el segundo grupo de MAPKs que han sido identificadas en mamíferos. Las proteínas JNK están codificadas por los genes *Jnk1*, *Jnk2* que se expresan en todos los tejidos y *Jnk3* que se encuentra restringido a cerebro, corazón y testículos. Estos genes, a través de *splicing* alternativos, generan varias isoformas de JNK, de unos 46 a 55 KDa. La especificidad de estas isoformas determina el sustrato sobre el cual actuarán.⁶⁶

La cascada de señalización de la vía JNK empieza con la activación de las MAPKKK (**Fig 8**). Mediante ensayos de transfección y actividad de cinasas *in vitro*, se han descrito las proteínas implicadas en esta primera fase. Así, en esta parte encontramos a los miembros de la familia MEKK (MEKK1-4), los de la familia MLK (mezcla de linaje de las protein-cinasas) (MLK1-3, DLK y LZK), de la familia ASK (cinasas reguladoras de la señal de apoptosis) (ASK1-2), TAK (-*cinasas-1 activadas por TGF- β*) y Tpl- 2. En muchos de estos casos, la activación de estas proteínas dependerá del tipo de estímulo que reciba la célula.^{67, 68, 69, 70}

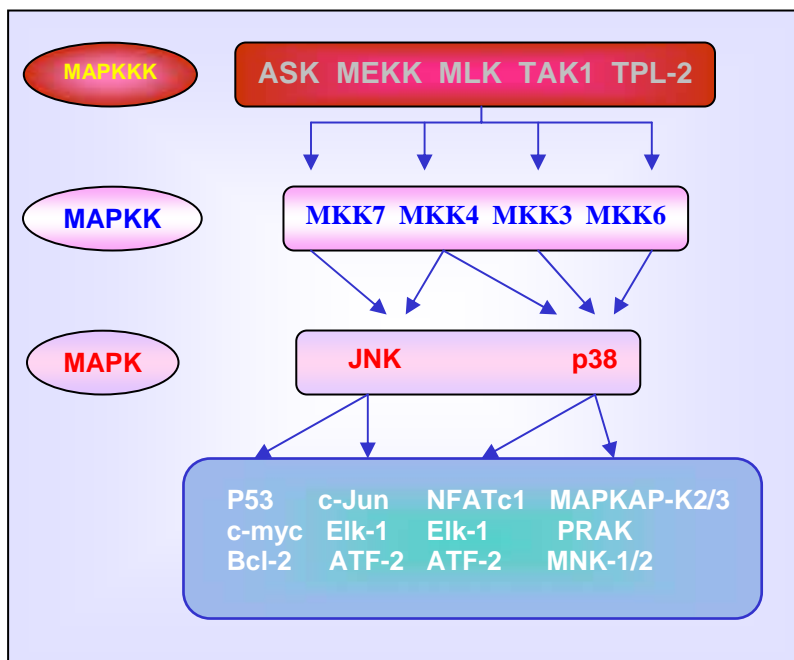
La activación de JNK por citocinas inflamatorias parece ser mediada por la proteína adaptadora TRAF.⁷¹ La activación del receptor del TNF- α mediante el reclutamiento de TRAF2, podría inducir la activación de MEKK1 y ASK1 (MAPKKK), con la posterior activación de JNK. En el caso de la citocina IL-1, la proteína TRAF6 es la que activa a través de dos posibles mediadores, ECSIT⁷² o TAB2.⁷³

Las proteínas JNK podrán ser activadas también por fosforilación en residuos treonina y tirosina por el grupo MAPKK. A este grupo pertenecen las isoformas de MKK4 y MKK7 (**Fig.8**). La proteína quinasa MKK7 es preferencialmente activada por citocinas (TNF- α e IL-10), mientras

que la activación de MKK4 desempeña un papel importante en el estrés. MKK4 y MKK7 pueden fosforilar a JNK, pero estas cinasas presentan especificidades diferentes por otros sustratos.⁷⁴

5.3.1.2.2 Activación de p38

Este grupo de las MAP quinasas comprende a cuatro miembros de serina/treonina cinasas de 38 KDa, de ahí su nombre. Estas isoformas son conocidas como p38 (también denominada *CSAIDs binding protein*, CSBP o SAPK2a), p38 (SAPK2b o p38-2), p38 (SAPK3 o ERK6) y p38 (SAPK4). Al igual que la subfamilia de JNK, las p38s son fuertemente activadas *in vivo* por condiciones de estrés celular y/o citocinas inflamatorias, aunque también se ha descrito su activación por la insulina y algunos factores de crecimiento. En casi todos los casos, los mismos estímulos que activan a JNK también pueden activar a p38.⁷⁵



Por último, los principales sustratos de las p38 son las serina/treonina cinasas de la familia MAPKAR-K2/3 (proteín-cinasas activadas por MAPK) y PRAK (cinasas activadas/reguladas por p38). La acción de estas quinasas sobre la proteína de shock térmico (HSP)-27 contribuye a la reorganización del citoesqueleto afectando a la motilidad celular.⁷⁶ Por otro lado, p38 modula

directamente a las cinasas MNK-1/2 y MSK-1 (proteín-cinasas activadas por estrés y mitógenos). Estas cinasas pueden ser activadas tanto por ERK-1/2 como por p38 (en respuesta a estrés celular).⁷⁷

5.4. Señalización independiente de MyD88

Estudios en ratones dobles negativos de MyD88 (MyD88^{-/-}) revelaron la existencia de dos vías de señalización, una dependiente de MyD88 y otra independiente de MyD88 en la señalización inducida por LPS/TLR4.⁷⁸

De manera independiente dos grupos identificaron una proteína, la cual activó la sobre-expresión de NF-κB, pero dicha activación no es tan potente como la producida por el complejo Mal-MyD88. A esta proteína se le dio el nombre de TRIF (*adaptadora que contiene el dominio TIR inductora de interferón-β*)⁷⁹ o TIKAM-1 (molécula adaptadora-1 del dominio TIR).⁸⁰

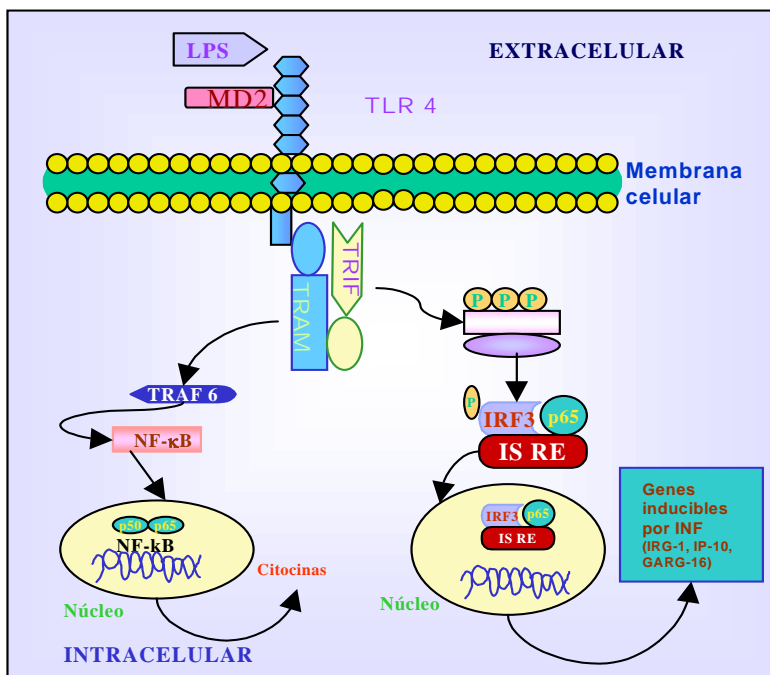


Figura 9 Señalización independiente de MyD88

Yamamoto *et al* describe, en ratones deficientes de TRIF/MyD88, que esta molécula es muy importante en la señalización de TLR4 inducida por LPS, pues al determinar la activación de NF- κ B, esta se encuentra abolida.⁸¹

La interacción de TLR4 con TRIF mostró ser muy pobre, lo que llevó a buscar otro candidato que funcionara de puente entre estas dos moléculas.

Se describió una molécula a la cual nombraron TRAM (molécula adaptadora relacionada a TRIF),⁸² TIRP (*proteína que contiene el dominio TIR*)⁸³ y/o TICAM-2 (*molécula adaptadora-2 que contiene a TIR*).⁸⁰

En estudios de co-inmunoprecipitación se muestra que TRAM activa a IRF-3 (*factor 3 regulador de interferón*) y que junto con TRIF inducen la traslocación de IRF-3 hacia el núcleo.⁸³

La ruta independiente de MyD88 es responsable de la activación tardía de NF- κ B e IRF-3. La activación de NF- κ B inducida por la ruta independiente involucra la unión de TRIF con TRAF6.⁸⁴

IKK ϵ y proteína de unión a TANK (TBK)-1 actúan como cinasas de IRF-3, permitiéndole la fosforilación y así poder unirse a ISRE (elemento sensible a interferón),⁸⁵ este complejo formado por IRF-3-ISRE necesita de la sub-unidad p65 para activarse y llevar a cabo la traslocación hacia el núcleo⁸⁶ para finalmente activar la producción de los genes inducibles por IFN, tales como IRG-1, IP-10 y/o GARG-16.^{87, 88} **fig.9**

Planteamiento del problema

La inflamación es un fenómeno que se presenta en diversas enfermedades que aquejan al ser humano. El pentapéptido extraído de cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*, denominado FILM ha mostrado tener efectos anti-inflamatorios.

Estudios recientes muestran que el FILM afecta la expresión de algunas quimiocinas pro-inflamatorias y abate la expresión inducida por PMA de MIP-1 α , MIP-1 β , I-309 y el receptor CCR1.

Lo anterior sugiere un mecanismo de acción del FILM, en rutas de señalización intracelular dependientes de MyD88.

Objetivos

- Determinar si el FILM regula la expresión de IL-8 e IL-10
- Valorar el efecto del FILM en la translocación membranal de MyD88 en mononucleares de sangre periférica.

Hipótesis

La acción anti-inflamatoria del FILM es un efecto dependiente de MyD88 y por ende modula la expresión de la citocina pro-inflamatoria IL-8 y la anti-inflamatoria IL-10.

Métodos

Aislamiento de mononucleares de sangre periférica

A partir de sangre periférica de donadores clínicamente sanos. Se aislaron leucocitos mononucleares usando la técnica de gradiente de Ficoll-Hypaque. **(Anexo 1)**

PCR-tiempo real

Se cultivaron, en placas de 6 pozos, 3×10^6 células por pozo, a 37°C y 5% CO_2 , durante 24 hrs en presencia de FILM ($50 \mu\text{g}/10^6$ células/mL), LPS ($10 \text{ ng}/10^6$ células/mL) o la mezcla de FILM ($50 \mu\text{g}/10^6$ células/mL) + LPS ($10 \text{ ng}/10^6$ células/mL). Se cosecharon los mononucleares, se extrajo el RNA por el método de Trizol **(Anexo 2)**, se hizo la conversión a cDNA y se determinó la expresión relativa del transcrito de las interleucinas 8 y 10 usando la técnica de PCR Tiempo Real. **(Anexo 3)**

Microscopía confocal

Se cultivaron, en placas de 6 pozos, 1×10^6 células por pozo, a 37°C y 5% CO_2 , durante 24 hrs en presencia de FILM ($50 \mu\text{g}/10^6$ células/mL), LPS ($10 \text{ ng}/10^6$ células/mL) o la mezcla de FILM ($50 \mu\text{g}/10^6$ células/mL) + LPS ($10 \text{ ng}/10^6$ células/mL). Se cosecharon las células, se realizaron citocentrifugados en porta-objetos **(Anexo 4)** y se determinó la proteína MyD88 en el citoplasma celular empleando inmunocitoquímica y microscopía confocal. **(Anexo 5)**

ELISA

Se cultivaron, en placas de 6 pozos, 3×10^6 células por pozo, a 37°C y 5% CO_2 , durante 24 hrs en presencia de FILM ($50 \mu\text{g}/10^6$ células/mL), LPS ($10 \text{ ng}/10^6$ células/mL) o la mezcla de FILM ($50 \mu\text{g}/10^6$ células/mL) + LPS ($10 \text{ ng}/10^6$ células/mL). Se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificaron las citocinas IL-8 e IL-10 por el método de ELISA. **(Anexo 6)**

Método estadístico

Los métodos estadísticos tienen dos vertientes, una que contiene modelos que especifican ciertas condiciones acerca de los parámetros de la población de la que se obtuvo la muestra (pruebas paramétricas) y otra donde los modelos estadísticos no especifican las condiciones de los parámetros de la población donde se obtuvo la muestra (pruebas no paramétricas).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el paquete SPSS versión 10, usando la prueba de Wilcoxon, que es un análisis de tipo no paramétrico, debido al pequeño número de muestras obtenidas ($n=4$) y porque los datos no cumplen con una distribución normal.

Resultados

Los cambios biológicos en diferentes niveles de la célula, son propiciados por estímulos externos. Dichos estímulos pueden ser generalizados o dirigidos a una molécula específica.

Las modificaciones en los niveles normales de los componentes celulares se ven reflejados de acuerdo al grado y nivel del estímulo; la mayoría de las moléculas estimulantes son componentes estructurales de microorganismos patógenos, los cuales son reconocidos por receptores membranales específicos, que envían la señal para activar a la célula blanco y eliminar al patógeno.

Todos o la mayoría de los componentes estructurales han sido ampliamente estudiados y se conocen muy bien los cambios que provocan en la célula; uno de ellos es el LPS que es reconocido por uno de los receptores membranales que integran a la familia Toll, TLR4, éste utiliza a la proteína acopladora MyD88 para llevar a cabo su señalización, este fenómeno se ve reflejado en la producción de determinadas citocinas, entre las que encontramos IL-8 e IL-10.

Esta es la razón por la que en este proyecto se utiliza al LPS, como control positivo, para así comparar su efecto contra el que produce la molécula en estudio (FILM). Así como también verificar si en una célula activada con LPS, la presencia de FILM modifica la respuesta.

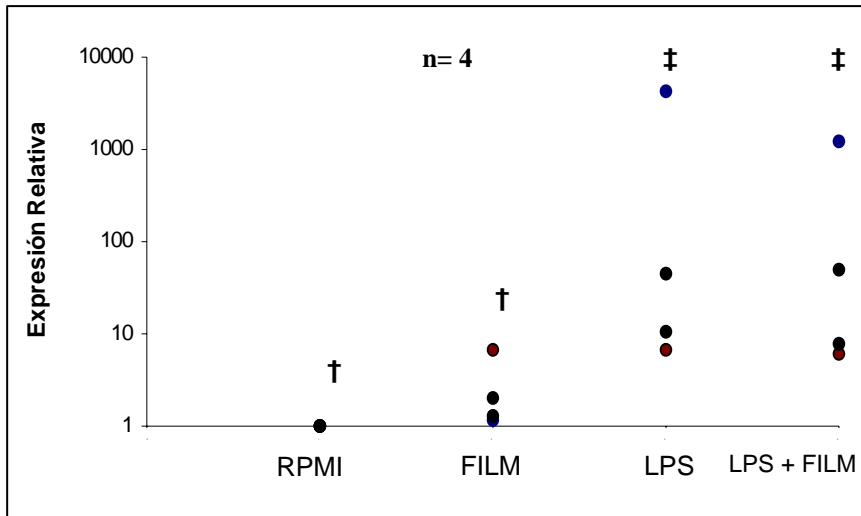
Para identificar un efecto antiinflamatorio del FILM, se utilizaron las citocina pro-inflamatoria IL-8, la antiinflamatoria IL-10 y la proteína acopladora MyD88, en diferentes niveles, proteína (Microscopía confocal y ELISA) y transcrito (PCR en tiempo real).

PCR tiempo real

IL-8

El transcrito de IL-8 con los diferentes tratamientos muestra una distribución heterogénea. Las células cultivadas en medio RPMI representan la concentración estado basal de transcrito de IL-8, el cual se normalizó con un control endógeno (HPRT); el FILM *per se* induce el doble de la expresión del transcrito de IL-8 (2.8 veces más); el LPS, es el control positivo y en todos los

casos muestra un aumento en la expresión con un promedio de 1059 veces más transcrito que el RPMI.



† p= 0.068 ‡ p=1.0

Gráfica 1. Transcrito de IL-8 con diferentes estímulos, después de transcurridas 24 hrs.

En la mezcla de LPS + FILM, el promedio fue de 328 veces más que el RPMI. Al comparar con LPS sólo se observa un abatimiento de un 70% del transcrito de IL-8 en presencia de FILM, sin embargo dicho efecto es no significativo (NS) Gráfica 1.

Se graficó en escala logarítmica, para poder visualizar la ubicación y comportamiento de todas las muestras (n=4).

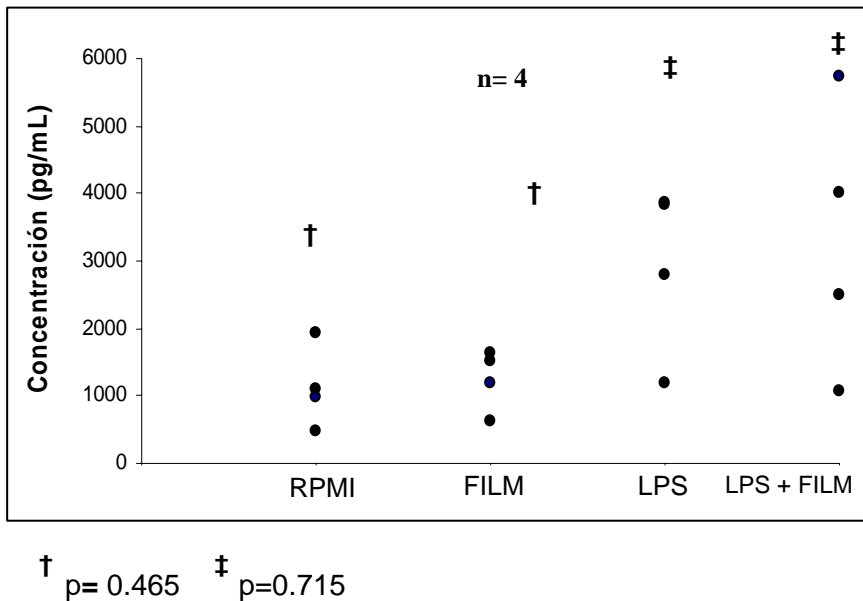
IL-10

La gráfica 2 muestra el comportamiento de la citocina IL-10, que es la molécula antiinflamatoria por excelencia, con los diferentes tratamientos. El RPMI es la concentración basal de los mononucleares de sangre periférica en reposo (sin estímulo), el resultado numérico se normalizó a 1, con la ayuda de un control interno, en este caso, se utilizó el HPRT, y con el apoyo del software Applied Biosystems. El FILM aumentó casi 8 veces el transcrito de IL-10,

ELISA

La técnica de ELISA se utiliza para determinar la concentración proteica a través de una reacción específica antígeno-anticuerpo.

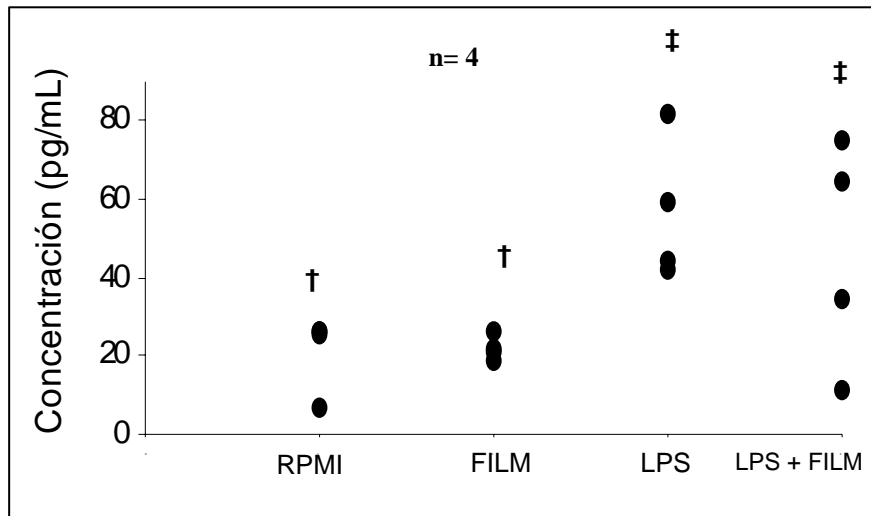
IL-8



Gráfica 3. Concentración proteica de IL-8, con diferentes estímulos durante 24 hrs.

La concentración proteica basal promedio de IL-8 fue de 1129 pg/mL; el cultivo de las células tratadas con FILM no modificó la expresión de la proteína IL-8 (1233.5 pg/mL) con respecto al nivel basal; mientras que el LPS indujo casi el triple (2920.6 pg/mL) de proteína con respecto al basal; por último, la mezcla LPS + FILM, aumentó un 14% (3327.4 pg/mL) la concentración de la proteína inducida por LPS. (NS) Gráfica 3.

IL-10



† p= 0.715 ‡ p=0.144

Gráfica 4. Concentración proteica de IL-10 en células tratadas con diferentes moléculas durante 24 hrs.

La gráfica 4 nos muestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre la expresión de proteína de IL-10. El RPMI presentó una concentración basal promedio de 21.3 pg/mL; mientras que el FILM *per se* no produce ningún cambio en la concentración (21.8 pg/mL) de IL-10, el LPS sobre-expresa la proteína hasta 56.5 pg/mL y la mezcla de LPS + FILM disminuye un 18% (46.5 pg/mL) la concentración proteica inducida por LPS. (NS)

Microscopía confocal

La microscopía confocal es una técnica que hace cortes ópticos y que permite que sólo se observe el plano que está situado en el punto de foco del sistema óptico, eliminando con un diafragma, la luz proveniente de planos que están fuera de foco.

En este trabajo se empleó la técnica de microscopía confocal dirigida hacia MyD88, con la ayuda de anticuerpos anti-MyD88. MyD88 es una proteína acopladora ubicada en el citoplasma

celular, una vez que la célula es estimulada, se inicia un reclutamiento y la cascada de señalización, para que la célula sintetice, entre otras cosas, citocinas.

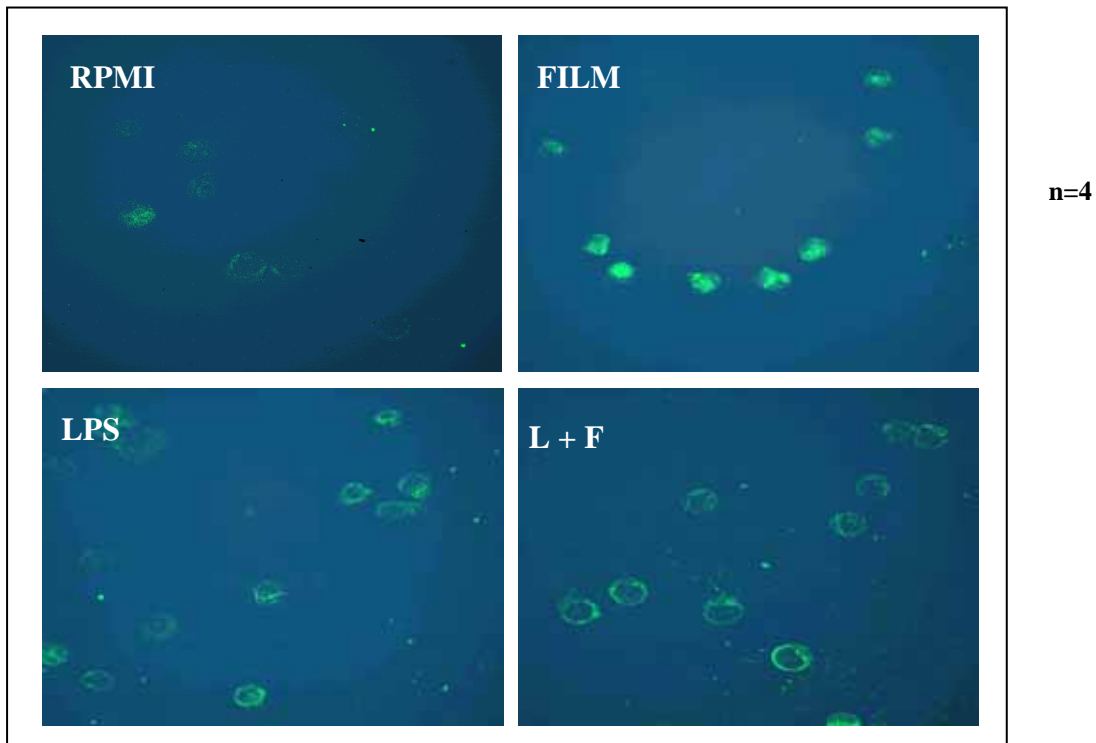


Figura 1. Microscopía confocal para MyD88, en células mononucleares de sangre periférica, con distintos tratamientos, después de 24 hrs.

La figura 1 muestra la distribución de MyD88 con los diferentes tratamientos. RPMI representa la distribución homogénea de MyD88 en el citoplasma; cuando la célula es estimulada con FILM no hay cambios en la distribución de la proteína. El LPS, es un potente activador celular que recluta a MyD88 hacia la membrana citoplásmica de la célula, observándose en el microscopio "donas". Mientras que donde las células son estimuladas con la mezcla, LPS + FILM, aparecen las "donas" producidas por el LPS, sin cambio alguno producido por el FILM.

Discusión

Los leucocitos mononucleares son células de primera línea de defensa del cuerpo frente a las infecciones, reconocen múltiples antígenos y dependiendo del antígeno es el tipo de respuesta inmunitaria que presentan. Los leucocitos mononucleares poseen en su membrana un grupo de receptores tipo Toll capaces de reconocer ligandos específicos. Uno de sus miembros mejor conocido es el TLR4, quien tiene como ligando al LPS.

Es bien conocido el papel que juega el LPS en la activación celular, así como también las rutas de señalización que sigue para inducir la expresión de citocinas, por ello se usó esta endotoxina como control positivo.

Normalmente la célula cuenta con concentraciones basales de citocinas, que son necesarias en los diversos procesos biológicos de cada célula; por ello se toma como control negativo o basal a la célula en reposo. Cuando la célula en reposo detecta al LPS inicia una serie de procesos biológicos para eliminar al agente extraño, todos estos procesos en conjunto conforman el fenómeno inflamatorio. En dicho fenómeno se lleva a cabo la síntesis, entre otras cosas de IL-8, la citocina pro-inflamatoria por excelencia.

En este trabajo se determinó, mediante el estímulo celular con dos moléculas (LPS y FILM), el efecto sobre la expresión de IL-8. Se encontró que las células en reposo muestran un nivel basal, mientras que las células estimuladas con LPS sobre-expresan IL-8, tanto en el transcrito como en la proteína. El FILM aumentó el transcrito de IL-8 pero no de la proteína, en células activadas por LPS el FILM abate el transcrito y aumenta ligeramente la forma proteica de IL-8. Debido al reducido número de muestras ($n=4$) se empleó estadística no paramétrica obteniendo en todos los casos una $p>0.05$, lo que nos indica que los datos no son significativos, pero se puede observar una tendencia.

En las gráficas de transcrito vs proteína, se observa aumento en la cantidad de transcrito, pero esto no se ve reflejado en la concentración de proteína, quizá porque no todo el transcrito es convertido a proteína.

La proteína IL-10 se sintetiza por una retroalimentación, donde la célula al detectar una elevada concentración de citocinas pro-inflamatorias, envía la señal para que se inicie la producción de

citocinas antiinflamatorias, otra vía es la activación directa a través de NF κ B y MyD88. En esta citocina podemos observar una tendencia donde el FILM *per se*, aumenta el transcrito pero no la proteína, mientras que la expresión inducida por LPS, es abatida sólo a nivel de transcrito.

Un punto importante es el tiempo de activación, pues cuando se habla de procesos biológicos celulares se deben considerar intervalos de segundos o minutos, no horas. En este trabajo se estimularon las células durante 24 hrs, por lo que es posible que los resultados obtenidos sean el resultado de varios ciclos de respuesta celular y no el resultado de un estímulo directo de FILM o LPS. Los oleajes celulares mantienen el equilibrio fisiológico de una célula ante un estímulo. Un ejemplo de esto es la respuesta de MyD88. (Tesis de doctorado Biol. Domínguez A.)

MyD88 es una proteína acopladora que se localiza homogéneamente en el citoplasma celular, cuando hay un estímulo por LPS se forma el complejo LPS-TLR4-CD14-MD-2 el cual recluta a MyD88 hacia la membrana interna de la célula formando “donas”. Estas donas indican el inicio de la señalización vía NF κ B y MAP kinasas MyD88 dependiente.

En este proyecto se tomó la decisión de estimular durante 24 hrs debido a un experimento piloto en la línea celular U937 estimuladas con FILM. Ahí se encontraron cambios en la distribución de MyD88. La extrapolación en células diferenciadas (mononucleares de sangre periférica) pretendía validar dicha observación. El análisis de los resultados aquí presentados no sugiere efecto del FILM sobre la translocación de MyD88 en células inmunocompetentes.

Conclusions

Las conclusiones que se pueden obtener de los resultados experimentales presentados en este trabajo son las siguientes:

1. A nivel de transcrito el FILM *per se* no tiene efecto estadísticamente significativo ($p=0.068$) sobre las citocinas IL-8 e IL-10. Sin embargo, debido al valor de p es posible que al aumentar el número de muestras se haga significativo.
2. El FILM no afecta significativamente la expresión inducida por LPS de IL-8, pero sí la de IL-10, a nivel de transcrito.
3. A nivel de proteína el FILM no induce cambio alguno en las citocinas IL-8 e IL-10 ni por sí mismo ni en la célula activada por LPS.
4. Es posible que los resultados obtenidos en las citocinas IL-8 e IL-10 sean producto de posteriores “oleajes” en la célula dado el largo periodo de estímulo.
5. A las 24 hrs posteriores al estímulo el FILM no tiene efecto sobre el reclutamiento membranal de MyD88.

Anexos

1. Separación de mononucleares de sangre periférica por el método de Ficoll-Hypaque

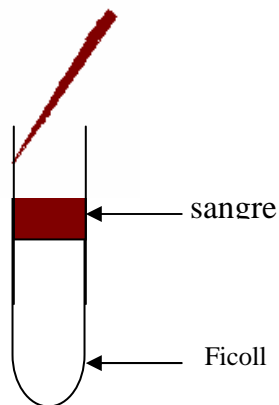
Material

Ficoll-Hypaque®Amersham

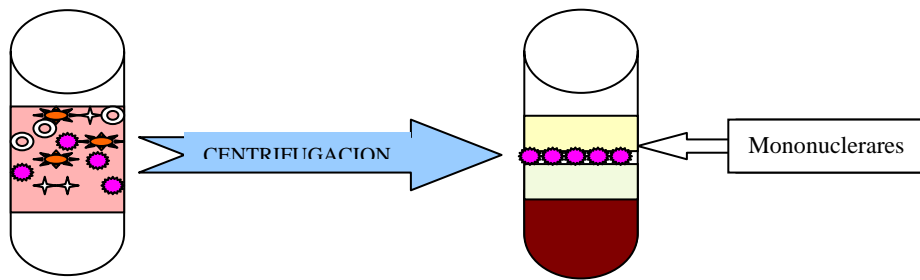
RPMI-1640®Invitrogen

Técnica

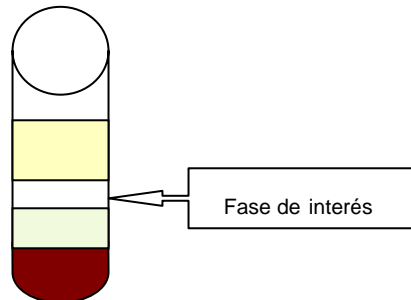
1. Trabajar en Campana de flujo Laminar
2. En cada tubo se colocan 3 mL de Ficoll-Hypaque (no es necesario que las cantidades sean exactas)
3. La sangre heparinizada se diluye en proporción 1:2 con PBS.
4. Al tubo que contiene Ficoll se le adiciona la cantidad suficiente de la dilución anterior hasta llegar a un volumen de 12 mL. para colocar la sangre en el Ficoll se deberá hacer con pipeta Pasteur y bulbo, teniendo cuidado que no se rompa el gradiente (abajo Ficoll y arriba sangre), se deberá escurrir lentamente la sangre por las paredes del tubo.



5. Se tapan los tubos con cuidado de no romper el gradiente.
6. Centrifugar a 2000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente con inicio y finalizado lento



7. Se formará un gradiente triple, del cual con la ayuda de una pipeta Pasteur se aspira la capa de color blanquecina



8. Se pasa el contenido de dicha capa a un tubo nuevo y se afora con PBS a 12 mL
9. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente
10. Se forma un botón de color blanco (se pueden presentar puntos rojo, estos son glóbulos rojos).
11. Se retira todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur e inclinando el tubo (si son varios tubos se puede juntar su contenido en este punto)
12. Se ajusta con PBS a 12 mL.
13. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente
14. Se forma otra vez el botón, lavarlo 2 veces más con PBS.
15. Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón en 2 mL de medio RPMI 1640
16. Se cuentan las células con la técnica de azul tripano utilizando una dilución 1:10

Conteo

Los mononucleares presentes se cuentan en 4 ó 2 cuadrados grandes opuestos (L) del retículo, y se aplica la fórmula

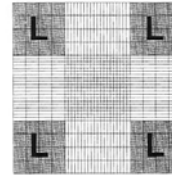
$$RL = L \times Dil \times 10,000$$

donde

L = número de células contadas

Dil = dilución con la que se trabajan las células

10,000 = volumen total de la cámara



Se hacen los cálculos pertinentes y se toma un volumen de suspensión celular para que en cada tubo queden 1×10^6 células

2. Extracción de RNA por el método de TRIZOL

Material

Trizol® Invitrogen

Cloroformo (Sigma Aldrich)

Alcohol Isoamílico (Sigma Aldrich)

Isopropanol (Sigma Aldrich)

Etanol (Sigma Aldrich)

Para recuperar el sobrenadante se deben tener listo, jeringas de 5 ml así como tubos etiquetados para guardar las muestras.

Método:

1. A un paquete celular de 2 millones de células adicionar 1mL de trizol.
2. Homogenizar con una punta de pipeta y después pasar 2 veces y suavemente a través de una jeringa de insulina.
3. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
4. Adicionar 0.2 mL de cloroformo al 100 %. AGITAR VIGOROSAMENTE durante 2 min y centrifugar 15min a 12,000 rpm a 4°C.
5. Recuperar la fase acuosa, mezclar con un volumen de 500 μ L de cloroformo: isoamílico 24:1 y agitar.
6. Centrifugar por 15min a 12,000 rpm. a 4°C.
7. Recuperar la fase acuosa.
8. Mezclar por inversión con 500 μ L de isopropanol al 100% frío
9. Incubar 30 min a -20°C.
10. Centrifugar 15 min a 12,000 rpm a 4°C, quitar con jeringa la mayor cantidad posible de isopropanol.

11. Lavar la pastilla con 500mL de etanol frío al 75%.
12. Agitar en vórtex y centrifugar a 9500 rpm/ 4°C /10 min.
13. Quitar el etanol con jeringa.
14. Esperar a que se evapore el exceso de alcohol; cuando esta seco el RNA puede ser que no se observe en el tubo.
15. Hidratar con 30 μ L de agua DEPC estéril.
16. Guardar a -70°C .

3. PCR Tiempo Real

El sistema de PCR tiempo real está basado en la detección y cuantificación de la fluorescencia emitida por sondas marcadas con un fluorocromo. Dicha fluorescencia es directamente proporcional a los amplicones que se producen en la reacción.

Material

HPRT (Applied Biosystems)

Gen problema (IL-8 o IL-10) (Applied Biosystems)

Master Mix (Applied Biosystems)

Agua DEPC 0.1% (Sigma-Aldrich)

Método

1. Se descongelan lentamente sumergidos en hielo el HPRT y el gen problema (IL-8 o IL-10).
2. Se lleva a cabo la mezcla de reacción, para un volumen final de 30 μL , como se indica a continuación:

X 3 (triplicado)

HPRT	1.5 μL	4.5 μL
IL-8 o IL-10	1.5 μL	4.5 μL
Master Mix	15.0 μL	45.0 μL
H ₂ O DEPC	6.0 μL	18.0 μL
Muestra	6.0 μL	18.0 μL
	<hr/>	<hr/>
	30 μL	90.0 μL

3. El volumen se multiplica por tres (reacción por triplicado).
4. Se carga la placa de 96 pozos con la mezcla de reacción, con 30 μL cada pozo, cubrir de la luz
5. Leer la placa en el lector Applied Biosystems 7000

4. Citocentrifugados

Material

p-formaldehído (Sigma-Aldrich)

RPMI® Invitrogen

SBF (Gibco)

1. Contar las células y ajustar el número a 30 000/100 μ L
2. Resuspender las células en medio RPMI suplementado con SBF al 20%
3. Preparar las cámaras de la citocentrífuga con el papel filtro y el porta objetos
4. Con la micropipeta adicionar a cada cámara 100 μ L de la suspensión celular
5. Centrifugar a 600 rpm durante 2 minutos
6. Sacar de la cámara y dejar secar a temperatura ambiente
7. Fijar con paraformaldehído al 4% en PBS 1X en frasco de coplin durante 8 minutos
8. Lavar 4-5 veces por inmersión en un frasco de Coplin que contenga TBS pH 7.4
9. Si no se usaran los portas al momento, dejar secar, envolver con papel aluminio y congelar a -20°C hasta su empleo.

5. Microscopía Confocal

La microscopía confocal es una técnica que hace cortes ópticos y que permite que sólo se observe el plano que está situado en el punto de foco del sistema óptico, eliminando con un diafragma, la luz proveniente de planos que están fuera de foco.

Material

Rabbit anti-MyD88 polyclonal antibody (CHEMICON INTERNATIONAL)

Bodipy® FL goat anti-rabbit IgG (H + L) (Molecular Probes)

Método

1. Las laminillas fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS se lavan 5 veces por inmersión en frascos Coplin con TBS pH 7.4,
2. Se bloquea con suero humano al 3% en TBS pH 7.4, durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda
3. Se lava 5 veces por inmersión en frascos de Coplin con TBS pH 7.4,
4. Se incuban las laminillas a 4°C toda la noche con anticuerpo policlonal de conejo anti-humano 1:20 (50µg/mL) en TBS
5. Se lava 5 veces por inmersión en frascos de Coplin con TBS pH 7.4
6. Se incuban las laminillas durante 2 hrs a temperatura ambiente con anticuerpo secundario (bodipy FL) de cabra anti-conejo 1:50 (20ug/mL) en TBS, y se protegen de la luz
7. Se lava 5 veces por inmersión en frascos de Coplin con TBS pH 7.4
8. Se montan las laminillas adicionando 12 µL de agente anti-aclarador (n-propilgalato) 0.4% en glicerol/TBS 3:1
9. Se observan en un microscopio confocal

6. ELISAS

IL-8

Material

Kit de ELISA para IL-8 (R&D Systems)

Método

1. Diluir el anticuerpo de captura a la concentración especificada en el inserto. Llenar cada pozo de la placa con 100 μ L y cubrir e incubar la placa toda la noche a temperatura ambiente
2. Una vez transcurrido el tiempo requerido desechar el anticuerpo de la placa y lavar con 400 μ L de buffer de lavado, repetir el proceso tres veces más. Quitar por completo el líquido de cada pozo por aspiración o por inversión de la placa sobre papel absorbente
3. Bloquear la placa adicionando 300 μ L de buffer de bloqueo a cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por 1.5 hrs.
4. Una vez transcurrido el tiempo requerido desechar el anticuerpo de la placa y lavar con 400 μ L de buffer de lavado, repetir el proceso tres veces más. Quitar por completo el líquido de cada pozo por aspiración o por inversión de la placa sobre papel absorbente
5. Adicionar 100 μ L de muestra o estándar a cada pozo. Cubrir la placa e incubar 2 hrs a temperatura ambiente
6. Una vez transcurrido el tiempo requerido desechar el anticuerpo de la placa y lavar con 400 μ L de buffer de lavado, repetir el proceso tres veces más. Quitar por completo el líquido de cada pozo por aspiración o por inversión de la placa sobre papel absorbente

7. Adicionar 100 μL del anticuerpo de detección a cada pozo. Cubrir la placa e incubar 2 hrs a temperatura ambiente
8. Una vez transcurrido el tiempo requerido desechar el anticuerpo de la placa y lavar con 400 μL de buffer de lavado, repetir el proceso tres veces más. Quitar por completo el líquido de cada pozo por aspiración o por inversión de la placa sobre papel absorbente
9. Adicionar 100 μL de estreptoavidina-peroxidasa a cada pozo. Cubrir de la luz e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente
10. Una vez transcurrido el tiempo requerido desechar el anticuerpo de la placa y lavar con 400 μL de buffer de lavado, repetir el proceso tres veces más. Quitar por completo el líquido de cada pozo por aspiración o por inversión de la placa sobre papel absorbente
11. Adicionar 100 μL de sustrato a cada pozo. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente cubierto de la luz
12. Adicionar 50 μL de solución de paro (H_2SO_4 2N), agitar suavemente la placa para mezclar
13. Determinar la densidad óptica (D.O.) inmediatamente a 450 nm

IL-10

Material

Kit de ELISA para IL-10 (Biosource)

Método

1. Preparar los reactivos como se marca en el inserto
2. Adicionar 50 μ L de buffer diluyente del estándar al pozo que servirá de blanco
3. Adicionar 50 μ L de muestra, estándar o blanco
4. Adicionar 50 μ L de buffer de incubación a los pozos que contengan muestra o estándar
5. Cubrir de la luz e incubar 2 hrs a temperatura ambiente
6. Decantar la solución de la placa. Lavar cuatro veces con el buffer de lavado
7. Adicionar 100 μ L de solución biotinilada anti-IL-10 a cada pozo
8. Cubrir la placa de la luz e incubar 2 hrs a temperatura ambiente
9. Decantar la solución de la placa. Lavar cuatro veces con el buffer de lavado
10. Adicionar 100 μ L estreptoavidina-peroxidasa a cada pozo
11. Cubrir la placa de la luz e incubar 30 minutos a temperatura ambiente
12. Decantar la solución de la placa. Lavar cuatro veces con el buffer de lavado
13. Adicionar 100 μ L de cromógeno estabilizador a cada pozo. El líquido en los pozos se tornará azul
14. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
15. Adicionar 100 μ L de la solución de paro a cada pozo, agitar suavemente para mezclar
16. Determinar la D.O de cada pozo a 450 nm

Abreviaturas

AHA	Absceso hepático amibiano
ASK	Cinasas reguladoras de la señal de apoptosis
DNCB	Dinitroclorobenceno
EBP	Proteína básica eosinófila
ECSIT	Señal intermedia conservada evolutivamente
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EPO	Peroxidasa del eosinófilo
FILM	Factor inhibidor de la locomoción de monocitos
GPI	Glicofosfatidilinositol
HSP	Proteína de shock térmico
IFN	Interferón
IKK	Cinasas de I κ B
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor de Interleucina 1
IL-1Ra	Receptor antagonista de IL-1
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina
IRF-3	Factor 3 regulador de interferón
ISRE	Elemento sensible a interferón
JNK	Cinasa jun N-terminal
LBP	Proteína de unión a lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
Mal	Proteína adaptadora de MyD88
MAPK	Cinasa activada por mitógenos
MAPKAR-K	Protein-cinasa activada por MAPK
MBL	Lectina de unión a mananos
MBP	Proteína básica principal

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-1^a	Proteína inflamatoria de macrófagos
MLK	Linaje de la mezcla de protein-quinasas
MSK-1	Protein-quinasas activadas por estrés y mitógenos
MyD88	Factor 88 de Diferenciación Mieloide
NEMO	Modificador esencial de NF- κ B
NF-Kb	Factor nuclear- κ B
NK	Asesinas naturales
PMN	Polimorfonucleares
PRAK	Cinasa activada/regulada por p38
PRR	Reconocimiento de patrones
RSV	Virus sincisial respiratorio
TAK	Cinasa activada por TGF- β
TBK	Proteína unida a TANK
TICAM-2	Molécula adaptadora que contiene a TIR
TIR	Toll/ receptor de Interleucina
TIRP	Proteína que contiene el dominio TIR
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF	Factor 6 Asociado al Receptor de Necrosis Tumoral
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	Adaptadora que contiene el dominio TIR e induce interferón- β

Referencias

1. WHO. The world health report 1995-bridging the gaps. World Health Forum 1995; 16:377-385.
2. Kretschmer RR. Amibiasis: infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. México: Editorial Trillas, 1994.
3. Sepúlveda B, Martínez-Palomo A. In immunology of parasitic diseases, eds. Cohen S, Warren KS. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982:170-191.
4. Perez-Tamayo R. In amebiasis, Ed. Martínez-Palomo. Amsterdam: Elsevier, 1986:45-94.
5. Kretschmer RR, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López-Ozuna M, Lecuona M, Castro E.M, & Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol 1985;7: 527-43.
6. Kretschmer RR, Rico G & Giménez-Scherer JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 2001; 112:201-209.
7. Giménez-Scherer JA, Pacheco-Cano MG, Cruz de Kavin E, Hernández-Jáuregui P, Merchant MT & Kretschmer RR. Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Laboratory Invest 1987; 57:45-51.
8. Rico G, Kretschmer RR. The Monocyte Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) Produced by Axenically Grown *Entamoeba histolytica* Fails to Affect the Locomotion and the Respiratory Burst of Human Eosinophils *In Vitro*. Archives of Medical Research 1997; 28:233-234.
9. Giménez-Scherer JA, Rico G, Fernandez J, Kretschmer RR. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNCB in guinea pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. Arch of Med Res 1997; 28:237-238.
10. Giménez-Scherer JA, Arenas E, Diaz L, Rico G, Fernandez J, Kretschmer RR. Effect of monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica* on the expression of cell adhesion molecules (CAMs) in the skin of guinea pigs. Arch of Med Res 2000; 31:S92-S93.
11. Utrera-Barillas D, Velázquez JR, Enciso A, Muñoz-Cruz S, Rico G, Curiel-Quesada E, Terán LM, Kretschmer RR. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines Parasite Immunol 2003; 25:475-482.
12. Parslow TG, Stites D, Terr AI, Imboden JB. Inmunología Básica y Clínica. México: Editorial El Manual Moderno, 2002:23-46.
13. Marni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1996:88-111.

14. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines. Switzerland: Advances in immunology, 1994: vol. 55:97-179.
15. Luster AD, Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998; 338: 436-445.
16. Kashimoto T, et al. Interleukins: Molecular biology and immunology. Chem Immunol Basel Karger 1992; 51:236-265.
17. Modi WD, Dean M, Sevanez HN y col. Monocyte-derivate neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gen cluster along with several other members of the platelet factor 4 gen seperfamily. Human Genet 1990; 84:185-187.
18. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Ann Rev Immunol 2001; 19:683-765.
19. Jenkins JK, Malyak M, Aren WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. Lymphokines Cytokine Res. 1994; 13: 47-54.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología Celular y Molecular. España: Editorial McGraw-Hill Interamericana: 2002
21. Wesley JA, Good RA. Principios de inmunología clínica. España Ed. Reverté S.A: 1980
22. Bellanti JA. Inmunología. 3ª edición. México D.F: Editorial. Interamericana, 1986: 22-28.
23. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. Annu Rev Immunol 1995; 13:437-457.
24. Singh BP, Chauhan RS, Singhal LK. Toll-like receptors and their role in innate immunity. Current Science 2003; 85:1156-1164.
25. Bilak H, Tauszing-Delamasure S, Imler JL. Toll and Toll-like receptors in Drosophila. Biochemical Society Transactions 2003; 31:648-651.
26. Lamaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette Spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 1996; 86:973-983.
27. Luo C, Sheng B, Manlay JL. Tehao functions in the Toll pathway in Drosophila *melanogaster*. Possible roles in development and innate immunity. Insect Mol Biol 2001; 10:457-461.
28. Medzhitov R, Preston-Hulburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptative immunity. Nature 1997; 388: 394-397.
29. Kanzok SM, Hoa NT, Bonizzoni M, Luna C, Huang Y, Malacrida AR, Zheng L. Origin of Toll-Like Receptor-Mediated Innate Immunity. J Mol Evol 2004; 58:442-448

30. Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biology* 2002; 3:3011.1-3011.6.
31. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-Like Receptors in Human Monocytes and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 249-255.
32. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity, *Nature Reviews Immunology* 2001; 1:135-145.
33. Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of pro-inflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 2001; 6:1106-1112.
34. Boch JA, Yoshida Y, Koyama Y, Wara-Aswapati N, Peng H, Unlu S, Auron PE. Characterization of a cascade of protein interactions initiated at the IL-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303:525-531.
35. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998; 9:143-150.
36. Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Molecular Immunology* 2004; 40:861-868.
37. Andreakos A, Sacre SM, Smith C, Lumberg A, Kiriakidis S, Stonehouse T, Monaco C, Feldmann M, Foxwell M. Distinct pathways of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* 2004; 6:2229-2237.
38. Caamaño J, Hunter CA. NF- κ B family of transcription factors: Central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical Microb Rev* 2002; 3:414-429.
39. Schuman RR, Leong SR, Flaggs GW y col. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429-1431.
40. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782.
41. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda M, Kimoto M, Miyake K. Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3471-3475.
42. Latz E, Visintin S, Lien E y col Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the golgi apparatus with the Toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277:47834-47843.

43. Lord KA, Abdolahi A, Hoffman-Liebermann B, Lieberman DA. *Cell Growth Differ* 1990; 1:637-645.
44. Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, Sims JE. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Letters* 1997; 402:81-84.
45. Muzio MN, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997; 278:1612-1615.
46. Hardiman G, Rock FL, Balasubramanian S, Kastelein RA, Bazan JF. Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogen* 1996; 13:2467-2475.
47. Wesche H, Henzel WH, Shillington W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7:837-847.
48. Jaunin F, Burns K, Tshopp J, Martin TE, Fakan S. Ultrastructural Distribution of the Death-Containing MyD88 Protein in HeLa Cells. *Experimental Cell Res.* 1998; 243:67-75.
49. Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *TRENDS in Immunol* 2001; 22:78-83.
50. Medzhitov R, Preston-Hulbert P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway Jr CA. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molec Cell* 1998; 2:253-258.
51. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11:115-122.
52. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000; 12:113-117.
53. Fitzgerald DA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG y col. Mal (MyD88-adaptor-like). is required for Toll Like-like receptor 4 signal transduction. *Nature* 2001; 413:78-83.
54. Horn T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2:835-841.
55. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4:161-167.
56. Horn T, Barton GM, Flavell R, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420: 329-
57. Pålsson McDermott EM, O'Neill LJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunol* 2004; 113:153-162.

58. Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The humantoll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998;187:2097-2101.
59. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK-1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999; 398: 252-256.
60. Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, Xiao C, Douglas I, Janeway CA, Ghosh S. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 1999; 13: 2059-2071
61. Ghosh S, May SJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel Proteins: evolutionarily conserved mediators of immune response. *Annual Rev Immunol* 1998; 16:225-259.
62. Fineo TS, Baldwin AS. Mechanistic aspects of NF- κ B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* 1995; 3:263-272.
63. Delhase M, Hayadawa M, Chen Y y col. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 1999; 284:309-313.
64. Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck M, Ellisman RJ, Karin M. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science* 1999; 284:316-320.
65. May JM, D'Acquisto F, Madge LA, Glöckner J, Pober JS, Ghosh S. Selective Inhibition of NF- κ B Activation by a Peptide That Blocks the Interaction of NEMO with the I κ B Kinase Complex. *Science* 2000; 289:1550-1554.
66. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 1996; 15: 2760-2770.
67. Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H y col. TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 8141-8144.
68. Salmerón A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP, Ley SC. Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J* 1996; 15: 817-826.
69. Tanaka S, Hanafusa H. Guanine-nucleotide exchange protein C3G activates JNK1 by a Ras-independent mechanism JNK1 activation inhibited by kinase negative forms of MLK3 and DLK mixed lineage kinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 1281-1284.
70. Tibbles LA, Ing YL, Kiefer F, Iscove N, Woodgett, JR, Lassam N. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3. *EMBO J* 1996; 15: 7026-7035.

71. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 1996; 87: 565-576.
72. Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 1999; 13: 1297-1308.
73. Takaeshu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 2000; 5: 649-658.
74. Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* 1998; 8: 1387-1390.
75. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Am Physiol Soc Rev* 2001; 81: 807-869.
76. Huot J, Houle F, Marceu F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein p27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 1997; 80: 383-392.
77. Waskiewicz AJ, Johnson JC, Penn B, Mahalingam M, Kimball SR, Cooper JA. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol. Cell Biol* 1999; 19: 1871-1880.
78. Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. Poly (dI x dC)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NF- κ B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB-2-PKR. *J Biol Chem* 2003; 278:16713-16719.
79. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002; 420:324-329.
80. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TICAM-2: a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- β . *J Biol Chem* 2003; 278:49751-49762.
81. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301:640-643.

82. Bin LH, Xu LG, Shu HB. TIRP a novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signalling. *J Biol Chem* 2003; 278:24526-24532.
83. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ y col. LPS-TLR4 signalling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the Toll adpaters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003; 198:1043-1055.
84. Sato S, Fujiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor inducing IFN- β .(TRIF) associate with TNF-receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase-1 and activates two distinct transcription factors NF- κ B and IFN-regulatory factor-3 in Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003. 4:491-496.
85. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKK ϵ y TBK-1 are essential components of the IRF-3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:491-496.
86. Wietek C, Miggin SM, Jefferies CA, O'Neill LA. Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR)-4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF- κ B. *J Biol Chem* 2003; 278:50923-50931.
87. Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cell. *J Immunol* 2001; 166:5688-5694.
88. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor-3 and the expression of a subsets of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167:5887-5894.