



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

**Análisis del papel de TREM-1 y Hsp70 en
la respuesta inflamatoria, en estudios *in-
vivo e in-vitro*.**

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Biomédicas que presenta:

Eduardo Ferat Osorio.

▪

México D.F. 2010



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.

| | |
|--|----|
| 1. Financiamiento..... | 1 |
| Agradecimientos..... | 2 |
| 2. Sinodales..... | 4 |
| 3. Abreviaturas..... | 5 |
| 4. Resúmenes | |
| 4.1 Español..... | 9 |
| 4.2 Inglés..... | 11 |
| 5. Introducción..... | 13 |
| a. Generalidades de la Respuesta Inflamatoria..... | 13 |
| b. Generalización de la inflamación: | |
| El Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica..... | 14 |
| c. El SIRS más infección = Sepsis..... | 15 |
| d. Mecanismos moleculares del SIRS y la Sepsis..... | 18 |
| e. Regulación de la Respuesta Inflamatoria..... | 25 |
| f. Dos nuevas moléculas involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria..... | 28 |
| g. Papel de las nuevas moléculas..... | 35 |
| 6. Planteamiento del Problema..... | 36 |
| 7. Hipótesis..... | 38 |
| 8. Objetivos..... | 38 |
| 9. Material y Métodos..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 9.1 Primera Sección. | |
| Análisis de la expresión de TREM-1 en pacientes sépticos, quirúrgicos y con pancreatitis aguda..... | 41 |
| 9.2 Segunda Sección. | |
| Evaluación de la expresión de TREM-1 en células CD14 humanas tratadas con LPS y/o Hsp70..... | 43 |
| 9.3 Tercera Sección. | |
| Papel de Hsp70 en la regulación de la respuestan inflamatoria. | |
| 10.Resultados..... | 49 |
| 10.1 Primera sección. | |
| Análisis de la expresión de TREM-1 en pacientes sépticos, quirúrgicos y con pancreatitis aguda | 49 |
| Resumen manuscrito publicado. | 49 |
| Revista: <i>Jorunal of Surgical Research</i> : | |
| Título: El incremento en la expresión de TREM-1 en monocitos se asocia con procesos inflamatorios infecciosos y no infecciosos. | |
| <i>Title: The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes.</i> | |
| Resumen manuscrito publicado..... | 51 |
| Revista: <i>Critical Care</i> : | |
| Título: La expresión de TREM-1 en monocitos se asocia con inflamación pero no con infección en | |

la pancreatitis aguda

*Title: Triggering receptor expressed on myeloid cells-1
expression on monocytes is associated with inflammation
but not with infection in acute pancreatitis.*

| | | |
|------|--|----|
| 10.2 | Segunda Sección. | |
| | Evaluación de la expresión de TREM-1 en células CD14+ humanas tratadas con LPS y/o Hsp70..... | 53 |
| 10.3 | Tercera Sección. Papel de Hsp70 en la regulación de la respuesta inflamatori..... | 55 |
| 11. | Discusión..... | 65 |
| | TREM-1 | 65 |
| | TREM-1 y Hsp70 | 74 |
| | Hsp70 | 76 |
| 12. | Conclusiones..... | 83 |
| 13. | Bibliografía..... | 86 |

Índice de Figuras y Tablas

| | |
|---|----|
| Figura 1. Signos cardinales de la Inflamación..... | 14 |
| Figura 2. Esquema general de acontecimientos clínicos en la respuesta inflamatoria..... | 17 |
| Figura 3. Representación esquemática de Receptores de Reconocimiento de Patrones del tipo de los TLR..... | 21 |
| Figura 4. Esquematización de la cascada de señalización intracelular activada por MAMP a partir de TLR | 23 |
| Figura 5. Mediadores Inflamatorios derivados del ácido araquidónico..... | 26 |
| Figura 6. El reflejo inflamatorio..... | 27 |
| Figura 7. Mecanismo de acción propuesto para TREM-1..... | 7 |
| Figura 8. Descripción de las acciones de Hsp70 a nivel intracelular como chaperona..... | 8 |
| Figura 9. Mecanismo de Hsp70 para la protección celular..... | 34 |
| Figura 10. Hsp70 no modifica la expresión de TREM1 en | |

| | |
|--|----|
| células CD14+ humanas..... | 54 |
| Figura 11. La estimulación de monocitos humanos con Hsp70 | |
| no induce la producción de TNF- α | 58 |
| Figura 12. Hsp70 disminuye la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 | |
| por monocitos humanos estimulados por ligandos de TLR.. | 60 |
| Figura 13. El efecto inmunomodulador de Hsp70 sobre monocitos | |
| se observa aún cuando el tratamiento con la proteína se | |
| hace en momentos diferentes al ligando de TLR | 62 |
| Figura 14. La disminución en la producción de TNF- α inducida | |
| por LPS se correlaciona con la disminución del | |
| RNAm de TNF- α | 64 |
| Figura 15. Mecanismo propuesto para la regulación de la respuesta | |
| inflamatoria en el contexto de TNF- α | 82 |
| Tabla 1. Concentraciones y tiempo de estimulación con LPS y | |
| Hsp70..... | 44 |

1. Financiamiento.

El presente estudio fue desarrollado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicanos del Seguro Social (IMSS), y se financió a través de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, con el proyecto registrado con el número: IMSS-2004/045; y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con el proyecto registrado con el número: SALUD 2005-01-13942.

Durante el presente postgrado recibí apoyo económico de la beca de excelencia académica del CONACyT, a través de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Durante el año de elaboración de la tesis (2009), recibí apoyo financiero por parte del Sistema Nacional de Investigadores (SIN), por haber ingresado como candidato a Nivel I.

Agradecimientos:

A la Facultad de Medicina (FM) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”, del Centro Médico Nacional Siglo XXI (HE CMN SXXI), del IMSS.

A la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del HE CMN SXXI IMSS.

Al Servicio de Gastrocirugía del HE CMN SXXI IMSS.

Al Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Dr. Gustavo Pedraza Alva.

Al laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad, del Departamento de Medicina Experimental de la FM del la UNAM, en especial a Guillermo Robles Díaz por sus consejos, apoyo y amistad.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición, Dr. Salvador Zubirán y al Hospital General de México, de donde parte de los pacientes que se incluyeron en este trabajo procedieron.

A los sinodales que revisaron mi tesis, ellos aportaron valiosos comentarios que la mejoraron, pero principalmente me hicieron reflexionar.

A Armando Isibasi, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y darme la oportunidad de colaborar contigo. Por permitirme combinar la investigación con

la clínica, que ha sido mi objetivo desde el principio. Pero en especial agradezco tu comprensión, el apoyo y la amistad que Thérèse y tú me han brindado.

A Isabel y a Constantino, por mostrarme que en la UIMIQ, además de trabajo bien hecho, se hacen buenos amigos.

A todos mis compañeros de la UIMIQ, pasados y presentes, que me facilitaron el camino y me enseñaron el trabajo de laboratorio. En especial a Rodolfo Pastelín y Elizabeth Acosta.

Al Dr. Roberto Blanco, mi jefe de Servicio de Gastrocirugía, por permitirme seguir creciendo profesionalmente.

A Yvonne Rosenstein y Gladis Fragoso, por su apoyo incondicional, confianza, aportaciones científicas y, sobre todo, su paciencia.

A Lourdes Arriaga, Laura Bonifaz y Gabriela Rosas, tres queridas personas que me impulsaron con buenas ideas, ánimo y amistad.

A Germán, Patricio, Rubén, Francisco, Pablo y Martín.

A Beatriz, Georgie y Javier, porque a su discreta manera, siempre están conmigo.

A Lalo, porque de forma involuntaria ha sacrificando parte de su tiempo y me permitió cumplir un acuerdo que hice, hace más de 25 años, con su Abu del cielo, a quien dedico esta tesis.

A Mimi, la mujer de mi vida, que caminó estos años junto a mí, haciendo de este trabajo, nuestro trabajo.

2. Sinodales:

Presidente.

Dra. Carmen Gómez Eichelmann

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología.

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México.

Secretario.

Dr. Armando Isibasi Araujo

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica

Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda Gutiérrez”

Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Vocal

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Departamento de Inmunología.

Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Vocal

Dr. Edgar Zenteno Galindo

Jefe del Departamento de Bioquímica.

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.

Vocal

Dr. Armando Palacio Tovar

Jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición

Dirección de Nutrición

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Dr. Salvador Zubirán.

Abreviaturas.

MAMP: *Microorganisms-Associated Molecular Pattern.*

PRR: *Pattern Recognition Receptors.*

PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern.*

GMPc: GMPcíclico.

AMPc: AMPcíclico.

ICAM-1: *intercellular adhesion molecule 1.*

VCAM1: *vascular cell adhesion molecule 1.*

PS: *phosphatidylserine.*

TNF- α : Factor de Necrosis tumoral alfa.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

IL-6: Interleucina 6.

TGF- β : Factor de crecimiento de transformación beta.

IL-10: Interleucina 10.

IL-8: Interleucina 8.

MIP1 α : *macrophage inflammatory protein 1 α .*

MCP1: *monocyte chemotactic protein 1.*

SIRS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (por sus siglas en inglés, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*).

PGE2: Prostaglandina E2.

LPS: Lipopolisacárido.

TLR: *Toll-Like Receptor.*

RNA: Acido ribonucleico.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

CpG: Citocinas enlazadas a guaninas por fosfatos.

IL-1R: Receptor de Interleucina-1.

MAPK: *mitogen-activated protein kinase.*

MyD88: *Myeloid differentiation factor 88.*

TIR: *Toll-interleukin-1 receptor.*

TIRAP: *Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein.*

INF- β : Interferon beta.

TRIF: *TIR domain-containing adapter inducing interferon.*

TRAM: *TRIF-related adaptor molecule.*

IRAK4: *IL-1R-associated kinase4.*

IRAK1: *IL-1R-associated kinase1.*

TRAF6: *Tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6.*

TAK1: *Transforming-growth-factor- β -activated kinase.*

TAB1: *TAK1-binding protein 1.*

TAB2: *TAK1-binding protein 2.*

UBC13: *ubiquitin-conjugating enzyme 13.*

UEV1A: *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1.*

IKK: *Inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex).*

IKK- α : *Inhibitor of nuclear factor- κ B alfa.*

IKK- β : *Inhibitor of nuclear factor- κ B beta.*

IKK- γ : *Inhibitor of nuclear factor- κ B gamma.*

NF- κ B: *Nuclear Factor kappa B.*

LBP: *Lipopolysaccharide Binding Protein.*

GPI: *glicosilfosfatidilinositol.*

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer.*

Hsp70: *Heat Shock Protein 70.*

Hsp90: *Heat Shock Protein 90.*

CXCR4: *receptor de quimiocinas 4.*

GDF5: *factor de diferenciación del crecimiento 5.*

SIGIRR: *Single immunoglobulin IL-1R-related molecule.*

IRAK-M: *IL-1R-associated kinase-M*.

SOCS-1: *suppressor of cytokine signaling*.

HLA-DR: Antígeno Leucocitario Humano DR.

APC: Antigen Presenting Cell.

TREM-1: *Triggering Receptor Expressed on Myeloid-1 cells*.

CD11b/CD18: Integrina leucocitaria CD11b/CD18.

CD40: Receptor co-estimulador (*Cluster of Differentiation 40*).

CD86: Ligando de CD28 y de CTLA4 (*Cluster of Differentiation 86*).

E coli: *Escherichia coli*.

Fc: Fracción cristalizable de una inmunoglobulina.

DAP12: *DNA X-activating protein of 12 kD*.

NK: *Natural killer cell*.

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*.

Syk: *protein-tyrosine kinase*.

sTREM-1: soluble *Triggering Receptor Expressed on Myeloid-1 cells*.

MHCII: *Major Histocompatibility Complex II*

HMGB1: *High Mobility Group Box1*

HSP: *Heat Shock Proteins*

ATP: Adenosin trifosfato

HSF1: Heat Shock Factor 1

CARS: Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

PE: Phycoerythrin

MFI: Mean Fluorescence Intensity.

CO₂: Bióxido de Carbono

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

ANOVA: Análisis de la varianza

PG: Peptidoglicana

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa).

cDNA: DNA complementario

RPMI: Medio de Cultivo 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)

HEPES: Hidroxietil piperazina

DMSO: Dimetilsulfóxido

PA: Pancreatitis aguda.

RNAm: RNA mensajero.

INF- γ : Interferón gamma.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de Granulocitos-Macrófagos.

LRR: *Leucin Rich Repeat*.

PCR: Proteína C reactiva.

MBL: Lectina unidora de Manosas.

4. Resumen.

4.1. Introducción.

La inflamación es una respuesta del organismo, la mayoría de las veces limitada al sitio de origen; en otras, a través de mediadores inflamatorios, se generaliza y manifiesta como el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS). El SIRS se compensa a través del Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora (CARS). Tanto SIRS como CARS favorecen el desarrollo de complicaciones con elevada morbi-mortalidad. TREM-1 y Hsp70 tienen capacidad para regular la inflamación. TREM-1 es un receptor presente en células mieloides que amplifica la respuesta inflamatoria. Hsp70 es una chaperona que en el medio extracelular induce la producción de citocinas. Aparentemente TREM-1 ayuda a que Hsp70 realice funciones extracelulares. En este trabajo se analiza la expresión de TREM-1 y el papel de Hsp70 en la respuesta inflamatoria a través de TREM-1.

Métodos.

En monocitos de pacientes quirúrgicos, con sepsis y con pancreatitis aguda; se analizó por citometría de flujo la expresión de TREM-1 y la concentración sérica de citocinas por ELISA. Se estudió la expresión de TREM-1 en monocitos estimulados con Hsp70. Se analizó la producción de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10), por ELISA, en sobrenadante de monocitos estimulados con ligandos de TLR, en presencia de Hsp70.

Resultados.

TREM-1 en pacientes con SIRS se incrementó de manera significativa, independientemente de la presencia de infecciones. TREM-1 soluble se incrementó en pacientes con pancreatitis aguda y se asoció con mal pronóstico.

Hsp70 no modificó la expresión de TREM-1 de membrana, ni indujo la producción de citocinas en monocitos. Sin embargo, la estimulación con LPS de monocitos tratados con Hsp70, disminuyó la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10.

Conclusiones.

El incremento de TREM-1 (pacientes quirúrgicos y pancreatitis), se asoció con la respuesta inflamatoria generada por el propio padecimiento, independientemente de la presencia infección.

En pancreatitis se propone a TREM-1 soluble como un biomarcador pronóstico en las primeras etapas de la enfermedad.

Hsp70 no solo reduce la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL6), sino también anti-inflamatorias (IL-10). Quizá una de sus funciones extracelulares sea regular negativamente la inflamación para prevenir mayor daño celular.

4.2 Introduction.

Inflammation is a response of the organism, which most of the times is limited to the initial injury site but is sometimes generalized due to the dissemination of inflammatory mediators; in this case, it is clinically manifested as a Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). SIRS is regulated by the compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS). SIRS and CARS favor the development of complications with high morbi-mortality rates. TREM-1 and Hsp70 are two molecules that can regulate the inflammatory response. TREM-1 is found on the surface of myeloid cells and amplifies the inflammatory response, while Hsp70 is a molecular chaperone and that induces cytokine production. Evidence suggests that TREM-1 aids the extracellular functions of Hsp70. Here we analyzed TREM-1 expression in clinical settings and the capacity of Hsp70 to regulate the inflammatory response initiated through TREM-1.

Methods.

We analyzed TREM-1 expression on monocytes by flow cytometry and serum cytokine concentration by ELISA in surgical, septic and acute pancreatitis patients. We also analyzed TREM-1 expression on Hsp70 treated monocytes. Finally, in an attempt to further understand the role of Hsp70, we evaluated the cytokine production (TNF- α , IL-6 e IL-10) of human monocytes in response to different TLR ligands in the presence of Hsp70.

Results.

TREM-1 expression on monocytes was significantly increased in SIRS patients, regardless of the presence of infection. Soluble TREM-1 was increased in acute pancreatitis patients and was related to poor prognosis.

Hsp70 did not affect the expression levels of TREM-1 or the cytokine production by monocytes. However, when LPS-stimulated monocytes were treated with Hsp70, they produced lower amounts of TNF- α , IL-6 and IL-10.

Conclusions.

The increased TREM-1 expression (in surgical and acute pancreatitis patients) was associated with the inflammatory response secondary to the initial insult, regardless of the presence of infection.

Soluble TREM-1 could be used as a prognostic biomarker in the first hours of acute pancreatitis evolution.

Hsp70 downregulates the production of pro-inflammatory (TNF- α and IL6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines by LPS-stimulated monocytes. This could be another extracellular function of Hsp70, to dampen the inflammatory process and limit cellular damage.

5. Introducción.

a. Generalidades de la Respuesta Inflamatoria.

La inflamación es la respuesta del organismo ante una agresión que implica, entre otras cosas, la activación y reclutamiento de células inflamatorias al sitio afectado con la finalidad de eliminar al agente agresor, reparar el tejido y retornar a la homeostasis. La activación celular se puede dar a través de moléculas endógenas denominadas Alarminas, o bien a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP), conocidos anteriormente como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Las Alarminas y los MAMP son sensados por receptores que reconocen los patrones moleculares presentes en ambos, y que reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos PRR activan diferentes cascadas de señalización intracelular que inducen la transcripción genética y la liberación de múltiples mediadores inflamatorios de la inmunidad innata, llevando a la activación de la parte adaptativa de la inmunidad, a través de células efectoras como los linfocitos T CD4 y T CD8 (Bianchi, 2007; Harris & Raucchi, 2006; Matzinger, 2002).

La mayoría de las veces el reconocimiento de MAMP y/o de Alarminas es un proceso local, clínicamente imperceptible; pero en algunas ocasiones la respuesta inflamatoria se hace evidente y se reconoce por la aparición de los signos y síntomas cardinales de la inflamación: dolor, rubor, calor y tumor (Figura 1). Estos son consecuencia de complejas interacciones moleculares tempranas, que en términos simplistas involucran la producción de múltiples mediadores inflamatorios: a) aminas (histamina, bradicinina, adrenalina, noradrenalina); b)

mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico (eicosanoides del tipo de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos); c) complemento; d) nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc); e) moléculas de adhesión (E-selectinas, P-selectinas, ICAM1, VCAM1); e) citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-10;); f) quimiocinas (IL-8, MIP1 α , MCP1); f) hormonas esteroideas (Glucocorticoides) (Lawrence et al., 2002).

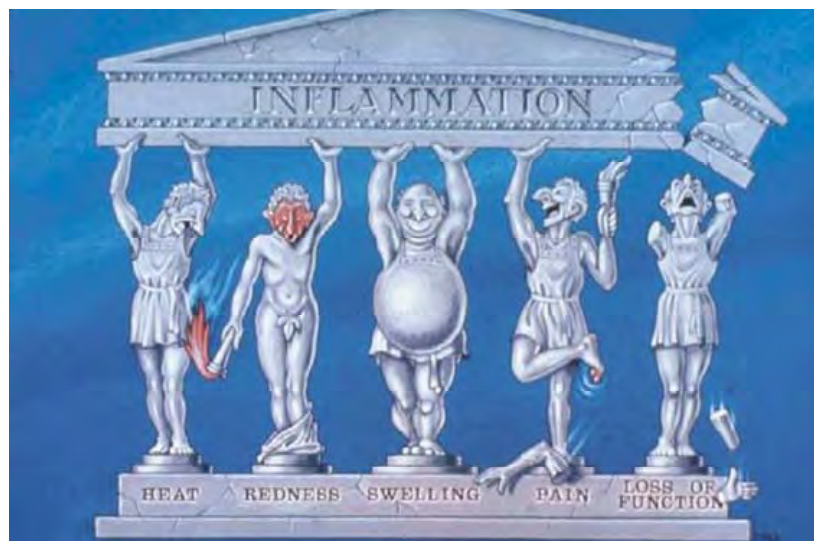


Figura 1. Signos cardinales de la Inflamación. En esta caricatura se representan los signos cardinales de la inflamación -calor, rubor, tumor y dolor- descritos por Aulus Celsus en su tratado De Medicina. Galeno de Pérgamo describió un quinto elemento, la pérdida de la función (*functio laesa*), que se muestra en la extrema derecha de la figura. Dibujo de P. Cull para el St. Bartholomew's Medical College (Lawrence et al., 2002)

b. Generalización de la inflamación: El Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

En ciertas situaciones, estos mediadores inflamatorios al liberarse actúan sobre órganos remotos del lugar donde se originan, lo que favorece el desarrollo

de manifestaciones clínicas que constituyen el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) (Nyström, 1998).

Este término se acuñó hace 17 años en un consenso hecho por el *American College of Chest Physicians* y la *Society of Critical Care Medicine*, para describir un conjunto de manifestaciones clínicas y de laboratorio, como resultado de una respuesta inflamatoria exacerbada que se define por la presencia de dos o más de los siguientes criterios: temperatura mayor de 38°C o menor de 36°C; frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto; frecuencia respiratoria mayor de 20 respiraciones por minuto o una presión parcial de bióxido de carbono ó PaCO₂ menor de 32 torr; leucocitos por arriba de 12,000 células/mm³ ó menor de 4000 células/mm³ ó más de 10% de formas inmaduras (*American College of Chest Physicians* y la *Society of Critical Care Medicine* 1992). El SIRS puede desarrollarse como consecuencia de enfermedades agudas (ej. pancreatitis aguda), o por agresiones al organismo, sean terapéuticas (ej. cirugías mayores, procedimientos invasivos, etc.) o traumáticas (ej. quemaduras, contusiones, etc.), que implican una alteración de la homeostasis. Sin embargo, estos criterios en forma aislada se pueden encontrar en situaciones que no representan un estado necesariamente patológico (Baue, 2006; Bone, 1991; Opal, 1998; Vincent, 1997).

c. El SIRS más infección = Sepsis

Frecuentemente las infecciones por microorganismos patógenos también se manifiestan con la presencia de fiebre, taquicardia, alteraciones de la ventilación y en la cuenta leucocitaria. Al desarrollo del SIRS secundario a infecciones se le conoce como sepsis. Por el hecho de presentar manifestaciones muy parecidas,

muchos pacientes portadores de SIRS se catalogan indebidamente como sépticos, aún sin la comprobación del proceso infeccioso; este es el motivo por el que se acuñó el término de SIRS, por la necesidad de dar un nombre a aquellas condiciones patológicas que no tenían evidencia de infección (sepsis), pero tenían un comportamiento clínico similar. El SIRS es un estado que puede complicarse con otras entidades nosológicas. En un estudio prospectivo de 2527 pacientes con SIRS, se encontró que 26% de ellos desarrollaron sepsis, 18% sepsis severa y 4% choque séptico¹ (Rangel-Frausto et al., 1995). En esta serie, el intervalo entre la aparición del SIRS y el desarrollo de sepsis se correlacionó de manera inversa con el número de criterios de SIRS; y uno de los hallazgos más relevantes del estudio fue el hecho de que en algunos pacientes que parecían cursar con sepsis, sepsis grave o choque séptico, no pudo demostrarse el patógeno a través de cultivos, sin embargo tuvieron una morbi-mortalidad similar a aquellos pacientes con sepsis con cultivos positivos (Rangel-Frausto et al., 1995).

La presencia de eventos estresantes para el organismo como cirugías o padecimientos agudos (ej. pancreatitis aguda o cirugías mayores), se acompañan de la liberación de mediadores inflamatorios que condicionan una respuesta local que la mayoría de las veces lleva a la completa recuperación. En otras ocasiones, los mediadores inflamatorios contribuyen al desarrollo del SIRS. El SIRS puede

¹ La Sepsis se define como la presencia del SIRS ante una infección documentada por cultivo, o en el caso de cultivo negativo: en los casos en los que se encuentra edema o balance hídrico positivo (>20 ml/kg por más de 20 horas); hiperglucemia (glucosa >120 mg/dl) en ausencia de diabetes; incremento de la proteína C reactiva dos desviaciones estándar sobre su valor normal o incremento de la procalcitonina dos desviaciones estándar sobre su valor normal. La sepsis grave es la presencia de sepsis con disfunción orgánica, anomalías de la perfusión o hipotensión y choque séptico es la presencia de hipotensión persistente o alteración de la perfusión, resistentes a la resucitación hídrica y secundarias a la presencia de la sepsis.

favorecer la generación de falla orgánica, condición clínica que se asocia con elevada mortalidad. Existen mecanismos moleculares dirigidos a compensar el SIRS, conocidos en su conjunto como el Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria compensadora (CARS), que entre sus consecuencias, predispone al desarrollo de infecciones. Los pacientes portadores de Sepsis, pueden tener un curso benigno y recuperarse completamente. En ocasiones, la sepsis se complica con falla orgánica, resultando en lo que se conoce como sepsis grave, que puede tener un curso favorable o complicarse con choque séptico, que implica una mortalidad más elevada que el anterior. La activación del endotelio siempre se presenta y contribuye en la mayoría de las ocasiones a la mala evolución del paciente (Fig 2).

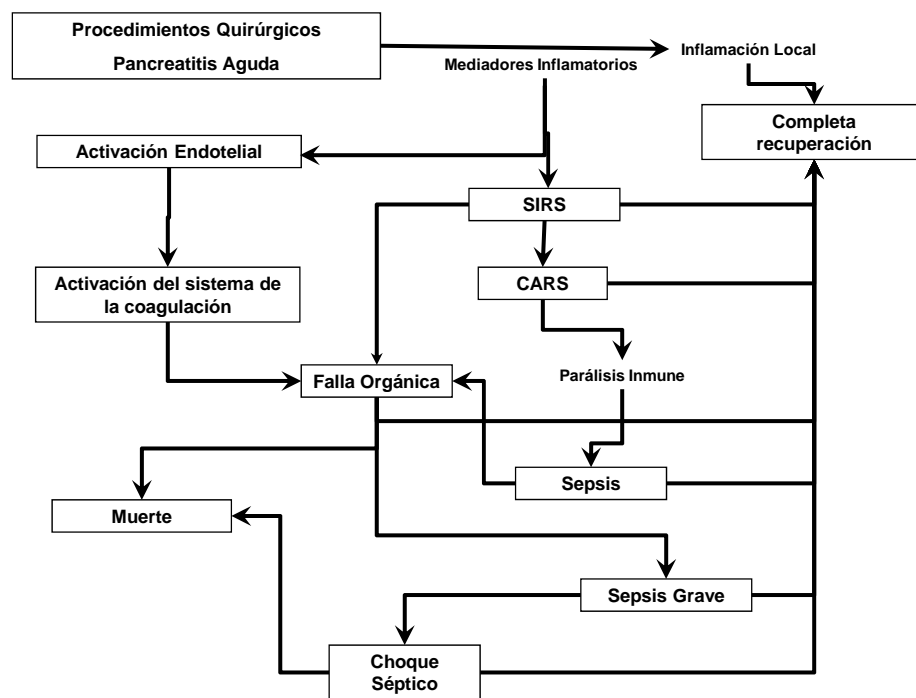


Figura 2. Esquema general de la historia natural de acontecimientos clínicos en la respuesta inflamatoria.

d. Mecanismos moleculares del SIRS y la Sepsis.

Los mecanismos extracelulares que favorecen el desarrollo del SIRS involucran la liberación de mediadores pro-inflamatorios del tipo de citocinas como TNF- α , IL-1 β y MIF-1, que actúan de forma sinérgica activando otros mediadores como las prostaglandinas (Ej. PGE₂), leucotrienos y el óxido nítrico, entre otros. IL-1 β y TNF- α son capaces también de iniciar la transcripción y la traducción de la forma inducible de la Oxido Nítrico sintasa, enzima que cataliza la formación del óxido nítrico (Dinarello, 1997;Pittet et al., 2002).

Muchos de los efectos biológicos de la IL-1 β y el TNF- α son similares a los observados durante la sepsis inducida por bacterias Gram-negativas en modelos murinos, y gran parte del conocimiento actual sobre la fisiopatología molecular de la respuesta inflamatoria, obedece a los estudios realizados con el componente activo de la endotoxina, el Lipopolisacárido (LPS). LPS activa la respuesta sistémica inflamatoria a través de un PRR presente en la superficie de diversos tipos celulares, conocido como receptor tipo Toll 4 (TLR4).

Los receptores Toll se encuentran en insectos y son esenciales para el desarrollo dorso-ventral durante la embriogénesis y la inmunidad anti-fúngica en la *Drosophila* (Akira et al., 2001). En el humano existen moléculas análogas denominadas receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés, *Toll-like receptor*). A la fecha se han identificado 11 TLR en humanos. Los TLR se expresan de forma diferente en varios tipos celulares y son capaces de reconocer diferentes tipos de MAMP, incluyendo lípidos, proteínas, DNA y RNA. Cada TLR reconoce diferentes ligandos: TLR2 y TLR1 reconocen lipopéptidos; TLR2 y TLR6 lipopéptidos

diacilados; TLR3 reconoce RNA de doble cadena durante la replicación viral; TLR4 reconoce lipopolisacárido bacteriano y algunas alarminas; TLR5 flagelina; TLR7 y TLR8 reconocen RNA de cadena simple y TLR9 reconoce DNA bacteriano y viral que contengan dominios CpG (Akira & Takeda, 2004; Ishii & Akira, 2004). Otra característica de algunos TLR es su localización celular. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se les encuentra en la superficie celular, mientras que TLR3, TLR9, TLR7 y TLR8 se encuentran en compartimientos intracelulares como el retículo endoplásmico y los fagosomas. La explicación a las diferentes localizaciones de los TLRs está en que los ubicados en la superficie celular reconocen estructuras externas de la pared celular bacteriana, mientras aquellos que se localizan en forma interna reconocen moléculas de ácidos nucleicos expuestos en fagosomas o en el citoplasma por bacterias intracelulares o virus durante una infección (Ishii & Akira, 2004). (Figura 3)

Los aminoácidos hidrofóbicos son necesarios para establecer las especificidades de los TLR (Akira & Takeda, 2004; Ishii & Akira, 2004); y estos tienen abundantes dominios de leucina que se encuentran involucrados en la unión con sus ligandos. Basados en la similitud de los dominios citoplasmáticos de los TLR -designados como TIR (*Toll-IL-IR domain*)-, estos receptores tienen homología con los receptores de la interleucina 1 (IL-1Rs), mientras que los dominios extracelulares son distintos en cada familia. Después de la unión con su ligando, los TLR se dimerizan (en homo o heterodímeros) y sufren cambios conformacionales que son requeridos para la señalización río abajo. Los TLR actúan a través de varias moléculas adaptadoras para activar factores de

transcripción como NF- κ B y cinasas intra-citoplasmáticas del tipo de las MAPK (*mitogen-activated protein kinase*).

Una de las vías de señalización que conducen a la activación de NF- κ B es dependiente de una de estas proteínas adaptadoras, MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*), reclutada a través del dominio TIR de los TLR. MyD88 es esencial para todos los TLRs, excepto TLR3. Además, TLR2 y TLR4 señalizan a través de TIRAP (*Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein*), otra molécula adaptadora que a su vez activa MyD88. Existe una vía de señalización independiente de MyD88 y encargada de inducir la producción de interferón beta (INF- β) a través de la estimulación con LPS o RNA de doble cadena. Esta vía independiente de MyD88, cuando se activa a partir de TLR3 y TLR4, utiliza la molécula adaptadora llamada TRIF (*TIR domain-containing adapter inducing interferon*). Otra molécula adaptadora, crítica para la señalización a través de TLR4 es TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (Ishii & Akira, 2004).

La asociación con MyD88 a su vez recluta a IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*) y posteriormente a IRAK1. La formación de este complejo (MyD88/IRAK4/IRAK1) facilita la unión de TRAF6 (*Tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*). Lo anterior favorece que IRAK1 y TRAF6 formen un complejo que se disocia del receptor y forman un nuevo complejo con TAK1 (*Transforming-growth-factor- β -activated kinase*), TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) y TAB2 a nivel de la membrana plasmática, lo que induce la fosforilación de TAB2 y TAK1. IRAK1 se degrada en la membrana plasmática, y el complejo remanente (TRAF6, TAK1, TAB1 y TAB2),

Lo anterior lleva a la ubiquitilación de TRAF6, que a su vez induce la activación de TAK1. TAK1 fosforila a MAPK y a IKK (*Inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex*), que consiste en IKK- α , IKK- β , e IKK- γ (también conocida como NEMO – *NF- κ B essential modulator*). El complejo IKK fosforila a I κ B, lo que produce su ubiquitilación y degradación subsecuente. Esto permite que NF- κ B se transloque al núcleo e induzca la expresión de genes involucrados con la respuesta inflamatoria (Akira & Takeda, 2004) (Figura 4).

Los TLR se expresan tanto en células inmunes como en no inmunes; las células mieloides expresan TLR1 y TLR6 de forma constitutiva. Los macrófagos y las células dendríticas expresan preferencialmente TLR2, TLR3, TLR4 y TLR8, mientras que las dendríticas plasmacitoides expresan TLR7 y TLR9. Los linfocitos B expresan TLR7, TLR9 y TLR10. Esta expresión diferente de TLRs en diferentes tipos celulares nos habla de los diferentes papeles que tienen en las infecciones. TLR3 y TLR4 también se expresan en células no inmunes y su activación puede llevar a la activación de células endoteliales que a su vez incrementan la expresión de moléculas de adhesión, con el consecuente incremento en la infiltración de macrófagos y de la permeabilidad vascular durante las infecciones. Esta cascada de eventos forma parte de la respuesta sistémica inflamatoria (Kumar et al., 2009).

El reconocimiento de productos bacterianos –MAMP- como el LPS (el más estudiado de estos), o de Alarminas por el sistema inmune lleva a la producción de una respuesta inflamatoria a través de la activación de diferentes cascadas de

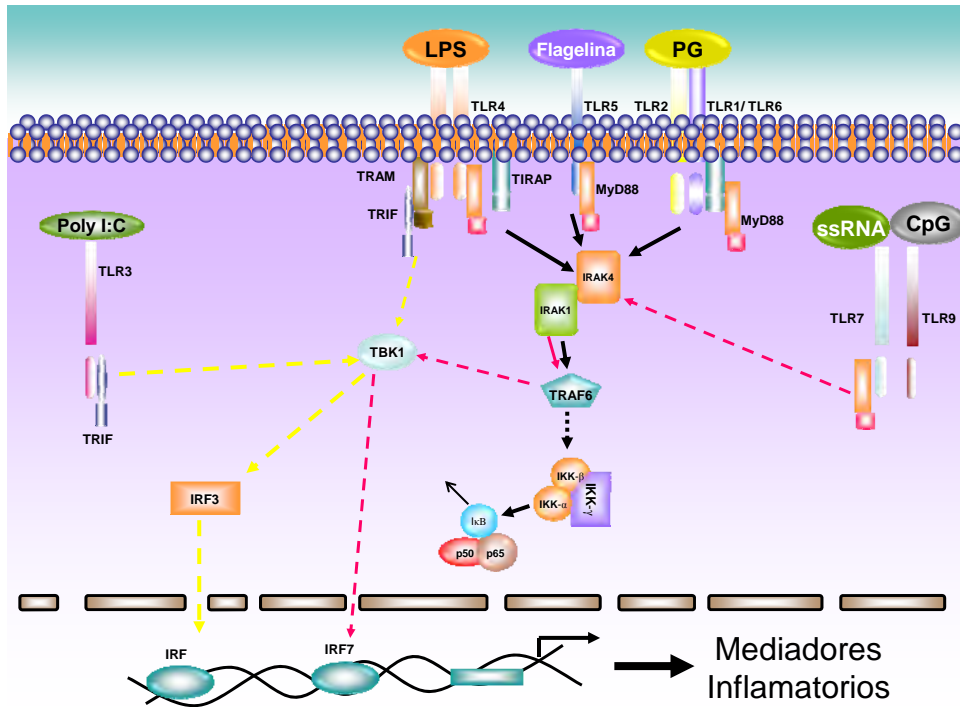


Figura 4. Esquemática de la cascada de señalización intracelular activada por MAMP a partir de TLR. El reconocimiento de los diferentes MAMP a través de los TLR (de membrana o intracelulares), activará sucesivamente cascadas de señalización intracelular que llevan a la producción de mediadores inflamatorios. En términos generales las vías de señalización pueden dividirse en dos, una dependiente de la proteína adaptadora MyD88, que involucra a todos los TLR excepto a TLR3, y la vía MyD88 independiente. La primera utiliza otra proteína adaptadora que es *Toll Like IL-1 Receptor adaptor protein* (TIRAP). Esta proteína es capaz de fosforilar y activar a IRAK4 (*IL-1 Receptor activator kinase*), que activa a su vez a IRAK1 y finalmente a TRAF6 (*TNF Receptor activating factor6*). Esta vía lleva a la activación del complejo IKK y a su vez a la fosforilación de IκB, para facilitar la translocación nuclear de NFκB al núcleo e iniciar la transcripción genética de mediadores inflamatorios. Por otro lado, la vía independiente de MyD88 emplea proteínas adaptadoras que empiezan a reclutarse una vez activado su TLR (TLR3 y TLR4). Estas proteínas adaptadoras son TRAM y TRIF (*TRIF, TIR domain containing adapter protein inducing INFbeta*, en donde TIR es *Toll/IL-1 Receptor homologous*) (TRAM, por sus siglas en inglés, *TRIF related adaptor molecule*). TBK1 (*TRAF, por sus siglas en inglés, family member associated NFκB activator binding kinase 2*) activa a su vez a IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*)

señalización intracelular. El LPS es transportado mediante su proteína transportadora *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP) y reconocido a través de CD14 que lo transfiere a MD-2. CD14 es una proteína anclada por glicosilfosfatidilinositol (GPI) a la membrana celular pero carece de dominio transmembranal e intracelular, por tanto incapaz de iniciar la activación de la cascada de señalización por sí sola. TLR4 es un componente esencial para la

señalización a partir del estímulo con LPS, aunque hasta el momento no se ha demostrado la unión de este ligando con el receptor (Dunzendorfer et al., 2004), TLR4 no se encuentra en forma aislada en la membrana celular. En ratones C3H/HeJ (ratones con TLR4 no funcional) utilizando FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), un sistema capaz de identificar la proximidad de moléculas entre sí a nivel de la membrana celular, se identificaron otros complejos de receptores en los que se encontraron, además de TLR4, proteínas de choque térmico 70 y 90 (Hsp70 y Hsp90, respectivamente), el receptor de quimiocinas 4 (CXCR4) y el factor de diferenciación del crecimiento 5 (GDF5). Estos hallazgos sugieren que el reconocimiento bacteriano se basa en el reclutamiento de múltiples moléculas en un microdominio membranal o balsa lipídica –*lipid rafts*– tras la estimulación con LPS. En apoyo a esto último, la disrupción de las balsas lipídicas (como con nistatina, por ejemplo) inhibe la secreción de TNF- α inducida por LPS (Triantafilou et al., 2002; Triantafilou & Triantafilou, 2003).

e. Regulación de la Respuesta Inflamatoria

La respuesta inflamatoria se regula a través varios mecanismos. Uno de ellos depende de la producción de Lipoxinas, Protectinas y Resolvinas a partir de PGE₂, que constituyen la fase de resolución de la respuesta inflamatoria (Serhan et al., 2008) (Figura 5). Otro corre a cargo de la división parasimpática del sistema nervioso autónomo, mediante la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina. Este neurotransmisor se une a receptores específicos en la membrana de macrófagos e inhibe la translocación nuclear de NF- κ B, bloqueando la respuesta inflamatoria (Tracey, 2002) (Figura 6). El siguiente mecanismo compete al sistema inmune que involucra a células presentadoras de antígenos (APC) (ej. monocitos) y linfocitos T CD4 principalmente, y la liberación de citocinas como IL-10, TGF- β , IL-4, IL-5, IL-13, entre otras, que caracterizan la respuesta molecular anti-inflamatoria. Estas citocinas, especialmente la IL-10, regulan negativamente la producción de las citocinas pro-inflamatorias (Dinarello, 1997). Parte de esta regulación está dada por los TLR a través del dominio TIR. Entre las moléculas que favorecen esta regulación está ST2 (IL1RL-1 ó *interleukin-1 receptor-like-1 protein*), que se expresa en linfocitos T; SIGIRR (*Single immunoglobulin IL-1R-related molecule*), un miembro de la superfamilia TLR/IL-1R, que es un modulador negativo de la señalización inducida a través de IL-1R y LPS. IRAK-M (*IL-1R-associated kinase-M*) y SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling*), que también son reguladores negativos de la actividad de TLR. Experimentalmente, los ratones deficientes para estas proteínas, presentan una respuesta pro-inflamatoria exagerada al LPS. Por ello es que se consideran

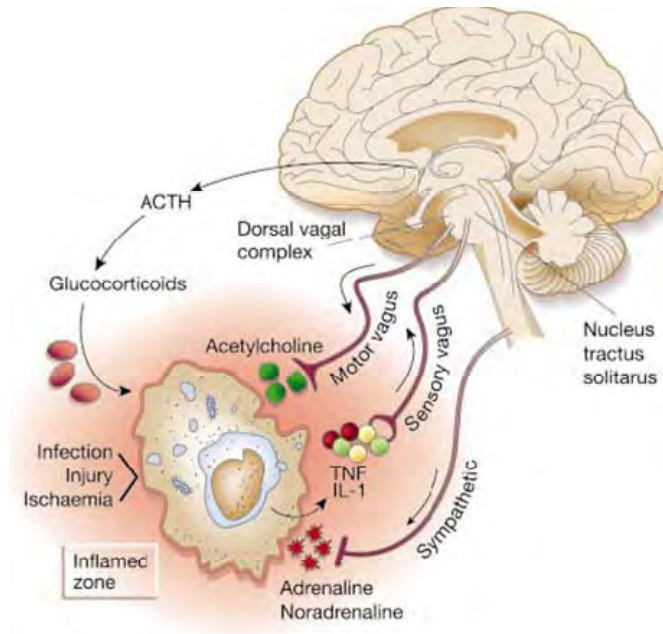


Figura 6. El reflejo inflamatorio. Los mediadores inflamatorios que se producen como consecuencia de una lesión, activan vías sensoriales vagales que tienen relevos en el núcleo del tracto solitario. Posteriormente se activan fibras vagales eferentes a través de la secreción de acetilcolina. Esta se une a su receptor en la superficie de células mononucleares e inhibe la síntesis de más citocinas pro-inflamatorias a través de la vía colinérgica anti-inflamatoria (reflejo inflamatorio). La información también puede llegar al hipotálamo y al complejo vagal dorsal para estimular la secreción de la hormona adrenocorticotrópica, la que a su vez activa la vía anti-inflamatoria humoral. La activación de la vía simpática del sistema nervioso produce la liberación de adrenalina y noradrenalina, la que contribuye a reducir la respuesta inflamatoria. Tomado de Inflammatory Reflex (Tracey, 2002).

Además de las citocinas anti-inflamatorias antes mencionadas, el CARS se caracteriza por la disminución de la expresión de las moléculas HLA-DR del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la superficie de las APC (Bone, 1996). Las moléculas HLA-DR tienen un papel fundamental en la defensa del organismo en contra de patógenos extracelulares, y su expresión disminuye en las APC por acción de mediadores anti-inflamatorios, lo que reduce la capacidad de presentar antígenos y en consecuencia se establece un estado de “inmunoparálisis” que favorece el desarrollo de complicaciones infecciosas,

mismas que conllevan una elevada morbi-mortalidad y elevados costos hospitalarios (Angele & Faist, 2002; Dellinger et al., 2004; Takahashi et al., 2006; Volk, 2002; Wolk et al., 2003).

f. Dos nuevas moléculas involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria: TREM-1 y Hsp70.

- ❖ Receptor activador expresado en células mieloides-1 (TREM-1, por sus siglas en inglés, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid-1 cells*)

TREM-1 es un receptor que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se encuentra en la membrana de neutrófilos y monocitos. Su expresión incrementa en respuesta a la presencia de bacterias o sus productos, mientras que en patologías inflamatorias no infecciosas como psoriasis, colitis ulcerativa y vasculitis, la expresión de TREM-1 no se modifica (Bouchon et al., 2000; Bouchon et al., 2001). El ligando de TREM-1 se desconoce, sin embargo, se ha propuesto que puede ser una molécula endógena liberada durante la necrosis asociada a daño celular, como el que se observa en los casos de sepsis, por lo que podría encontrarse en el suero de estos pacientes (Wong-Baeza et al., 2006). A través de un anticuerpo agonista se puede activar TREM-1, lo cual induce la producción de citocinas y quimiocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-8, MCP-1, MCP-3) (Aoki et al., 2004). TREM-1 incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86, y disminuye su expresión en presencia de IL-10 (Bleharski et al., 2003). TREM-1 sinergiza con diferentes ligandos de TLR para producir mediadores inflamatorios y regular negativamente la producción de mediadores anti-inflamatorios (Bleharski et al., 2003). En modelos murinos, el bloqueo de la

señalización por TREM-1 disminuye la magnitud de la inflamación y la mortalidad. Lo anterior se demostró en tres modelos de sepsis (inoculación de LPS, peritonitis por *E. coli* y sepsis polimicrobiana por ligadura y punción cecal), en los que la administración de una proteína de fusión soluble, que tiene la región extracelular de TREM-1 murino unida a la porción Fc de una inmunoglobulina humana, disminuyó la mortalidad. Esto se explica porque la proteína quimérica captura al ligando de TREM-1 antes de que llegue a su receptor, lo que impide la acción de TREM-1 de membrana (Bouchon et al., 2000; Bouchon et al., 2001). TREM-1 interactúa con DAP12 (DNA X-activating protein of 12 kD), una proteína adaptadora trans-membranal con la que se asocian receptores activadores en células NK, sin embargo, también se encuentra en los tipos celulares en donde se expresa TREM-1 (McVicar et al., 1998). Todavía no se han descrito las vías de señalización que se activan a través de TREM-1 en neutrófilos y monocitos, pero en células NK, cuando los receptores activadores reconocen a su ligando, DAP12 se fosforila en su dominio ITAM, lo que proporciona un sitio de anclaje para la tirosin-cinasa Syk. Esta enzima activa a la fosfolipasa $Cy1$ y a la vía de las MAP cinasas, y finalmente lleva a la activación de IKK y a la translocación hacia el núcleo de NF- κ B (McVicar et al., 1998). Es posible que algo similar ocurra en los neutrófilos y monocitos (Figura 7). TREM-1 también puede encontrarse en la circulación en forma soluble (sTREM-1), esta podría ser producto de una variante de corte alternativo y liberarse por monocitos activados (Gibot et al., 2005).

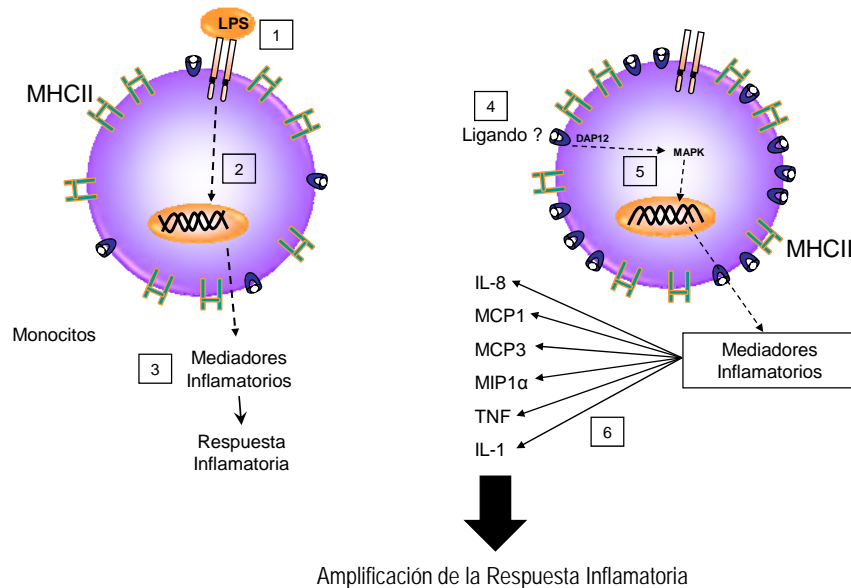


Figura 7. Mecanismo propuesto para la actividad de TREM-1 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1*). 1. Reconocimiento de LPS por TLR4; 2. Cascada de señalización que lleva a la translocación nuclear de NFkappaB. 3. Producción de mediadores inflamatorios y generación de una respuesta inflamatoria. 4. El ligando de TREM-1 se une a su receptor. 5. Se une su molécula adaptadora DAP12 y activa la vía de las MAPK. 6. Producción de otros mediadores inflamatorios.

La destrucción celular que acompaña a la respuesta inflamatoria como por ejemplo, en los procesos sépticos, favorece la liberación de Alarminas que también juegan un papel en la regulación de la inflamación. Algunas de ellas son fragmentos de hialuronato –un glicosaminoglicano asociado a matriz extracelular y líquidos sinoviales-, fragmentos de heparán sulfato –otro glicosaminoglicano asociado a matriz extracelular y superficies celulares- que estimulan TLR4 en ausencia de patógenos (Johnson et al., 2002; Johnson et al., 2004; Termeer et al., 2002). Otras moléculas propuestas como alarminas son el ácido úrico (Shi et al., 2003) y dos proteínas intracelulares: HMGB1 (*High Mobility Group Box1*) (Wang et

al., 1999) y la proteína de estrés Hsp70 (Asea et al., 2002; Bianchi, 2007; Johnson et al., 2002; Johnson et al., 2004; Termeer et al., 2002). HMGB1 es una proteína intranuclear que puede liberarse tras el daño celular, actuar sobre receptores RAGE y TLR4, e inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias.

❖ Proteína de estrés 70 (Hsp70)

Hsp70 es una proteína chaperona intracelular perteneciente a la familia de las proteínas de estrés HSP70; el incremento en su síntesis constituye parte de la Respuesta al Estrés y la han involucrado en la generación de la respuesta inflamatoria a través de la activación de diferentes componentes del sistema inmune innato (Moseley, 1998).

Las proteínas de estrés son proteínas intracelulares, abundantes tanto en células procariontes como en eucariontes, con una estructura bien conservada a través de la evolución entre diferentes especies, lo que sugiere que tienen un papel fundamental en diferentes procesos celulares (Hunt & Morimoto, 1985). El primer reporte de estas proteínas fue hecho por Ferruccio Ritossa, que observó ensanchamiento en los cromosomas (*puffs*) de glándulas salivales de la *Drosophyla*, al someterlas de forma accidental a un choque térmico (Ritossa, 1996). Una década después se identificaron los productos de los genes localizados en esos "*puffs*" y les llamaron Proteínas de Choque Térmico (Tissieres et al., 1974), aunque el nombre más apropiado es el de proteínas de estrés, ya que el choque térmico no es el único fenómeno estresante que induce su producción. Las proteínas de choque térmico (HSP) tienen masas moleculares que van de 15 kDa a 110 kDa y se dividen en familias con base en su tamaño y

función e incluyen: a HSP110, HSP90, HSP70, HSP60 y a las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular.

La familia HSP70 es de las más estudiadas y está integrada por HSP72 (Hsp70), HSP73 (Hsc70), HSP75 y HSP78. En el humano existen 12 genes que codifican para los diferentes miembros de la familia de HSP70; dos genes (*hsp70.1a* y *hsp70.1b*) codifican para Hsp70 (la forma inducible) y se localizan en el cromosoma 6 en la región del Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase III (Tavaria et al., 1996).

Hsp70 pliega y ensambla proteínas recién sintetizadas, repliega proteínas mal plegadas, evita la agregación proteica, desgrega y transloca proteínas secretoras a través de organelos; controla la actividad de proteínas reguladoras y factores de transcripción, regula el crecimiento celular y facilita la degradación de proteínas dañadas a través del proteosoma. Se puede encontrar en el citosol, núcleo, nucléolo, retículo endoplásmico y la membrana celular. Sus funciones se basan en la propiedad de interactuar con segmentos de péptidos hidrofóbicos, en un sistema dependiente de ATP (Figura 8) (Kaczmarek et al., 1987; Mayer & Bukau, 2005; Welch & Feramisco, 1984).

Hsp70 está constituida por tres dominios: el primero corresponde a la porción amino terminal de 44 kDa, que sirve de unión al ATP. El segundo dominio, de unión a péptidos, tiene un peso de 18 kDa y el tercero, corresponde al carboxilo terminal de 10 kDa, formado por otra α -hélice con una secuencia terminal

conservada y cuya función tiene que ver con la actividad inter-dominios (Kiang & Tsokos, 1998).

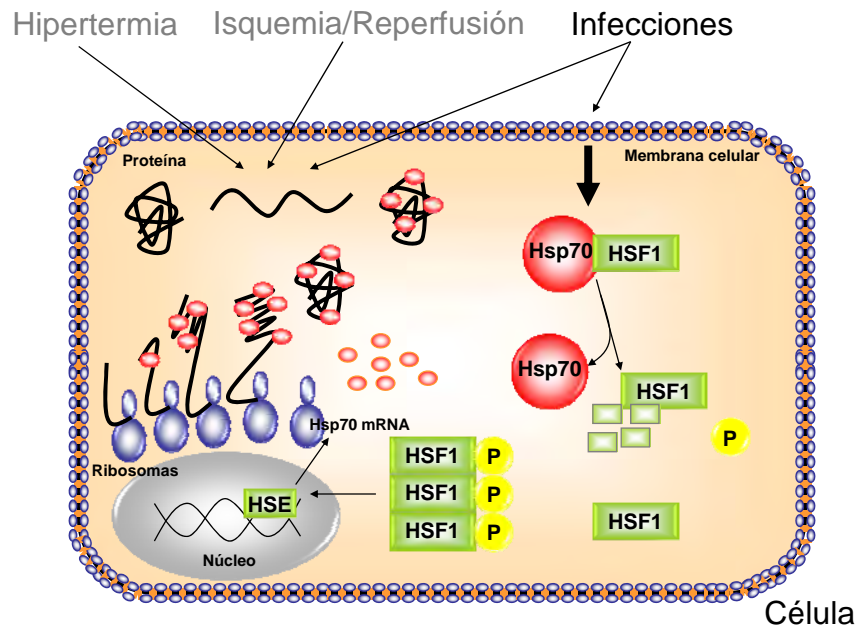


Figura 8. Descripción de las acciones de Hsp70 a nivel intracelular como chaperona. Diferentes estímulos como la hipertermia, la isquemia/reperusión y las infecciones, entre otros, favorecen la activación del factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1) por un lado y la desnaturalización de proteínas intracelulares. Hsp70 se disocia y favorece la trimerización de HSF1 y su translocación al núcleo para inducir la transcripción de la proteína. La proteína recién sintetizada es capaz de ayudar en el plegamiento de proteínas desnaturalizadas.

La biogénesis de Hsp70 comienza por la inducción de su producción a partir de estímulos extracelulares -como hipertermia, hipoxia, isquemia, acidosis, entre otras- que inducen la activación del factor de transcripción nuclear de Choque Térmico (HSF-1). A su vez, Hsp70 es un regulador negativo de la actividad de HSF-1, ya que en condiciones basales se encuentra interactuando con dicho factor de transcripción. La acción de alguno de estos estímulos incrementa el *pool*

de proteínas desnaturalizadas que compiten con HSF-1 por la asociación con Hsp70. Esto favorece la trimerización, translocación nuclear y unión al DNA de HSF-1 para iniciar la transcripción de Hsp70 (Guettouche et al., 2005; Kim et al., 2005; Morimoto et al., 1992) (Figura 8). Además de su función chaperona, el incremento en las concentraciones intracelulares de Hsp70 confiere protección adicional regulando la muerte celular por apoptosis y regulando negativamente la producción de mediadores inflamatorios a diferentes niveles de la cascada de señalización que llevan a la activación de NF- κ B (Figura 9) (Beere & Green, 2001; Beere, 2005; Ran et al., 2004; Yoo et al., 2000).

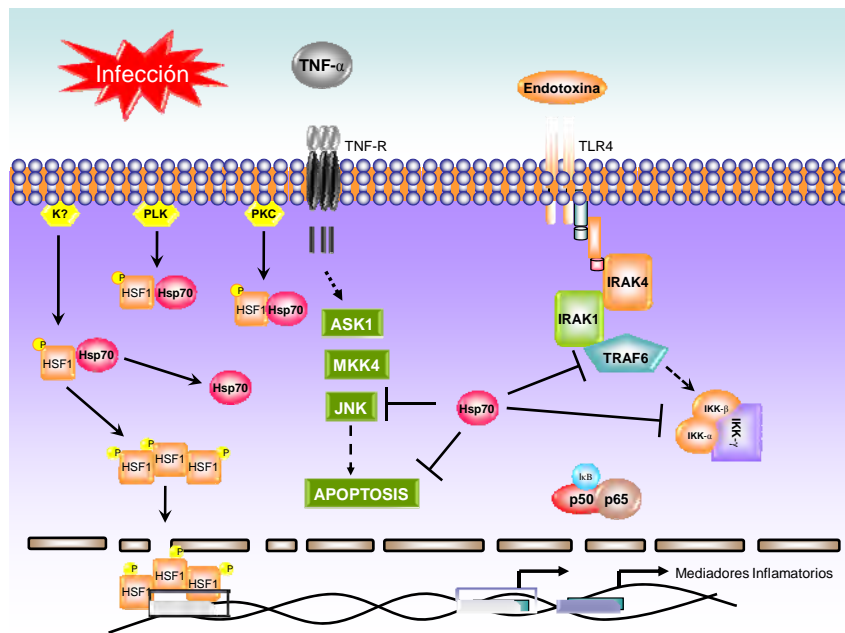


Figura 9. Mecanismo propuesto de Hsp70 para la protección celular. El estímulo inicial genera la producción de Hsp70 por un lado y la activación de JNK. Hsp70 inactiva, a través de la defosforilación, a JNK. Sin embargo, esta estará en relación con la cantidad de proteína desnaturalizada que se genere a consecuencia del estímulo inicial. A mayor daño protéico, la Hsp70 se ocupará de la renaturalización de las proteínas, y por lo tanto, la actividad de JNK se incrementa y en consecuencia también aumenta la Apoptosis, pese a la presencia de Hsp70. Por lo que el incremento en la síntesis de esta proteína de choque térmico, es esencial como mecanismo protector para impedir la muerte celular por Apoptosis.

Papel de TREM-1 y Hsp70 en la regulación de la respuesta inflamatoria.

La presencia de complicaciones en pacientes que desarrollan SIRS y la elevada morbilidad y mortalidad en pacientes con sepsis, han motivado la búsqueda de biomarcadores moleculares capaces de predecir el pronóstico clínico de los pacientes, a través de la detección oportuna de la presencia de complicaciones y dirigir el tratamiento de forma oportuna, específica y eficaz (Marshall, 2006;Meisner, 2005). La forma soluble de TREM-1 y la proteína de membrana, se han propuesto como biomarcadores para detectar en forma temprana la presencia de infecciones, y diferenciar aquellos pacientes con SIRS de los pacientes con sepsis (Gibot et al., 2004;Gibot et al., 2004). También se ha visto que el incremento en la expresión de TREM-1 puede presentarse en padecimientos no infecciosos (Gonzalez-Roldan et al., 2005;Wang et al., 2004;Wong-Baeza et al., 2006)

El daño celular también puede facilitar la liberación de Hsp70, que puede actuar como Alarmina y ser ligando de diferentes PRR, entre ellos los receptores TLR4 (Asea et al., 2002;Theriault et al., 2005). De esta forma, la unión de Hsp70 a estos receptores, activa al dominio TIR (*Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor*), que a su vez activa diferentes factores de transcripción que llevan a la producción de diferentes mediadores inflamatorios (Vabulas et al., 2002). Sin embargo, la capacidad inmuno-estimulante de Hsp70 puede ser consecuencia de la contaminación por LPS (Bausinger et al., 2002;Gao & Tsan, 2003;Vabulas et al., 2002).

6. Planteamiento del Problema.

La inflamación constituye un conjunto de mecanismos a través de los cuales el organismo responde ante diferentes estímulos nocivos y/o estresantes, y está encaminada a recuperar el estado de homeostasis. Está integrada por mediadores con acciones pro y anti-inflamatorias; la mayoría de las veces es limitada en magnitud y localización, sin embargo, en ocasiones la respuesta se extiende hacia diferentes sistemas de la economía. Las manifestaciones de esta respuesta inflamatoria exacerbada son variadas, pero juntas representan el SIRS y la respuesta reguladora que se genera en consecuencia se le denomina CARS, caracterizada solo desde el punto de vista molecular. El desarrollo de complicaciones asociadas al SIRS y al CARS, como sepsis, sepsis severa, choque séptico y la falla orgánica múltiple, entre otras, ponen de manifiesto la importancia del estudio de estas entidades, en especial por la elevada morbilidad y la mortalidad que se les asocian.

Si bien el trabajo en laboratorio a través de estudios *in-vitro* y en modelos animales nos proporciona las bases para comprender el comportamiento molecular, transpolar estos conocimientos a la patología del ser humano ha sido muy complicado, en especial cuando se trata de la búsqueda de algún biomarcador pronóstico o para aplicar alguna estrategia terapéutica.

Con base en lo anterior, caracterizar el comportamiento molecular en pacientes, es fundamental para entender mejor la compleja actividad de algunos mediadores inflamatorios.

TREM-1 se ha propuesto como un receptor que amplifica la respuesta inflamatoria y su expresión se incrementa en pacientes sometidos a diferentes fenómenos estresantes, como las infecciones, lo que sitúa a TREM-1 como un potencial biomarcador para detectar oportunamente la presencia de sepsis. Estudiar la expresión de TREM-1 en pacientes con procesos en los que se encuentra presente una respuesta inflamatoria (ej. quirúrgicos, sépticos y con pancreatitis aguda), nos permitirá ampliar el conocimiento del comportamiento de este receptor en el contexto de la respuesta inflamatoria. El estrés generado en procesos inflamatorios agudos (ej. infecciones), induce la producción de Hsp70 y, eventualmente, su liberación al medio extracelular en forma pasiva. Considerando que Hsp70 puede actuar como Alarmina, su liberación en situaciones de estrés es probable que regule la respuesta inflamatoria a diferentes niveles.

7. Hipótesis

- a) El incremento en la expresión de TREM-1 se asocia con la presencia de infecciones en pacientes quirúrgicos.
- b) El incremento en la expresión de TREM-1 se asocia con la presencia de sepsis.
- c) El incremento en la expresión de TREM-1 en pacientes quirúrgicos se asocia con la presencia del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.
- d) El incremento en la expresión de TREM-1 se observa en pacientes con procesos inflamatorios del tipo de la pancreatitis aguda y el pronóstico de la misma.
- e) La expresión de TREM-1 se regula por la acción de Alarminas del tipo de Hsp70
- f) La presencia de Hsp70 en el medio extracelular regula la amplitud de la respuesta inflamatoria.

8. Objetivos

- a) Evaluar si el incremento de TREM-1 en pacientes quirúrgicos se asocia con la presencia de infecciones.
- b) Evaluar si el incremento en la expresión de TREM-1 se asocia con la presencia de sepsis.
- c) Investigar si el incremento en la expresión de TREM-1 en pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos, se asocia con la presencia del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

- d) Investigar si el incremento en la expresión de TREM-1 se observa en pacientes con procesos inflamatorios del tipo de la pancreatitis aguda y el pronóstico de la misma.
- e) Analizar si la presencia de Alarminas del tipo de Hsp70 influye en la expresión de TREM-1.
- f) Estudiar si la presencia Hsp70 ejerce funciones reguladoras de la respuesta inflamatoria.

9. Material y Métodos.

Esta parte se divide en tres secciones:

9.1 Primera Sección. Análisis de la expresión de TREM-1 en pacientes sépticos, quirúrgicos y con pancreatitis aguda. En esta parte se incluye el resumen de la metodología de las dos publicaciones relacionadas con la expresión de TREM-1 en pacientes quirúrgicos y con pancreatitis aguda; y se anexan los dos artículos originales.

9.2 Segunda sección. Evaluación de la expresión de TREM-1 en células humanas CD14+, tratadas con LPS y/o Hsp70.

9.3 Tercera sección. Papel de Hsp70 en la regulación de la respuesta inflamatoria. Esta parte incluye la metodología del trabajo realizado *in-vitro* con Hsp70, en relación a su papel en la regulación de la respuesta inflamatoria.

9.1. Primera Sección. Análisis de la expresión de TREM-1 en pacientes sépticos, quirúrgicos y con pancreatitis aguda.

Ambos estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. En el primer artículo se incluyeron pacientes del sexo masculino y del femenino entre 18 y 80 años de edad, con diagnóstico de sepsis y pacientes intervenidos quirúrgicamente con patología abdominal. En el segundo artículo se incluyeron pacientes con diagnóstico de pancreatitis aguda.

Muestras Sanguíneas.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica dentro de las primeras 72 horas de evolución del padecimiento, tanto en los casos de sepsis como de pancreatitis aguda. Para los pacientes con sepsis, la segunda muestra se tomó a las 72 horas de su ingreso. En los casos de pancreatitis aguda se tomaron muestras a las 24 y las 72 horas después del ingreso. En los pacientes quirúrgicos, se tomó una muestra preoperatoria y otra postoperatoria.

Anticuerpos.

Se determinó el fenotipo celular con los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti-CD14 marcado con isotiocinato de Fluoresceína (FITC), anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR marcado con Ficoeritrina (PE)-cianina Cy5, anticuerpo monoclonal anti-TREM-1 marcado con Ficoeritrina. La combinación de

los fluorocromos permitió hacer una tinción triple en cada una de las muestras, por lo que se analizaron TREM-1 y HLA-DR en células CD14+ por separado.

Citometría de Flujo.

Se obtuvieron células mononucleares a través de centrifugación por densidad. Las células se bloquearon con gamma globulina humana y se lavaron con solución salina isotónica. Posteriormente se llevó a cabo la tinción con los anticuerpos monoclonales correspondientes o los controles de isotipo. Las células teñidas se analizaron para inmunofluorescencia de dos colores por citometría de flujo (FACSAria, Becton Dickinson, NJ, USA). La expresión de TREM-1 se reportó como intensidad media de fluorescencia (MFI) y la expresión de HLA-DR se reportó como porcentaje de células CD14 que también teñían para HLA-DR. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FACSDiva versión 4.1 (BD, NJ, USA).

TREM-1 soluble y cuantificación de citocinas.

Las concentraciones de TREM-1 soluble y de las citocinas IL-6 e IL-10, se determinaron utilizando la técnica de ELISA.

9.2. Segunda sección. Evaluación de la expresión de TREM1 en células CD14+ humanas tratadas con LPS y/o Hsp70.

Para esta parte se incluyeron seis donadores sanos a los que se les tomaron 5 ml de sangre de vena periférica por punción y colectada en tubos heparinizados. En placas de poliestireno de seis pozos se colocó un mililitro de sangre en cada pozo y cada uno se trató con cuatro condiciones diferentes: Sin estímulo; LPS (10 ng/ml); Hsp70 (3µg/ml); y LPS (10ng/ml) + Hsp70 (3 µg/ml) en forma simultánea. En la condición LPS+Hsp70, ambas moléculas se incubaron durante 2 horas a 37°C en una solución que contiene 25 mM TRIS-HCl, 20 mM HEPES, 47.5 mM KCl y 2.25 mM de Mg(OAc)₂, pH7.2. Se añadió el estímulo en cada pozo y se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Al finalizar las 24 horas, se retiró el sobrenadante, se despegaron las células del pozo con EDTA-Solución salina al 0.9%, se lavaron y posteriormente se fenotipificaron las células con los anticuerpos correspondientes; finalmente se leyeron en el citómetro de flujo.

Para evaluar el efecto que Hsp70 o LPS pudieran tener sobre la expresión de TREM-1, se estimularon las células en forma inicial como se muestra en la Tabla 1, y ocho horas después de añadió el siguiente estímulo (Tabla 1). El método utilizado para esta serie de experimentos fue el mismo que el descrito en el párrafo anterior.

Tabla 1. Concentraciones y tiempo de estimulación con LPS y Hsp70

| Inicial | A las 8 horas |
|---------------|---------------|
| PBS | Sin estímulo |
| LPS 10 ng/ml | Sin estímulo |
| LPS 10ng/ml | Hsp70 3 µg/ml |
| PBS | Hsp70 3 µg/ml |
| Hsp70 3 µg/ml | LPS 10ng/ml |

Las células se fenotipificaron con los siguientes anticuerpos: anti-CD14 FITC (BD 555397) y anti-TREM-1 PE (RD FAB127-8P), y se analizaron en el citómetro de flujo (FACSAria). La población celular presuntamente correspondiente a monocitos, se seleccionó a partir de una gráfica de puntos por tamaño y granularidad (FCS- SSC). De ésta región se buscaron las células CD14+. Se analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de TREM1 en esta población.

Análisis Estadístico Segunda sección.

Para el análisis estadístico se verificó normalidad de los datos, se aplicó una prueba de ANOVA, utilizando las pruebas de Bonferroni y de Tukey para comparar entre grupos. Se consideró una prueba significativa con un valor de $P < 0.05$.

9.3. Tercera sección. Papel de Hsp70 en la regulación de la respuesta inflamatoria.

Reactivos.

Hsp70 -Low Endotoxin- (ESP-555) y Hsp70 no purificada (NSP-555) se adquirieron de Assay Designs (antes StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, B.C., Canada). *Escherichia coli* 0111:B4 LPS se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); la Flagelina de *Salmonella typhimurium* y la Peptidoglicana de *Staphylococcus aureus* (PG) se adquirieron de InvivoGen (San Diego, CA, USA). Las Porinas de *Salmonella enterica serovar Typhi* grado vacuna, que contienen <0.2 ng de LPS por µg de porinas, se obtuvieron de acuerdo a lo reportado por Salazar-González y colaboradores (Salazar-Gonzalez et al., 2004). Estos agonistas de TLR se pre-incubaron durante dos horas con Hsp70 con la siguiente solución que contiene: 25 mM TRIS-HCl, 20 mM HEPES, 47.5 mM KCl, y 2.25 mM Mg(OAc)₂. La concentración de citocinas se determinó a través de los siguientes *kits* de BD Biosciences: Human TNF ELISA Set of BD OptEIA™, (sensibilidad de la prueba de 7.8pg/ml); human IL-6 ELISA Set of BD OptEIA™ (sensibilidad de la prueba de 4.7 pg/ml), y human IL-10 ELISA Set of BD OptEIA™ (sensibilidad de la prueba de 7.8pg/ml). Todas las pruebas se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y por duplicado.

Células.

Las células mononucleares se obtuvieron de concentrados leucocitarios de donadores sanos del banco de sangre a través de centrifugación por gradiente con

Lymphoprep™ (Fresenius Kabi Norge AS, by Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). Posteriormente los mononucleares se resuspendieron en 2 ml of RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen Cell Culture) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES) y 1% de penicilina-estreptomina, se contaron y resuspendieron 20×10^6 cels/15ml en placas de cultivo por 2 h a 37°C y 5% CO₂. La capa de monocitos se despegaron utilizando un amortiguador frío EDTA 10x (NaCl 80g, KCl 4g, dextrosa 10g, EDTA-Na 2g y HCO₃ 7.5%), finalmente se colocaron 1×10^6 monocitos/pozo en placas de 24 pozos por 24 h a 37.5°C, 5% CO₂.

Estimulación de monocitos.

Después de 24h, el medio se retiró y se lavaron las células en dos ocasiones con PBS antes de añadir RPMI fresco suplementado. Se estimularon con LPS (100 ng/ml), Peptidoglicana (10 µg/ml), Flagelina (10 µg/ml), o Porinas (3 µg/ml) con o sin Hsp70 3 µg/ml, en 1 ml de RPMI por los tiempos indicados a 37°C y 5% de CO₂. Los sobrenadantes se colectaron, centrifugaron (1,000 g por 5 min), lavaron con PBS y congelaron a -70°C hasta su análisis por ELISA.

Extracción de RNA Total, RT-PCR y análisis semicuantitativo.

El RNA Total se extrajo de células mononucleares de sangre periférica utilizando TRIzol (Invitrogen). La concentración y la pureza del RNA extraído se determinó espectrofotométricamente a 260 y 280 nm (Beckman DU640, USA). El cDNA de una cadena se sintetizó mezclando 1 µg RNA con 1 µL oligodT (0.5 µg/µL, Promega), 1 µL dNTP mix (10 mmol/µL, Promega), 4 µL del amortiguador

de reacción (Promega), 2 μL DTT (0.1 mmol/ μL , Promega), 1 μL SuperScript II RNase H transcriptasa reversa (200 U/ μL , Promega), en un volumen total de 25 μL . La reacción se incubó a 42 °C por 50 min, seguidos por 15 min a 70 °C para inactivar la transcriptasa reversa. El cDNA (1 μg) se utilizó como molde para la amplificación por PCR de TNF- α . La mezcla consistió en 0.5 μL dNTP mix (10 mmol/ μL , Promega), 1.5 μL MgCl₂ (25 mmol/ μL , Promega), 1 μL primers (5'-GGTGCTTGTTCCCTCAGCCTC-3' y 5'-CAGGCAGAAGAGCGTGGTG-3' para TNF- α o 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' y 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' para β -actina), 0.25 μL DMSO, 0.25 μL Taq DNA polimerasa (5 U/ μL , Promega), 2.5 μL PCR buffer (Promega) en un volumen total de 20 μL . El DNA se desnaturalizó a 95 °C por 10min, seguido por 35 ciclos para desnaturalización (95 °C por 30 s), alineación (58 °C por 1 min), y extensión (72 °C por 1 min). La mezcla finalmente se extendió por 10 min a 72 °C. Se incluyó β -Actina como control interno en cada experimento. Los productos de PCR (10 μL) se sometieron a electroforesis usando geles de agarosa 20 g/L en TAE a 70 V por 60 min. Las muestras se tiñeron con bromuro de etidio (0.1 mg/L) y se observaron por iluminación ultravioleta. Las imágenes se fotografiaron y analizaron con un sistema de imagen digital IS-1000 (Alpha Innotech Corporation). Las densidades de las bandas de TNF- α y β -actina se determinaron y se calculó el radio de TNF- α / β -actina. Estos radios se representaron como los niveles de expresión relativa (índice de expresión) del RNA mensajero de TNF- α y se utilizaron para el análisis semicuantitativo.

Análisis Estadístico Tercera sección.

Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA (One way) con la post-prueba de Tukey's post-test utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, CA, USA). Se consideró una prueba significativa con un valor de $P < 0.05$.

10. Resultados.

10.1. Primera sección. Análisis de la expresión de TREM-1 en pacientes sépticos, quirúrgicos y con pancreatitis aguda.

10.1.1. Resumen del manuscrito publicado.

Título del manuscrito: El incremento en la expresión de TREM-1 en monocitos se asocia con procesos inflamatorios infecciosos y no infecciosos (***The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes***). Publicado en *Journal of Surgical Research* 2008

Introducción.

La inflamación es la respuesta del organismo a una lesión tisular o infección. Usualmente se limita al sitio afectado, pero en algunas ocasiones, los mediadores inflamatorios alcanzan la circulación y actúan en sitios distantes al origen del proceso, dando como resultado el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS). El SIRS se compensa a través de una respuesta anti-inflamatoria compensadora, conocida como Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora (CARS), que no tiene manifestaciones clínicas, pero que se caracteriza, entre otras cosas, por la disminución en la expresión de las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-DR). En pacientes post-operados de cirugía mayor, o bien pacientes con pancreatitis aguda, la presencia del SIRS y del CARS, favorece el desarrollo de infecciones y por tanto de sepsis. TREM-1 se ha propuesto como un biomarcador temprano de infección

en los casos de SIRS. En este estudio analizamos la expresión de TREM-1 en pacientes con sepsis y en pacientes con respuesta inflamatoria sistémica sin la evidencia de infección. También buscamos una posible correlación entre la expresión de TREM-1 y HLA-DR, con la evolución del paciente.

Materiales y Métodos.

Cincuenta y ocho pacientes quirúrgicos, 14 pacientes con sepsis y 50 voluntarios sanos se incluyeron en este estudio. Se determinó la expresión de TREM-1 y HLA-DR a través de citometría de flujo.

Resultados.

La expresión de TREM-1 incrementó en todos los pacientes en el posoperatorio, y su expresión fue mayor en los pacientes que presentaban SIRS desde el pre-operatorio. No se encontró asociación del incremento de TREM-1 con la presencia de infecciones. En los pacientes sépticos, el incremento en la expresión de TREM-1 fue transitorio. La expresión de HLA-DR disminuyó tanto en pacientes quirúrgicos como en los pacientes sépticos, y esta reducción fue mayor en pacientes que tuvieron mala evolución.

Conclusiones.

El incremento en la expresión de TREM-1 en monocitos se asocia con procesos inflamatorios, infecciosos y no infecciosos, y los niveles de HLA-DR correlacionan bien con el pronóstico del paciente.

The Increased Expression of TREM-1 on Monocytes Is Associated With Infectious and Noninfectious Inflammatory Processes

Eduardo Ferat-Osorio, M.D.,* Noemí Esquivel-Callejas, M.D.,* Isabel Wong-Baeza, B.Sci.,*†
Rosalía Aduna-Vicente, B.Sci.,*† Lourdes Arriaga-Pizano, M.D., Ph.D.,* Patricio Sánchez-Fernández, M.D.,‡
Rubén Torres-González, M.D., M.Sci.,§ Constantino López-Macías, Ph.D.,*
and Armando Isibasi, M.D., Ph.D.*¹

*Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, DF, IMSS, Mexico; †Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, DF, Mexico; ‡Servicio de Gastrocirugía, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, DF, IMSS, Mexico; and §Unidad Médica de Alta Especialidad, Dr. Victorio de la Fuente Narváez, Distrito Federal, IMSS, Mexico

Submitted for publication August 20, 2007

Background. Inflammation is the response of an organism to tissue injury or infection. It is usually limited to the affected tissue, but sometimes the inflammatory mediators reach the bloodstream and act systemically. A compensatory anti-inflammatory response syndrome, in which expression of major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules are decreased, regulates the resulting systemic inflammatory response syndrome (SIRS). SIRS and compensatory anti-inflammatory response syndrome can lead to the development of sepsis. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 has been proposed as a biomarker of the presence of sepsis. In this study, we investigated whether TREM-1 is increased only in septic patients, and not in patients with systemic inflammatory response but no infection. We also looked for a possible correlation between TREM-1 and MHC-II expression levels and the patients' progress.

Materials and methods. Fifty-eight surgical patients, 14 septic patients and 50 healthy volunteers, were included in this study. TREM-1 and MHC-II expression on blood monocytes was determined by flow cytometry.

Results. TREM-1 expression was increased in all patients after surgery, and its expression was higher in patients with preexisting SIRS. No association was found with the presence of infection. In septic patients, the increase in TREM-1 expression was transitory. MHC-II expression was decreased in both surgi-

cal and septic patients, and this decrease was greater in patients with a worse outcome.

Conclusions. Increased TREM-1 expression on monocytes is associated with both infectious and noninfectious inflammatory processes, and the levels of MHC-II expression is better correlated with the patient outcome. © 2008

Elsevier Inc. All rights reserved.

Key Words: TREM-1; SIRS; CARS; sepsis.

INTRODUCTION

Inflammation is the response of an organism to tissue injury or infection. During the course of inflammation, cells of the innate immune system are recruited to the affected tissue and activated by various cytokines and chemokines, leading to elimination of invading microorganisms, tissue repair, and restoration of tissue homeostasis. Inflammation is generally limited to affected tissues, but sometimes inflammatory mediators can reach the bloodstream and act in organs remote from the original site. This is clinically manifested in the form of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [1]. SIRS is regulated by the compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS), which is characterized by the production of anti-inflammatory mediators and by a decrease in expression of major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules on monocytes and macrophages. MHC-II molecules play an important role in the defense against extracellular pathogens, and their expression is negatively regulated by anti-inflammatory cytokines. The resulting "immunoparalysis" favors the development of infections [2–5]. SIRS and CARS are

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at UIM en Inmunoquímica, Coordinación de Investigación en Salud, P.O. Box A047, C.P. 06703, Mexico DF, Mexico. E-mail: isibasi@prodigy.net.mx.

associated with complications such as sepsis, severe sepsis, septic shock, and multiple organ failure and have been the subject of various studies, due to the increasing frequency, morbidity/mortality, and costs of treatment of these conditions [6]. The coexistence of pro- and anti-inflammatory mediators during the pathologic inflammatory process blurs the distinction between SIRS and CARS but adds interest to the understanding of the molecular mechanisms that underlie the development of these clinical syndromes. Studies of the mediators involved are also aimed at the finding of biomarkers for early diagnosis and prognosis that would render treatments opportune and specific [7, 8]. Thus, triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 and MHC-II molecules have been proposed as biomarkers, the former to detect sepsis (defined as a systemic inflammatory response with infection), and the latter to define prognosis in early stages of disease evolution.

TREM-1 is found on the surface of neutrophils and monocytes, and its expression is increased in response to bacteria and their products. In psoriasis, ulcerative colitis, and vasculitis, which are noninfectious inflammatory processes, TREM-1 expression is not increased [9, 10]. Nevertheless, there are reports of increased TREM-1 expression in surgical patients and in patients with acute pancreatitis, which are also noninfectious inflammatory processes [11, 12]. Currently, the ligand for TREM-1 is unknown, but through the use of an agonist antibody it was found that TREM-1 signaling induces the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines [13]. TREM-1 ligand may be an endogenous molecule released during necrosis-associated cellular damage, such as that observed in cases of sepsis [14]; this ligand may be found in the sera of septic patients [15]. TREM-1 synergizes with different toll-like receptor ligands for production of pro-inflammatory mediators and negative regulation of anti-inflammatory mediators [16]. Blocking of TREM-1 signaling in animal models of infection causes a decrease in the magnitude of inflammation and in mortality [9, 10].

A soluble form of TREM-1 (sTREM-1) is released by activated murine monocytes [17]. In humans, increased sTREM-1 levels can aid in the differentiation of sepsis from SIRS [18, 19]. Increased sTREM-1 levels in bronchoalveolar lavage can also discriminate between pneumonia related to orotracheal intubation and nonpulmonary systemic infection, even when serum procalcitonin concentrations are low [20, 21]. However, it is not yet clear if the expression of the membrane-bound form of TREM-1 increases exclusively in response to infections, and few reports analyze TREM-1 expression under pathologic conditions. This study, therefore, was conducted to determine if TREM-1 is increased only in the presence of infection

TABLE 1

Demographic Data of Patients Included in this Study

| Variables | Surgical patients | Septic patients | Healthy controls |
|------------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| Total | 58 | 14 | 50 |
| Gender | 28 | 6 | 11 |
| Female | | | |
| Male | 30 | 8 | 39 |
| Age (mean) | 55 | 59 | 33 |
| APACHE II average | — | 25 | — |
| Mortality <i>n</i> (%) | 6 (10) | 9 (64) | — |

(septic patients) or if it is also increased in patients with systemic inflammatory response but no evidence of infection. We also looked for a possible correlation between TREM-1 and MHC-II expression levels and the patients' progress and outcomes.

MATERIALS AND METHODS**Patient Selection Criteria and Demographic Data**

This study was approved by the Hospital Ethics and Research Committee. The patients or their legal representatives received detailed information about this protocol, and, if they chose to participate, signed an informed consent form. The inclusion criteria admitted male or female patients between 18 and 80 y of age who presented with sepsis of gastrointestinal origin according to the guidelines established by the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine [22], or that were subjected to surgical interventions for abdominal or gastrointestinal pathology. The surgical elective patients had no clinical evidence of infection when they were enrolled in this study, although the presence of infection cannot be completely discarded; this is the reason we and others are searching for some biomarkers to help differentiate noninfectious SIRS from infectious SIRS (sepsis). The exclusion criteria were pregnancy, treatment with immune suppressors, or human immunodeficiency virus or hepatitis C virus infection. Samples were obtained from 58 surgical patients (44 high-risk patients with elective surgery and 14 with emergency surgery) and 14 patients with sepsis (Tables 1 and 2). Eighteen surgical patients (31%) developed complications, the most frequent cause being postoperative infection (11 patients); six of these patients with complications (two infected and four noninfected) died (10% mortality). All septic patients required surgery to correct the cause of sepsis; this group had a mortality of 64% and an Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II average of 25 points. Cultures were taken from 12 of the 14 septic patients; five of these cultures were negative, but infection was suspected because of clinical evidence. Five cultures were positive for one microorganism; one culture was positive for two microorganisms and the last culture was positive for three microorganisms. The isolated pathogens were *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas* sp., *Candida* sp, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus aureus*. The two patients without culture had abdominal sepsis due to contamination with gastrointestinal contents. A group of 50 healthy volunteers was also included in this study for comparison purposes; these individuals also signed an informed consent form (Table 1).

Blood Samples

Blood samples (8 mL) were collected, in heparin-containing tubes, within the first 72 h (29 h on average) after the diagnosis of sepsis

TABLE 2
Surgical Patients Included in this Study

| Patient | Group | Diagnosis | Procedure |
|---------|-------|------------------------------|-------------------------------|
| 1 | E | Inguinal hernia | Inguinal hernioplasty |
| 2 | E | Jejunostomy | Jejunostomy closure |
| 3 | E | GRD | Nissen fundoplication |
| 4 | E | Inguinal hernia | Inguinal hernioplasty |
| 5 | E | GRD | Nissen fundoplication |
| 6 | E | Incisional hernia | Hernia repair with mesh |
| 7 | E | Ileostomy | Ileostomy closure |
| 8 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 9 | E | Colostomy | Colostomy closure |
| 10 | E | Incisional hernia | Hernia repair with mesh |
| 11 | E | Incisional hernia | Hernia repair with mesh |
| 12 | U | Mesenteric thrombosis | Bowel resection |
| 13 | E | GRD | Nissen fundoplication |
| 14 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 15 | U | Mesenteric thrombosis | Bowel resection |
| 16 | E | Incisional hernia | Hernia repair with mesh |
| 17 | E | Colostomy | Colostomy closure |
| 18 | E | Pancreatic adenocarcinoma | Whipple procedure |
| 19 | U | Incarcerated hernia | Bowel resection |
| 20 | E | Ampulla of Vater tumor | Laparotomy/lymph nodes biopsy |
| 21 | U | Acute cholecystitis | Cholecystectomy |
| 22 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 23 | U | Obstructive jaundice | Choledochoduodenostomy |
| 24 | U | Appendicitis | Appendectomy |
| 25 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy and CBDE |
| 26 | E | GRD | Nissen fundoplication |
| 27 | U | Small bowel obstruction | Laparotomy |
| 28 | E | Colostomy | Colostomy closure |
| 29 | E | Ampulla of Vater tumor | Whipple procedure |
| 30 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 31 | U | Appendicitis | Appendectomy |
| 32 | E | Esophageal varices/PH | Gastro-gastroanastomosis |
| 33 | E | Pancreatic tumor | Distal pancreatectomy |
| 34 | E | Bile duct injury/Bismuth III | Hepaticojejunostomy |
| 35 | E | Bile duct injury/Bismuth II | Choledochoduodenostomy |
| 36 | U | Obstructive jaundice | Choledochoduodenostomy |
| 37 | E | Bile duct injury/Bismuth II | Hepaticojejunostomy |
| 38 | E | Cholangiocarcinoma | Whipple procedure |
| 39 | E | Ampulla of Vater tumor | Whipple procedure |
| 40 | E | Cholangiocarcinoma | Hepaticojejunostomy |
| 41 | U | Abdominal sepsis | Laparotomy |
| 42 | E | Common bile duct stones | Choledochoduodenostomy |
| 43 | U | Acute diverticulitis | Colostomy |
| 44 | U | Cholecystitis with empyema | Cholecystectomy |
| 45 | E | Bile duct injury/Bismuth II | Hepaticojejunostomy |
| 46 | E | Pancreatic tumor | Distal pancreatectomy |
| 47 | U | Acute diverticulitis | Colostomy |
| 48 | E | Inguinal hernia | Inguinal hernioplasty |
| 49 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 50 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 51 | U | Acute cholecystitis | Cholecystectomy |
| 52 | E | Achalasia | Esophagomyotomy |
| 53 | E | Incisional hernia | Hernia repair with mesh |
| 54 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 55 | E | Chronic cholecystitis | Cholecystectomy |
| 56 | E | Pancreatic tumor | Whipple procedure |
| 57 | E | Ileostomy | Ileostomy closure |
| 58 | E | Colostomy | Colostomy closure |

GRD = gastroesophageal reflux disease; CBDE = common bile duct exploration; PH = portal hypertension; E = elective surgery; U = emergency surgery.

and 72 h later from septic patients; 60 min prior to surgery and 24 h after surgery from surgical patients, and once from healthy volunteers.

Antibodies

Fluorescein-isothiocyanate-labeled anti-CD14 monoclonal antibody was purchased from BD Biosciences PharMingen (San Jose, CA) (Cat. 555397, clone M5E2, mouse IgG_{2a}, κ). Phycoerythrin (PE)-cyanin dye Cy5-labeled anti-HLA-DR (MHC-II) monoclonal antibody was also purchased from BD Biosciences PharMingen (Cat. 555813, clone L243, mouse IgG_{2a}, κ). PE-labeled anti-TREM-1 monoclonal antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN) (Cat. FAB1278P, clone 193015, mouse IgG1). No cross-reactivity with other human molecules is reported for these antibodies. This combination of fluorochromes allowed us to perform a triple staining on each sample, and TREM-1 and MHC-II were analyzed on CD14⁺ cells. Monocytes from healthy volunteers routinely express $83.31 \pm 11.27\%$ of MHC-II and 34.35 ± 15.5 mean fluorescence intensity of TREM-1. CD3⁺ lymphocytes do not express MHC-II or TREM-1 and were used as negative controls. PE-labeled mouse IgG1 and Fluorescein-isothiocyanate-labeled mouse IgG2a (BD Biosciences) were used as isotype-matched controls. The coefficient of variance for our flow cytometry determinations was 12%.

Flow Cytometry

Peripheral blood mononuclear cells were obtained by density centrifugation using Lymphoprep™ (Axis-Shield, Kimbolton, U.K.). Cells were washed three times with isotonic saline solution at $150 \times g$ for 10 min. Cell number and viability were determined by trypan blue (Sigma, St. Louis, MO) staining, and 1×10^6 cells per well were transferred to a 96-conical-well plate (Corning, Corning, NY). Cells were blocked with a 20 g/L human gamma globulin solution (Beriglobin™, Aventis, DF, Mexico) for 1 h at 4°C and washed with isotonic saline solution at $150 \times g$ for 3 min. Subsequent staining with either labeled monoclonal antibodies or appropriate isotype controls was performed for 20 min at 4°C. The stained cells were washed, resuspended, and analyzed for three-color immunofluorescence by flow cytometry (FACSARIA, Becton Dickinson, Rutherford, NJ). The gate that contained monocytes was identified by the presence of CD14, and a minimum of 10^4 events were analyzed for each sample. TREM-1 expression is reported as mean fluorescence intensity, and MHC-II expression is reported as percentage of CD14 cells that also stain for these molecules. Data analysis was performed using FACSDiva software version 4.1. (Becton Dickinson).

Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance with Tukey's post-test using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

TREM-1 Expression Is Increased in Surgical Patients Without Infectious Pathology

Previous studies [19, 23] associate an increased TREM-1 expression with infections, and some of them [9, 10] report that pathologies of noninfectious origin have no effect on TREM-1 expression. We analyzed TREM-1 expression before and after surgery in patients with abdominal or gastrointestinal pathology. TREM-1 expression increased significantly in the postoperative period in patients that survived compared

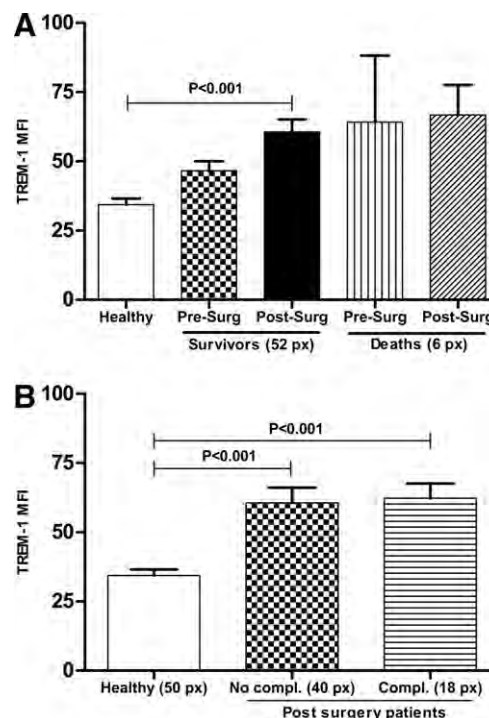


FIG. 1. TREM-1 expression is increased in surgical patients without infectious pathology. TREM-1 expression on blood monocytes of surgical patients ($n = 58$) is shown, in samples taken before (Pre-Surg) and after (Post-Surg) surgery. Patients were classified as survivors ($n = 52$) or nonsurvivors ($n = 6$) (A), or as patients that did ($n = 18$) or did not ($n = 40$) develop complications (B). TREM-1 expression on blood monocytes of healthy volunteers ($n = 50$) is also shown. Statistically significant differences are shown on the graphs. The TREM-1 data are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

with the expression level in healthy volunteers ($P < 0.001$) (Fig. 1A). Although the surgical patients' group is older than the healthy volunteers' group (Table 1), we have observed that TREM-1 expression is not increased with age (data not shown). TREM-1 expression was increased after surgical procedures ($P < 0.001$), regardless of the presence or absence of complications (Fig. 1B), and there was no statistically significant difference in the levels of TREM-1 expression, before or after the surgery, between the surgical patients that developed infection and the surgical patients that developed a complication other than infection (not shown). This indicates that increased TREM-1 expression is not exclusively associated with infections, and that a surgical procedure performed in patients with abdominal or gastrointestinal pathology can also increase the level of TREM-1 expression.

TREM-1 Expression Is Increased in Surgical Patients with SIRS

To determine if a preexisting SIRS affected TREM-1 expression, we grouped surgical patients according to the presence or absence of SIRS before surgery. SIRS

was diagnosed to the guidelines established by the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine (two or more of the following conditions: temperature $>38^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$; heart rate >90 beats/min; respiratory rate >20 breaths/min or $\text{PaCO}_2 < 32$ Torr (<4.3 kPa); $\text{WBC} >12,000$ cells/ mm^3 , <4000 cell/ mm^3 , or $>10\%$ immature forms) [22]. TREM-1 expression was higher in patients that had SIRS before the surgical procedure, compared with healthy volunteers ($P < 0.01$). After surgery, patients with preexisting SIRS had significantly higher levels of TREM-1 expression, compared with patients without SIRS ($P < 0.01$) (Fig. 2). These results suggest that TREM-1 is a receptor involved in situations of stress, such as an inflammatory response to gastrointestinal pathology or a surgical event itself, and that an increased expression of this molecule is not restricted to infectious pathologies.

TREM-1 Expression Increase Is Transitory in Septic Patients

Septic patients that survived surgery had higher TREM-1 expression levels compared with healthy volunteers ($P < 0.01$) and with septic patients that did not survive ($P < 0.05$). However, 72 h after surgery, we found no significant difference in TREM-1 expression between septic patients and healthy volunteers (Fig. 3). Therefore, the sepsis-associated increase in TREM-1 expression is limited to a narrow window of time.

MHC-II Expression Is Decreased in Surgical and Septic Patients

It has been previously reported that the expression of MHC-II molecules decreases in the postoperative period, even in the absence of complications [24, 25].

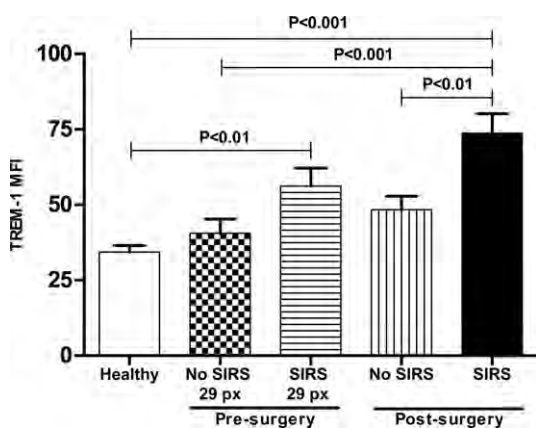


FIG. 2. TREM-1 expression is increased in surgical patients with SIRS. TREM-1 expression on blood monocytes of surgical patients ($n = 58$) is shown, in samples taken before (Pre-Surg) and after (Post-Surg) surgery. Patients were classified by the presence ($n = 29$) or absence ($n = 29$) of SIRS. TREM-1 expression on blood monocytes of healthy volunteers ($n = 50$) is also shown. Statistically significant differences are shown on the graphs. The TREM-1 data are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

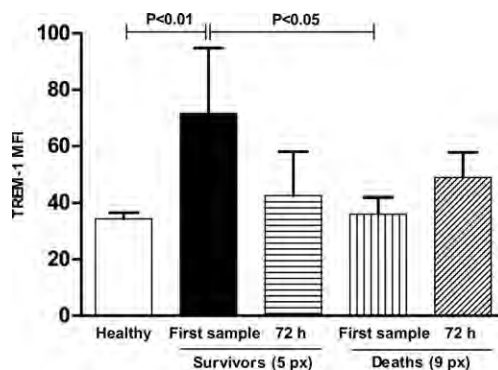


FIG. 3. TREM-1 expression is transiently increased in septic patients. TREM-1 expression on blood monocytes of septic patients ($n = 14$) is shown, in samples taken less than 72 h after the diagnosis of sepsis and 72 h later. Patients were classified as survivors ($n = 5$) or nonsurvivors ($n = 9$). TREM-1 expression on blood monocytes of healthy volunteers ($n = 50$) is also shown. Statistically significant differences are shown on the graphs. The TREM-1 data are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

We found that surgical patients with abdominal or gastrointestinal pathology had decreased MHC-II expression before the surgical procedure, compared with healthy volunteers ($P < 0.05$), and that the level of these molecules further decreased after surgery ($P < 0.01$) (Fig. 4A). Patients that were subjected to elective (programmed) surgery had higher levels of MHC-II than patients subjected to emergency surgery ($P < 0.05$) (Fig. 4B). The expression of MHC-II was reduced after surgery in all patients, and this reduction was greater in patients with complications ($P < 0.05$) (Fig. 4C). However, no difference was observed between survivors and nonsurvivors (Fig. 4D).

Decreased expression of MHC-II is known to be associated with sepsis; this is, in fact, one of the defining features of CARS. Accordingly, we found that MHC-II expression was decreased in our septic patients, and this decrease was greater in the patients that did not survive ($P < 0.001$) (Fig. 5).

DISCUSSION

The present study shows that TREM-1 expression on monocytes can increase even in the absence of infection. In our group of surgical patients, TREM-1 expression was significantly increased only in survivors, which had no signs of infection before or after the surgery. This fact caught our attention because, according to previous reports [19, 23], increased TREM-1 expression is associated with infection. It was even suggested that TREM-1 could be used as a biomarker for the early detection of a complication of infectious origin. However, we found no difference in the expression levels of TREM-1 between surgical patients that developed infection and surgical patients that did not develop infection. The presence of SIRS, on the other

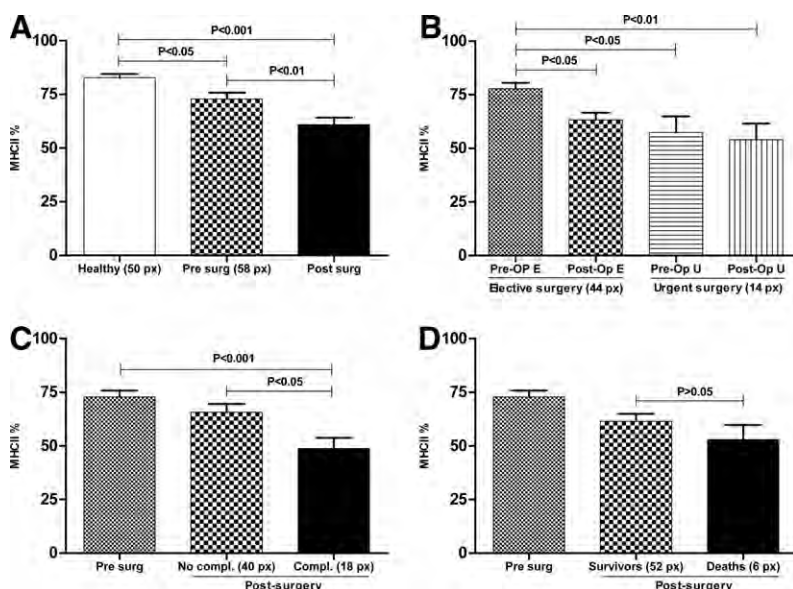


FIG. 4. MHC-II expression is decreased in surgical patients. MHC-II expression on blood monocytes of surgical patients ($n = 58$) is shown, in samples taken before (Pre-Surg) and after (Post-Surg) the surgery. MHC-II expression on blood monocytes of healthy volunteers ($n = 50$) is also shown (A). Patients were further classified by the kind of surgery (elective surgery, $n = 44$, or emergency surgery, $n = 14$) (B), by the presence ($n = 18$) or absence ($n = 40$) of complications (C), and by the outcome (survival, $n = 52$, or death, $n = 6$) (D). Statistically significant differences are shown on the graphs.

hand, was associated with higher levels of TREM-1 before and after surgery. This finding is not totally unexpected because TREM-1 amplifies the inflammatory response, and its ligand could be an endogenous molecule [14] released during cellular or tissue damage. These types of endogenous molecules have been termed alarmins, because they alert the organism to the presence of cellular or tissue damage and amplify the inflammatory response, and the abdominal or gastrointestinal pathology and the surgical procedure itself could cause the release of such alarmins [26].

We found a transitory increase in TREM-1 expression in surviving septic patients. In addition to the presence of infection, the systemic inflammatory re-

sponse as well as the surgery that was performed on these patients could have contributed to the increase in TREM-1 expression. However, TREM-1 levels were unable to discriminate between survivors and nonsurvivors. This is in accordance with a report [23] in which TREM-1 expression was analyzed in patients with septic shock and patients with shock of other etiologies. The authors found that TREM-1 expression on monocytes was higher in patients with septic shock than in patients with shock of other etiology, but they found no difference between TREM-1 expression (at the time of hospital admission) in patients that survived and in patients that did not survive. However, a difference was evident by the third determination, in which TREM-1 expression was lower in survivors [23, 27].

We noted a high variation in TREM-1 expression in the septic patients' first sample (Fig. 3), which could reflect the fact that this sample was taken at variable times after the diagnosis of sepsis (within the first 72 h). It is possible that the nonsurvivors presented an earlier increase in TREM-1 expression but, if this was the case, the magnitude and timing of their response was different from that of the survivors. The pattern of TREM-1 expression in septic patients deserves further study, because a transitory increase in TREM-1 levels could contribute to the patient's outcome.

The expression of MHC-II was decreased in surgical patients compared with healthy volunteers. As this could reflect the underlying pathology of the patients, we grouped them by the type of surgery (elective or programmed surgery *versus* emergency surgery). The

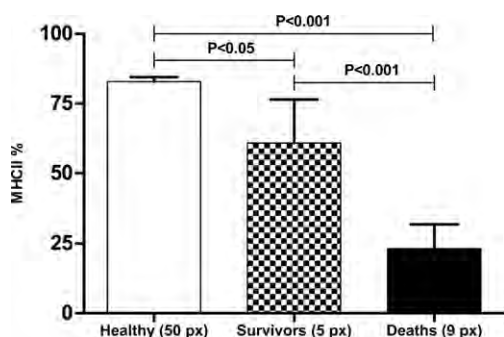


FIG. 5. MHC-II expression is decreased in septic patients. MHC-II expression on blood monocytes of septic patients ($n = 14$) is shown, in samples taken less than 72 h after the diagnosis of sepsis. MHC-II expression on blood monocytes of healthy volunteers ($n = 50$) is also shown. Statistically significant differences are shown on the graphs.

latter presumably reflects a more advanced pathology, and in fact, almost all of the emergency surgeries were performed on patients with SIRS. The expression of MHC-II was lower in patients that were subjected to emergency surgery than in patients that were subjected to elective surgery, and in both cases, the levels of these molecules decreased further after surgery. This indicates that the inflammatory mediators produced as a result of the surgical procedure can modulate the expression of MHC-II molecules.

Low expression of MHC-II was associated with the presence of complications in surgical patients, the majority of which were infections. Moreover, all septic patients had decreased MHC-II expression at the time of hospital admission, and this was more evident in the nonsurvivors. There have been some attempts to use the expression levels of MHC-II as a prognostic marker, but in patients with acute pancreatitis, a clear cutoff point could not be established until the 10th d of evolution [28], and in patients with cardiac surgery, no relationship was found between a decrease in MHC-II molecules and the presence of septic complications [29]. Our results suggest that low MHC-II levels could be associated with poor prognosis: death in septic patients and an increased likelihood of developing complications (mainly infections) in surgical patients. It would be desirable to obtain an MHC-II expression percentage cutoff point in patients with sepsis, as well as in surgical patients, that could help to predict their progress. The characterization of the behavior of inflammatory mediators during a patient's progress could ultimately lead to a better control of the diseases, with precisely timed, specific, and well-directed treatments [30, 31].

Here we showed that increased TREM-1 expression on monocytes is associated with both infectious and noninfectious processes, and that the level of expression of MHC-II molecules has a better correlation with the patients' outcome. Our results do not support the possible use of TREM-1 expression levels as a prognostic biomarker in surgical or septic patients, but the understanding of the behavior and function of this molecule during the inflammatory response merits further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was financially supported by Coordinación de Investigación en Salud, IMSS (Grant No. IMSS-2004/045) and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Grant No. SALUD 2005-01-13942). L Arriaga-Pizano acknowledges postdoctoral funding from CONACyT. I. Wong-Baeza and R. Aduna-Vicente received scholarships from CONACyT and IMSS, and N. Esquivel-Callejas received financial support from IMSS.

REFERENCES

- Nystrom PO. The systemic inflammatory response syndrome: Definitions and etiology. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl A):1.
- Angele MK, Faist E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002;6:298.
- Takahashi H, Tsuda Y, Kobayashi M, et al. CCL2 as a trigger of manifestations of compensatory anti-inflammatory response syndrome in mice with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Leukoc Biol* 2006;79:789.
- Volk HD. Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002;6:279.
- Wolk K, Kunz S, Crompton NE, et al. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2003;278:18030.
- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004;32:858.
- Marshall JC. Biomarkers of sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 2006; 8:351.
- Meisner M. Biomarkers of sepsis: Clinically useful? *Curr Opin Crit Care* 2005;11:473.
- Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 2000;164:4991.
- Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001;410:1103.
- Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, Aduna-Vicente R, et al. Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. *World J Gastroenterol* 2005;11:7473.
- Wang DY, Qin RY, Liu ZR, et al. Expression of TREM-1 mRNA in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:2744.
- Aoki N, Zganiacz A, Margetts P, et al. Differential regulation of DAP12 and molecules associated with DAP12 during host responses to mycobacterial infection. *Infect Immunol* 2004;72:2477.
- El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, et al. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett* 2007;111:36.
- Wong-Baeza I, Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients. *Clin Exp Immunol* 2006;145:448.
- Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* 2003;170:3812.
- Gibot S, Massin F, Le Renard P, et al. Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: Expression patterns in murine sepsis. *Crit Care Med* 2005;33:1787.
- Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, et al. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* 2004;200:1419.
- Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, et al. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: Its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med* 2004;141:9.
- Gibot S, Cravoisy A, Levy B, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med* 2004;350:451.
- Gibot S, Cravoisy A, Dupays R, et al. Combined measurement of procalcitonin and soluble TREM-1 in the diagnosis of nosocomial sepsis. *Scand J Infect Dis* 2007;39:604.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864.

23. Gibot S, Le Renard PE, Bollaert PE, et al. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock. *Intensive Care Med* 2005;31:594.
24. de Metz J, Romijn JA, Endert E, et al. Interferon-gamma increases monocyte HLA-DR expression without effects on glucose and fat metabolism in postoperative patients. *J Appl Physiol* 2004;96:597.
25. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, et al. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesth Analg* 2001;92:1322.
26. Bianchi ME. DAMPs PAM. Ps and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81:1.
27. Gibot S, Cravoisy A, Kolopp-Sarda MN, et al. Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Crit Care Med* 2005;33:792.
28. Ho YP, Sheen IS, Chiu CT, et al. A strong association between down-regulation of HLA-DR expression and the late mortality in patients with severe acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1117.
29. Oczenski W, Krenn H, Jilch R, et al. HLA-DR as a marker for increased risk for systemic inflammation and septic complications after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2003;29:1253.
30. Lendemans S, Kreuzfelder E, Waydhas C, et al. Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFNgamma) after severe trauma. *Inflamm Res* 2007;56:38.
31. Borgermann J, Friedrich I, Scheubel R, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) restores decreased monocyte HLA-DR expression after cardiopulmonary bypass. *Thorac Cardiovasc Surg* 2007;55:24.

10.1.2. Resumen del manuscrito publicado.

Título del manuscrito: La expresión de TREM-1 en monocitos se asocia con inflamación pero no con infección en la pancreatitis aguda (***Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on monocytes is associated with inflammation but not with infection in acute pancreatitis***). Publicado en *Crit Care* 2009.

Introducción.

La pancreatitis aguda (PA) generalmente es una enfermedad leve y autolimitada, pero algunos pacientes desarrollan la forma grave de la enfermedad que se asocia con elevada mortalidad. En la pancreatitis aguda, la inflamación local es seguida de inflamación sistémica manifestada en forma del SIRS y luego por el CARS, que se define este último por la baja expresión del antígeno leucocitario humano HLA-DR en monocitos, el incremento en las concentraciones de IL-10 y la disminución de la función monocítica. El objetivo de este estudio fue medir la expresión de TREM-1 (un marcador propuesto para la presencia de infecciones e inflamación) y las concentraciones de IL-10 en pacientes con PA, para determinar si estos marcadores pueden identificar pacientes con riesgo elevado de desarrollar la forma grave de la enfermedad o infecciones.

Métodos.

Cincuenta voluntarios sanos, 18 pacientes con PA leve y 11 pacientes con PA grave se incluyeron en el estudio. Las muestras se tomaron a su ingreso, uno y tres días después. La expresión de TREM-1 y HLA-DR se evaluó por citometría de

flujo, y las concentraciones de la forma soluble de TREM-1, IL-6 e IL-10, se determinaron por ELISA.

Resultados.

La expresión de TREM-1 fue mayor en pacientes con PA que en voluntarios sanos, pero no hubo diferencia entre pacientes con pancreatitis leve y grave. La expresión de TREM-1 no se asoció con mortalidad o con la presencia de infección. La concentración de la forma soluble de TREM-1 fue mayor en el suero de los que fallecieron de los que sobrevivieron. La expresión de HLA-DR fue menor y la concentración de IL-6 fue mayor en los pacientes con la forma grave de la pancreatitis y en aquellos pacientes que desarrollaron infección.

Conclusión.

El incremento en la expresión de TREM-1 se asocia con un proceso inflamatorio pero no con el desarrollo de infección en pacientes con PA. En estos pacientes, la disminución en la expresión de HLA-DR y el incremento de la concentración de IL-6 pueden predecir la severidad de la enfermedad y el desarrollo de infecciones, si se determinan en forma temprana.

Research

Open Access

Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on monocytes is associated with inflammation but not with infection in acute pancreatitis

Eduardo Ferat-Osorio^{1,2,3*}, Isabel Wong-Baeza^{1,4*}, Noemí Esquivel-Callejas¹, Silvia Figueroa-Figueroa⁵, Andrés Duarte-Rojo⁶, Gilberto Guzmán-Valdivia-Gómez⁷, Heriberto Rodea-Rosas⁵, Rubén Torres-González⁸, Patricio Sánchez-Fernández², Lourdes Arriaga-Pizano¹, Constantino López-Macias¹, Guillermo Robles-Díaz⁹ and Armando Isibasi¹

¹Medical Research Unit on Immunochemistry, Specialties Hospital. National Medical Centre "Siglo XXI". Mexican Institute for Social Security (IMSS), Mexico City, Mexico

²Gastrointestinal Surgery Department, Specialties Hospital. National Medical Centre "Siglo XXI". Mexican Institute for Social Security (IMSS), Mexico City, Mexico

³PhD Program on Biomedical Sciences, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

⁴Immunology Department, National School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico

⁵General Surgery Department, General Hospital of Mexico, Mexico City, Mexico

⁶Pancreatic Unit, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico

⁷General Surgery Department, Regional General Hospital "Carlos MacGregor Sánchez Navarro", IMSS, Mexico City, Mexico

⁸Medical Unit of High Specialization (UMAE), "Dr. Victorio de la Fuente Narváez", IMSS, Mexico City, Mexico

⁹Liver, Pancreas and Motility Laboratory (HIPAM), Experimental Medicine Department, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

* Contributed equally

Corresponding author: Armando Isibasi, isibasi@prodigy.net.mx

Received: 18 Mar 2009 Revisions requested: 15 Apr 2009 Revisions received: 5 May 2009 Accepted: 14 May 2009 Published: 14 May 2009

Critical Care 2009, **13**:R69 (doi:10.1186/cc7876)

This article is online at: <http://ccforum.com/content/13/3/R69>

© 2009 Ferat-Osorio *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Introduction Acute pancreatitis (AP) is usually a mild and self-limiting disease, but some patients develop a severe form that is associated with high mortality. In AP, local inflammation is followed first by the systemic inflammatory response syndrome and then by the compensatory anti-inflammatory response syndrome, which is defined by low human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on monocytes, increased concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10, and decreased monocyte function. Our aim was to measure the expression of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 (a proposed marker of infection or inflammation) and HLA-DR on monocytes, and the serum concentrations of IL-6 (a proinflammatory cytokine) and IL-10 in patients with AP to determine whether these markers can identify patients at high risk of developing severe AP or infection.

Methods Fifty healthy volunteers, 18 patients with mild AP, and 11 patients with severe AP were included in this study. Samples were taken at admission and one and three days later. TREM-1 and HLA-DR expression was evaluated by flow cytometry, and soluble TREM-1, IL-6 and IL-10 concentrations were measured by ELISA.

Results TREM-1 expression was higher in patients with AP than in healthy volunteers, but there was no difference between patients with mild and severe AP. TREM-1 expression was not associated with mortality or with the presence of infection. Soluble TREM-1 concentration in serum was higher in non-survivors than in survivors. HLA-DR expression was lower and IL-6 concentration higher in patients with severe AP and in infected patients.

AP: acute pancreatitis; APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation; CARS: compensatory anti-inflammatory response syndrome; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FITC: fluorescein isothiocyanate; HLA: human leukocyte antigen; IL: interleukin; MFI: mean fluorescence intensity; PAMP: pathogen-associated molecular patterns; PE: phycoerythrin; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; TNF: tumor necrosis factor; TREM-1: triggering receptor expressed on myeloid cells-1.

Conclusions Increased TREM-1 expression was associated with the presence of inflammation but not infection in AP. In patients with AP, low HLA-DR expression and high IL-6

concentration could predict severity and infection in samples taken shortly after admission.

Introduction

Inflammation is essential for survival, but it can also be an important cause of morbidity and mortality. One example of the deleterious effects of inflammation is acute pancreatitis (AP). Although AP is usually a mild and self-limiting disease, 20% to 31% of affected patients develop severe disease, and mortality rates can reach 25% in cases of infected pancreatic necrosis [1,2]. Intrapancreatic activation of digestive enzymes causes local tissue damage and the release of proinflammatory mediators by resident macrophages and acinar cells [3]. Proinflammatory cytokines are produced initially in the pancreas, and later in the liver, lungs, and spleen. The mechanism causing this secondary cytokine production is unknown [4]. The systemic release of proinflammatory mediators in AP causes a generalized inflammatory response in sites remote from the initial injury site and gives rise to the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [5,6].

Patients who progress to severe AP have a high mortality rate during their first week of evolution due to multiple organ failure. Those who survive frequently develop extensive necrosis of pancreatic and peripancreatic tissues [7], and 30% to 70% of the latter become infected. In these infected patients, multiple organ failure and death can ensue [8,9].

Infecting microorganisms contain pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are recognized by the innate immune system and increase the production of adhesion molecules, proinflammatory cytokines, acute-phase proteins, nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and triggering receptors expressed on myeloid cells-1 (TREM-1), among others [10]. TREM-1 is expressed on neutrophils and monocytes, and signaling through TREM-1 induces the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines, and the expression of costimulatory molecules [11]. This secondary inflammatory response, or 'second-hit' response, can lead to tissue damage and can orchestrate organ failure after the first week of AP [12].

To restore homeostasis, the proinflammatory response is compensated by anti-inflammatory mediators such as IL-10 and soluble receptors that suppress the synthesis or the effects of proinflammatory cytokines [13]. During SIRS, an anti-inflammatory response can develop, leading to what Bone [6] defined as the compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS). SIRS is defined by clinical parameters [5], while CARS is defined on molecular grounds by low levels of major histocompatibility class II human leukocyte antigen (HLA)-DR molecules on blood monocytes and by low produc-

tion of TNF- α when monocytes are challenged with PAMPs *ex vivo* [14].

TREM-1 was initially proposed as an early marker of infection because its expression is high in peritoneal neutrophils of septic shock patients [11]; a soluble form of TREM-1 is present in high concentrations in bronchoalveolar lavage of patients with pneumonia [15]; and soluble TREM-1 concentration is high in the serum of septic patients [16]. However, other studies have reported that TREM-1 expression increases in noninfectious pathologies [17,18], and our previous results have shown that the expression of this molecule increases after surgery, particularly in patients with preexisting SIRS, but without infection [19]. In patients with AP, high levels of TREM-1 mRNA correlate with increased severity of the disease [20]. Cytokine analysis in patients with AP has attempted to establish markers of severity (IL-6 or IL-8) or markers of progression (TNF- α or IL-1 β) [21,22].

The aim of our present study was to measure the levels of TREM-1 and HLA-DR on monocytes, and the serum concentrations of IL-6 and IL-10 in patients with AP, and to determine whether these markers can be used for early identification of patients at high risk of developing severe AP or infection.

Materials and methods

Patients and controls

Twenty-nine patients from four hospitals (two general and two referral hospitals) were included in this study, which was approved on 13 September, 2006, by the Ethics and Research Committee from each hospital and by the National Committee for Scientific Research (No. 2006-785-080). The patients or their legal representatives received detailed information about this protocol, and, if they chose to participate, signed an informed consent form.

All patients between 18 and 80 years with confirmed AP were suitable to enter the study. AP diagnosis was based on the presence of typical clinical symptoms and at least a threefold increase in serum amylase or lipase concentration, and was classified as mild or severe according to the Atlanta Criteria [2,23]. Patients with more than 72 hours of evolution or patients who had an exploratory laparotomy performed within this time of evolution were not included. Other noninclusion criteria were pregnancy; treatment with immune suppressors or chemotherapy; HIV, hepatitis B virus or hepatitis C virus infection; or the presence of neoplastic or autoimmune diseases. A group of 50 healthy volunteers (blood bank donors) was also included in this study for comparison purposes.

Blood samples

In patients with AP, blood samples were drawn within 24 hours of admission (day 0), and one and three days later. One sample was collected in an anticoagulant-free tube and another in a lithium heparin-containing tube (4 ml each). In healthy volunteers, the same samples were obtained on a single occasion. Anticoagulant-free blood samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes, and the serum was removed, and stored in aliquotes at -70°C until cytokine quantification. The lithium heparin blood samples were processed immediately for flow cytometry.

Antibodies

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD14 monoclonal antibody and phycoerythrin (PE)-cyanine dye Cy5-labeled anti-HLA-DR monoclonal antibody were purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, USA; clone L243, mouse IgG_{2a}, κ; and clone M5E2, mouse IgG_{2a}, κ; respectively). PE-labeled anti-TREM-1 monoclonal antibody was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; clone 193015, mouse IgG1). This combination of fluorochromes allowed us to perform triple staining on each sample to measure TREM-1 and HLA-DR expression on CD14^{high} cells. In monocytes from healthy volunteers, 83.31% ± 11.27% of these cells expressed MHC-II, and the mean fluorescence intensity (MFI) of TREM-1 was 343.5 ± 155. PE-labeled mouse IgG1 and FITC-labeled mouse IgG2a were used as isotype-matched controls.

Flow cytometry

In a polystyrene tube (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 50 μl of heparinized whole blood was mixed with 3 μl each of anti-CD14, anti-HLA-DR, and anti-TREM-1 antibodies, or the appropriate isotype controls, and incubated for 20 minutes at 4°C. Then, 250 μl of BD FACS lysing solution 1× (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was added, the cells were incubated for 10 minutes, and the stained cells were washed, resuspended, and analyzed for three-color immunofluorescence by flow cytometry (FACS Aria, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells with CD14^{high} expression were selected from a side scatter vs CD14/FITC dot plot. From this gated region, cells expressing TREM-1/PE or HLA-DR/PerCPCy5 were selected, using isotype controls as reference, and MFI or percentage values of the selected cells were taken. At least 5000 events in the CD14^{high} region were analyzed. Data analysis was performed using FACS Diva software version 4.1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Soluble TREM-1 and cytokine quantification

The concentration of soluble TREM-1 was measured in previously aliquoted serum samples using an ELISA kit (R&D Systems Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's protocol. The concentrations of IL-6 and IL-10 were measured in previously aliquoted serum samples using ELISA kits (BD

Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA), according to the manufacturers' protocols.

Statistical analysis

Data are represented on box and whiskers graphs, which depict median and 5% to 95% percentiles. Data were analyzed by Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* test using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Demographic data of patients and controls

Twenty-nine patients with AP were included in this study. Their average age was 43 years (range, 17 to 79 years); 18 were women and 11 were men. Twenty-two patients had AP of biliary origin (75%), one patient had AP caused by alcohol consumption (4%), one patient had AP caused by hypertriglyceridemia (4%), and five patients had idiopathic AP (17%). Eighteen patients had mild AP (62%), and 11 patients had severe AP (38%). One patient with mild AP was discharged from the hospital due to complete resolution of AP before the third blood sample was taken.

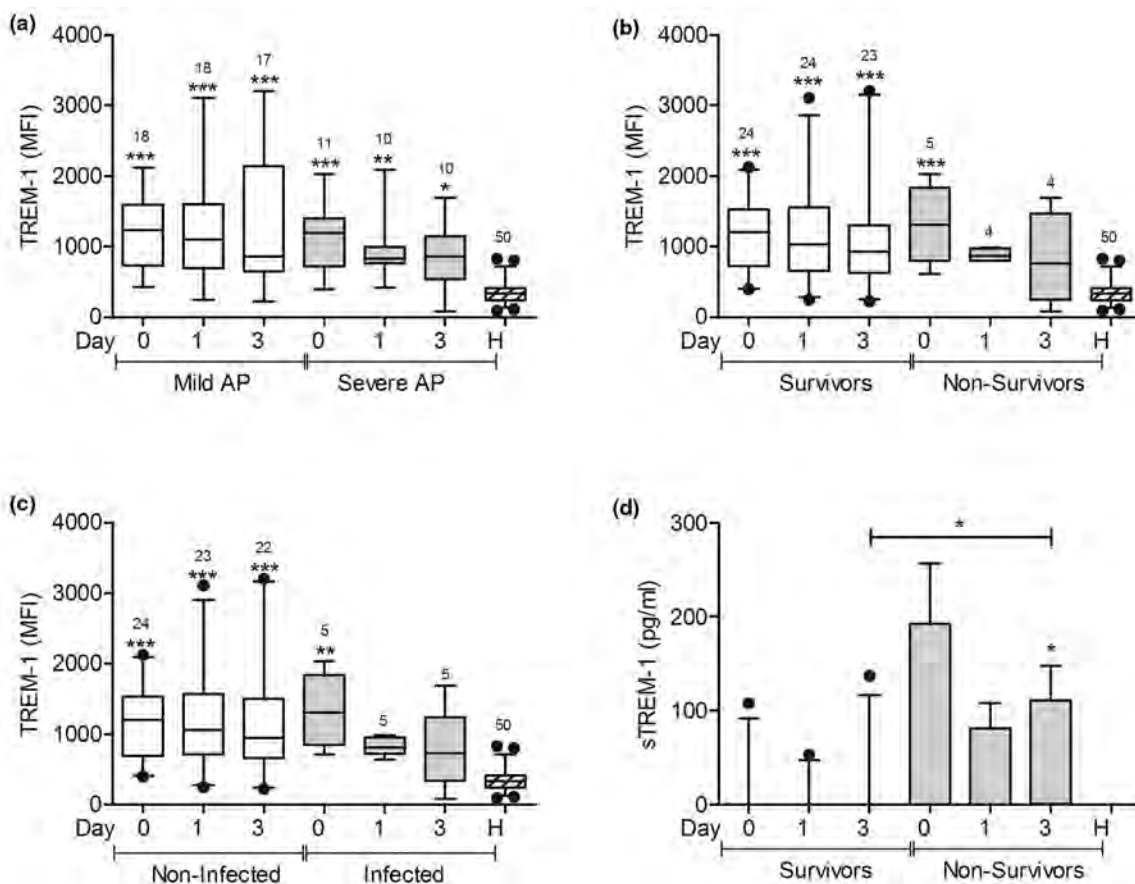
Five patients with severe AP died; one patient developed respiratory insufficiency and died two days after admission to the hospital; this patient died before the second blood sample had been collected. The other four patients with severe AP that died developed infections. One patient had pancreatic abscess caused by *Enterococcus faecalis* (diagnosed on day 23, deceased on day 41). Another patient with AP from biliary origin developed acute cholecystitis complicated with emphysematous cholecystitis 2 days after the onset of AP, and during the emergency laparotomy, purulent material was found in abdominal cavity and pancreas inflammation was confirmed (deceased on day 7). Two patients developed pneumonia; one patient with *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* in bronchoalveolar lavages (diagnosed on day 7, deceased on day 20), and the other with clinical and radiological diagnosis (diagnosed on day 4, deceased on day 5). A fifth patient with severe AP developed urinary infection with *Pseudomonas aeruginosa* (diagnosed on day 18). So, one severe AP patient developed infection during the period in which the blood samples were being collected (days 0 to 3), and four patients with severe AP developed infection after this period.

Fifty healthy volunteers (blood bank donors) were also included in this study; their average age was 34 years (range, 19 to 53 years); 11 were women and 39 were men.

TREM-1 expression is higher in patients with AP, but this increase is not associated with mortality or with the presence of infection

TREM-1 expression was significantly higher in all patients than in healthy volunteers at each of the three times (Figure 1a). However, the expression levels of TREM-1 did not differ

Figure 1



TREM-1 expression was higher in patients with AP, but this increase was not associated with mortality, or with the presence of infection. **(a)** Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) expression was measured on blood monocytes from patients with mild acute pancreatitis (AP; n = 18), patients with severe AP (n = 11), and healthy volunteers (n = 50). Samples were taken from patients on admission (day 0) and one and three days later. One patient with mild AP was discharged from the hospital before the third blood sample was taken, and one patient with severe AP died after the first blood sample was collected. **(b)** Patients with AP were grouped according to survival (24 of these patients survived and 5 died). **(c)** Patients with AP were grouped according to the presence of infection (5 of the 29 patients developed infection). **(d)** Soluble TREM-1 expression was measured in the serum of patients with AP, which were grouped according to survival. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; the signs over each bar represent comparisons vs. healthy volunteers (H). MFI = mean fluorescence intensity.

between patients with mild and severe AP (Figure 1a), between survivors and non-survivors (Figure 1b), or between infected and non-infected patients (Figure 1c). Non-survivors had higher soluble TREM-1 concentrations in serum than survivors on day 3 (Figure 1d). The concentrations of soluble TREM-1 did not differ between patients with mild and severe AP or between infected and non-infected patients with AP (not shown).

HLA-DR expression is lower in patients with severe AP and in infected patients

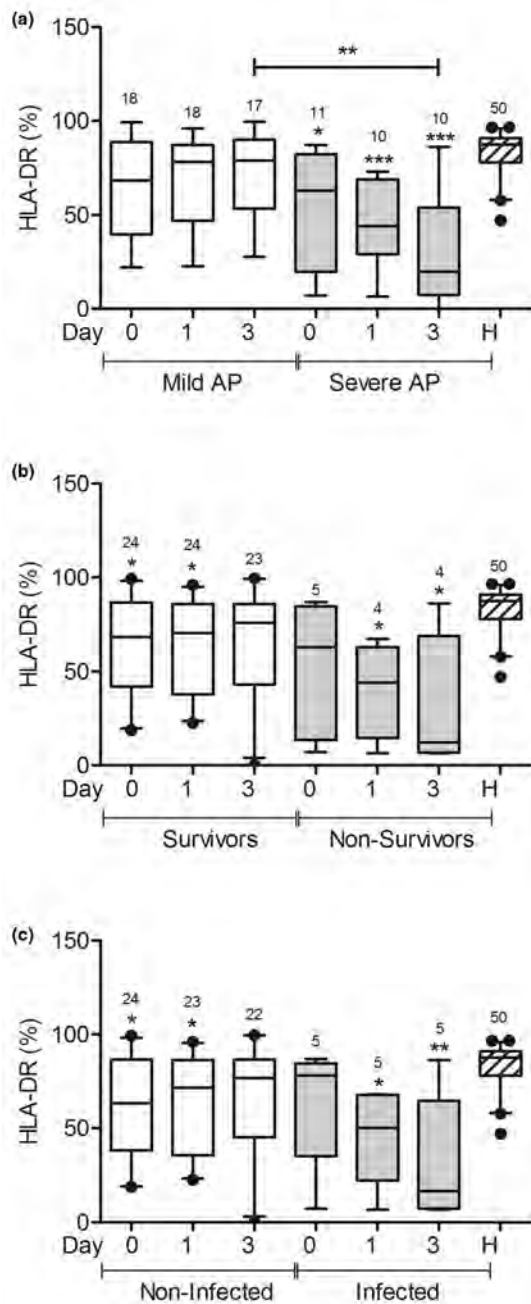
HLA-DR expression was lower in patients with severe AP than in healthy volunteers at all times, and HLA-DR expression was lower in patients with severe AP than in patients with mild AP three days after admission (Figure 2a). The expression of HLA-DR was lower in non-survivors than in healthy volunteers on days 1 and 3 (Figure 2b). The expression of HLA-DR was also

significantly lower in infected patients three days after admission than in healthy volunteers (Figure 2c).

IL-6 and IL-10 concentrations were higher in patients with severe AP and in infected patients

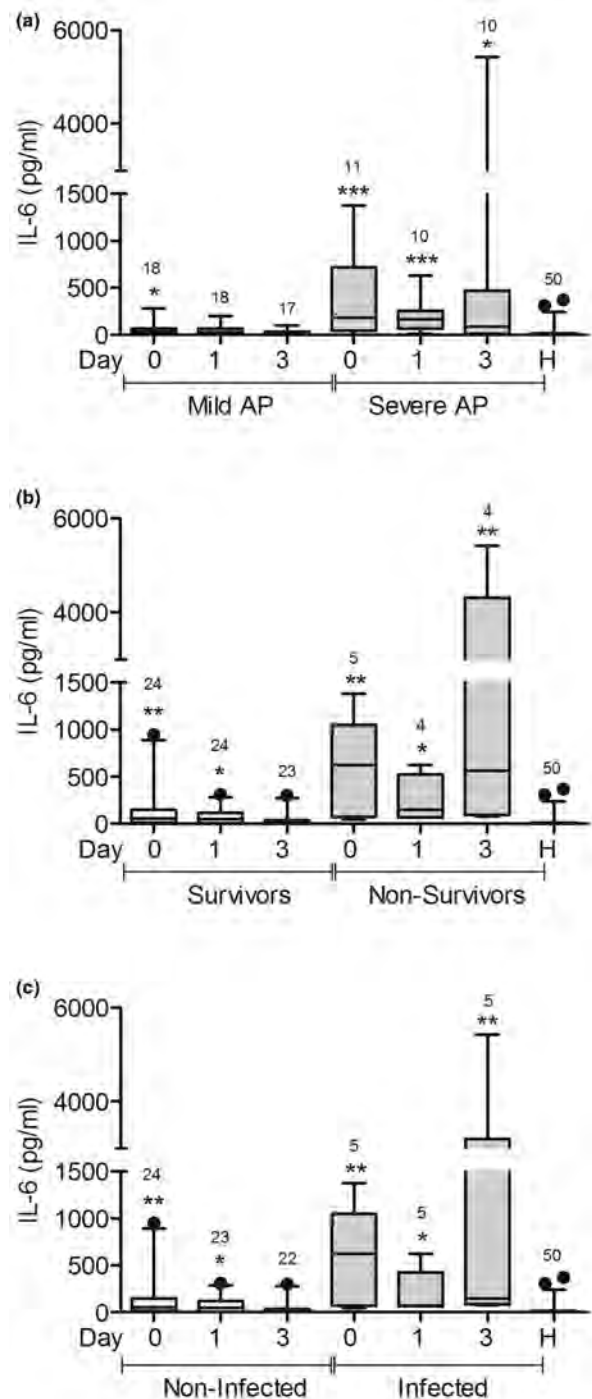
Serum IL-6 and IL-10 concentrations were significantly higher in patients with AP at admission than in healthy volunteers (Figures 3a and 4a). However, the cytokine concentrations declined in patients with mild AP, but remained high in patients with severe AP three days after admission (Figures 3a and 4a). IL-6 concentration was higher in non-survivors than in healthy volunteers three days after admission (Figure 3b), but no difference was observed in IL-10 concentrations at this point (Figure 4b). Both cytokines were increased at admission in uninfected patients but declined three days later (Figures 3c and 4c). In contrast, in infected patients, IL-6 and IL-10 con-

Figure 2



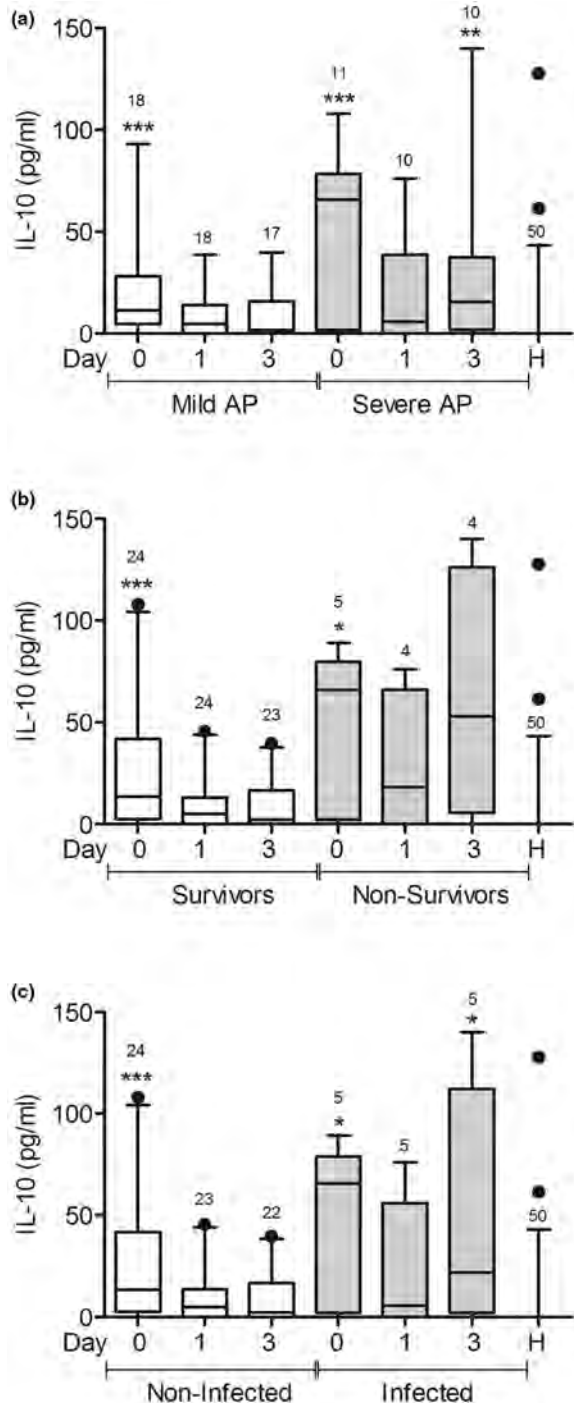
HLA-DR expression was lower in patients with severe AP and in infected patients (a) Human leukocyte antigen (HLA)-DR expression was measured on blood monocytes from patients with mild acute pancreatitis (AP; n = 18), patients with severe AP (n = 11), and healthy volunteers (n = 50). Samples were taken from patients on admission (day 0) and one and three days later. One patient with mild AP was discharged from the hospital before the third blood sample was taken, and one patient with severe AP died after the first blood sample was collected. (b) Patients with AP were grouped according to survival (24 of these patients survived and 5 died). (c) Patients with AP were grouped according to the presence of infection (five of the 29 patients developed infection). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; the signs over each bar represent comparisons vs. healthy volunteers (H).

Figure 3



IL-6 concentration was higher in patients with severe AP and in infected patients. IL-6 concentration was measured in serum from patients with mild acute pancreatitis (AP; n = 18), patients with severe AP (n = 11), and healthy volunteers (n = 36). Samples were taken from patients on admission (day 0) and one and three days later. (a) Patients with mild and severe AP, (b) survivors and non-survivors, and (c) infected and non-infected patients are shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; the signs over each bar represent comparisons vs. healthy volunteers (H).

Figure 4



IL-10 concentration was higher in patients with severe AP and in infected patients. IL-10 concentration was measured in serum from patients with mild acute pancreatitis (AP; n = 18), patients with severe AP (n = 11), and healthy volunteers (n = 19). Samples were taken from patients on admission (day 0) and one and three days later. (a) Patients with mild and severe AP, (b) survivors and non-survivors, and (c) infected and non-infected patients are shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; the signs over each bar represent comparisons vs. healthy volunteers (H).

concentrations were higher than in healthy volunteers at admission and three days later (Figures 3c and 4c).

Discussion

One of the most serious complications of AP is the development of infection. The aim of this study was to measure the levels of TREM-1 and HLA-DR on monocytes and the serum concentrations of IL-6 and IL-10 in patients with AP to determine whether these markers, alone or in combination, can be used in the early identification of patients at high risk of developing severe AP or infection. Our results suggest that TREM-1 expression increases in the presence of inflammation because it was higher in all patients with AP, regardless of the presence of infection. These results support our previous study showing that TREM-1 expression increases after surgery, particularly in patients with preexisting SIRS, but does not correlate with the presence of infection [19]. TREM-1 may be involved in the amplification of the inflammatory response in AP, and its ligand could be an endogenous molecule released during cellular damage associated with AP [24]. Wang and colleagues found higher levels of TREM-1 mRNA in patients with severe AP than in patients with mild AP and healthy volunteers [20]. This seems in contrast to our results, but we measured protein levels and not mRNA, and mRNA levels do not necessarily correlate with protein levels.

TREM-1 can be shed from the surface of monocytes by matrix metalloproteinases [25], and these enzymes are increased in serum in animal models of severe AP [26,27] and in patients with severe AP [28,29]. We found higher TREM-1 expression on monocytes from patients with AP, compared with monocytes from healthy volunteers, but the levels did not differ between patients with mild and severe AP. Perhaps the metalloproteinases found in the serum of patients with severe AP prevented a further increase on TREM-1 expression, but we did not find differences in the concentrations of soluble TREM-1 in serum between patients with mild and severe AP. However, we found that soluble TREM-1 concentration in serum was higher in non-survivors than in survivors. This is in accordance with the study by Yasuda and colleagues, who reported that an increase in the serum concentration of soluble TREM-1, in samples taken within the first 72 hours after the onset of AP, correlated with Ranson score and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II score, and that soluble TREM-1 concentration was higher in patients with early organ dysfunction [30], who have a higher risk of death.

Decreased levels of HLA-DR on blood monocytes and monocyte hyporesponsiveness to PAMPs are suggested as possible causes of the increased predisposition to infection observed in critically ill patients. Satoh and colleagues measured HLA-DR levels on blood monocytes at admission and 7 and 14 days after the onset of AP and found that a persistent decrease in HLA-DR level was associated with the presence of sepsis in later stages of the disease [31]. Mentula and col-

leagues reported that patients with AP and secondary infections had lower HLA-DR levels on days 14 and 21 of evolution than did healthy volunteers [32]. We measured HLA-DR expression in patients with AP at earlier times and found lower HLA-DR levels in patients with severe AP than in healthy volunteers and patients with mild AP. We also found significantly lower HLA-DR levels in infected patients three days after admission. Our results suggest that the early measurement of HLA-DR level might be useful for identifying patients with AP who are likely to develop a severe form of the disease and who are at high risk of infection.

Ho and colleagues found that HLA-DR expression on less than 52.3% of monocytes on the 10th day after admission correlated with late mortality in patients with severe AP [33]. Our results show that HLA-DR expression at early times does not correlate with patient survival. Mentula and colleagues report that low HLA-DR levels at admission correlate with the development of organ dysfunction in patients with AP [34] but that HLA-DR levels do not differ between survivors and nonsurvivors [32]. Mentula and colleagues also report that organ failure in patients with severe AP could be predicted at admission by a combination of high IL-6 and IL-10 concentrations [32]. In this study, we found persistently high serum concentrations of IL-6 and IL-10 in patients with severe AP and in patients who developed infection, but not in patients with mild AP or uninfected patients.

Our results show that patients with severe AP had low HLA-DR expression on monocytes and high serum IL-10 concentration since the beginning of their disease, which suggest that they presented CARS and could have increased susceptibility to infection. These also suggest that in severe AP, a disease whose early state is a proinflammatory response, an anti-inflammatory response (CARS) develops simultaneously and probably increases the susceptibility to infection.

Conclusions

Membrane-bound TREM-1 is not useful for differentiating mild and severe forms of AP, or for differentiating infected from non-infected patients with AP, but an increase in TREM-1 expression is associated with the inflammatory process in these patients. Non-survivors had higher soluble TREM-1 concentrations in serum than survivors. In patients with severe AP and in those patients with AP who developed infection, we observed low HLA-DR expression on monocytes and high serum IL-6 concentrations in samples taken at admission and one and three days later. We propose that this pattern could be used to predict the development of severe AP and infection, although further studies are required to confirm this prediction and to determine the appropriate cutoff values. The measurement of HLA-DR expression by flow cytometry is simple and inexpensive, and could be implemented in clinical practice.

Key messages

- Increased TREM-1 expression on blood monocytes is an indicator of inflammation but not of infection in patients with AP.
- Low HLA-DR expression and high IL-6 concentration could predict severity and infection in samples taken shortly after admission.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EFO, GRD, and AI conceived of the project. SFF, ADR, GGVG, HRR, and PSF obtained blood samples from patients and followed their clinical evolution. IWB, NEC, and LAP processed the samples. EFO, IWB, RTG, CLM, and AI analyzed the results and wrote the paper.

Acknowledgements

This study was supported financially by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (grant no. SALUD-2005-01-13942 to A. Isibasi and SALUD-2004-01-132 to C. López-Macias). E. Ferat-Osorio and I. Wong-Baeza received scholarships from CONACyT and I. Wong-Baeza and N. Esquivel-Callejas from IMSS.

References

1. Mery CM, Rubio V, Duarte-Rojo A, Suazo-Barahona J, Pelaez-Luna M, Milke P, Robles-Diaz G: **Android fat distribution as predictor of severity in acute pancreatitis.** *Pancreatology* 2002, **2**:543-549.
2. Swaroop VS, Chari ST, Clain JE: **Severe acute pancreatitis.** *JAMA* 2004, **291**:2865-2868.
3. Karne S, Gorelick FS: **Etiopathogenesis of acute pancreatitis.** *Surg Clin North Am* 1999, **79**:699-710.
4. Norman J: **The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis.** *Am J Surg* 1998, **175**:76-83.
5. **American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.** *Crit Care Med* 1992, **20**:864-874.
6. Bone RC: **Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.** *Crit Care Med* 1996, **24**:1125-1128.
7. Sakorafas GH, Tsiotos GG, Sarr MG: **Extrapancreatic necrotizing pancreatitis with viable pancreas: a previously underappreciated entity.** *J Am Coll Surg* 1999, **188**:643-648.
8. Bhatia M, Brady M, Shokuchi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J: **Inflammatory mediators in acute pancreatitis.** *J Pathol* 2000, **190**:117-125.
9. Isenmann R, Beger HG: **Natural history of acute pancreatitis and the role of infection.** *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999, **13**:291-301.
10. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S: **Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections.** *Cell Host Microbe* 2008, **3**:352-363.
11. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M: **TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock.** *Nature* 2001, **410**:1103-1107.
12. Murphy TJ, Paterson HM, Kryinovich S, Zang Y, Kurt-Jones EA, Mannick JA, Lederer JA: **Linking the "two-hit" response following injury to enhanced TLR4 reactivity.** *J Leukoc Biol* 2005, **77**:16-23.
13. Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K: **The molecular pathogenesis of endotoxin shock and organ failure.** *Mol Med Today* 1999, **5**:123-132.
14. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W: **Monocyte deactivation in septic patients:**

- restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997, **3**:678-681.
15. Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE: **Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia.** *N Engl J Med* 2004, **350**:451-458.
 16. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Cravoisy A, Levy B, Faure GC, Bollaert PE: **Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis.** *Ann Intern Med* 2004, **141**:9-15.
 17. Adib-Conquy M, Monchi M, Goulenok C, Laurent I, Thuong M, Cavaillon JM, Adrie C: **Increased plasma levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 and procalcitonin after cardiac surgery and cardiac arrest without infection.** *Shock* 2007, **28**:406-410.
 18. Radsak MP, Taube C, Haselmayer P, Tenzer S, Salih HR, Wiewrodt R, Buhl R, Schild H: **Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Dev Immunol* 2007, **2007**:52040.
 19. Ferat-Osorio E, Esquivel-Callejas N, Wong-Baeza I, Aduna-Vicente R, Arriaga-Pizano L, Sánchez-Fernández P, Torres-González R, López-Macias C, Isibasi A: **The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes.** *J Surg Res* 2008, **150**:110-117.
 20. Wang DY, Qin RY, Liu ZR, Gupta MK, Chang Q: **Expression of TREM-1 mRNA in acute pancreatitis.** *World J Gastroenterol* 2004, **10**:2744-2746.
 21. Bruno MJ: **Current insights into the pathogenesis of acute and chronic pancreatitis.** *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001:103-108.
 22. Norman JG: **New approaches to acute pancreatitis: role of inflammatory mediators.** *Digestion* 1999, **60**(Suppl 1):57-60.
 23. Bradley EL III: **A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992.** *Arch Surg* 1993, **128**:586-590.
 24. Wong-Baeza I, Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, Esquivel-Callejas N, Aduna-Vicente R, Arriaga-Pizano L, Studillo-de I V, Villasis-Keever MA, Torres-Gonzalez R, Estrada-Garcia I, Lopez-Macias C, Isibasi A: **Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients.** *Clin Exp Immunol* 2006, **145**:448-455.
 25. Gomez-Pina V, Soares-Schanoski A, Rodriguez-Rojas A, Del Fresno C, Garcia F, Vallejo-Cremades MT, Fernandez-Ruiz I, Arnalich F, Fuentes-Prior P, Lopez-Collazo E: **Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes.** *J Immunol* 2007, **179**:4065-4073.
 26. Keck T, Jargon D, Klunsch A, Thomusch O, Richter S, Friebe V, Adam U, Hopt UT: **MMP-9 in serum correlates with the development of pulmonary complications in experimental acute pancreatitis.** *Pancreatology* 2006, **6**:316-322.
 27. Muhs BE, Patel S, Yee H, Marcus S, Shamamian P: **Inhibition of matrix metalloproteinases reduces local and distant organ injury following experimental acute pancreatitis.** *J Surg Res* 2003, **109**:110-117.
 28. Chen P, Yuan Y, Wang S, Zhan L, Xu J: **Serum matrix metalloproteinase 9 as a marker for the assessment of severe acute pancreatitis.** *Tohoku J Exp Med* 2006, **208**:261-266.
 29. Nakae H, Endo S, Inoue Y, Fujino Y, Wakabayashi G, Inada K, Sato S: **Matrix metalloproteinase-1 and cytokines in patients with acute pancreatitis.** *Pancreas* 2003, **26**:134-138.
 30. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzaki M, Sawa H, Takahiro N, Kamei K, Ku Y, Kuroda Y, Ohyanagi H: **Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in patients with acute pancreatitis.** *Crit Care Med* 2008, **36**:2048-2053.
 31. Satoh A, Miura T, Satoh K, Masamune A, Yamagiwa T, Sakai Y, Shibuya K, Takeda K, Kaku M, Shimosegawa T: **Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis.** *Pancreas* 2002, **25**:245-250.
 32. Mentula P, Kylanpaa ML, Kempainen E, Jansson SE, Sarna S, Puolakkainen P, Haapiainen R, Repo H: **Plasma anti-inflammatory cytokines and monocyte human leucocyte antigen-DR expression in patients with acute pancreatitis.** *Scand J Gastroenterol* 2004, **39**:178-187.
 33. Ho YP, Sheen IS, Chiu CT, Wu CS, Lin CY: **A strong association between down-regulation of HLA-DR expression and the late mortality in patients with severe acute pancreatitis.** *Am J Gastroenterol* 2006, **101**:1117-1124.
 34. Mentula P, Kylanpaa-Back ML, Kempainen E, Takala A, Jansson SE, Kautiainen H, Puolakkainen P, Haapiainen R, Repo H: **Decreased HLA (human leucocyte antigen)-DR expression on peripheral blood monocytes predicts the development of organ failure in patients with acute pancreatitis.** *Clin Sci (Lond)* 2003, **105**:409-417.

10.2. Segunda sección. Evaluación de la expresión de TREM-1 en células humanas CD14+, tratadas con LPS y/o Hsp70.

TREM-1 es un receptor que contribuye a la amplificación de la respuesta inflamatoria a través de la producción de mediadores inflamatorios del tipo de las citocinas pro-inflamatorias. TREM-1 aumenta su expresión durante el estrés, como el que se encuentra en los procedimientos quirúrgicos o las infecciones, condiciones que involucran una respuesta inflamatoria y la presencia de daño tisular. Ambas situaciones favorecen la producción y liberación de Hsp70 al medio extracelular, contribuyendo con la amplificación de la respuesta inflamatoria.

En este trabajo se evaluó la capacidad de Hsp70 para regular la expresión de TREM-1 de monocitos humanos. La estimulación de células de sangre total de donadores sanos con LPS (10 ng/ml), durante 24 horas, incrementó la expresión de TREM-1 con respecto a las células sin estímulo, e independientemente de la presencia simultánea de Hsp70 (3µg/ml) ($P < 0.05$) (Figura 10A).

Se realizaron nuevos experimentos con dos nuevas condiciones. También se estimularon células de sangre total de donadores sanos por 24 horas con LPS y Hsp70. Las nuevas condiciones fueron: 1) tratamiento de células con LPS durante 8 horas y posteriormente se agregó Hsp70 por 16 horas; 2) tratamiento de células con Hsp70 por ocho horas y posteriormente se añadió LPS por 16 horas. Se despegaron las células y se tiñeron para analizar por citometría de flujo la expresión de TREM-1. El LPS incrementó la expresión de TREM-1 solo y en los casos en los que se agregó Hsp70 a las células que comenzaron la estimulación

con LPS, SE vs. LPS ($P<0.01$) y SE vs. LPS/Hsp70 ($P<0.01$), respectivamente; también se encontró diferencia en la expresión de TREM-1 para las células tratadas con LPS solo o para las células tratadas con LPS a las que se les agrega posteriormente Hsp70, con respecto a las tratadas con Hsp70, LPS vs. LPS + Hsp70 ($P<0.05$) y LPS vs. Hsp70 (Fig. 10B).

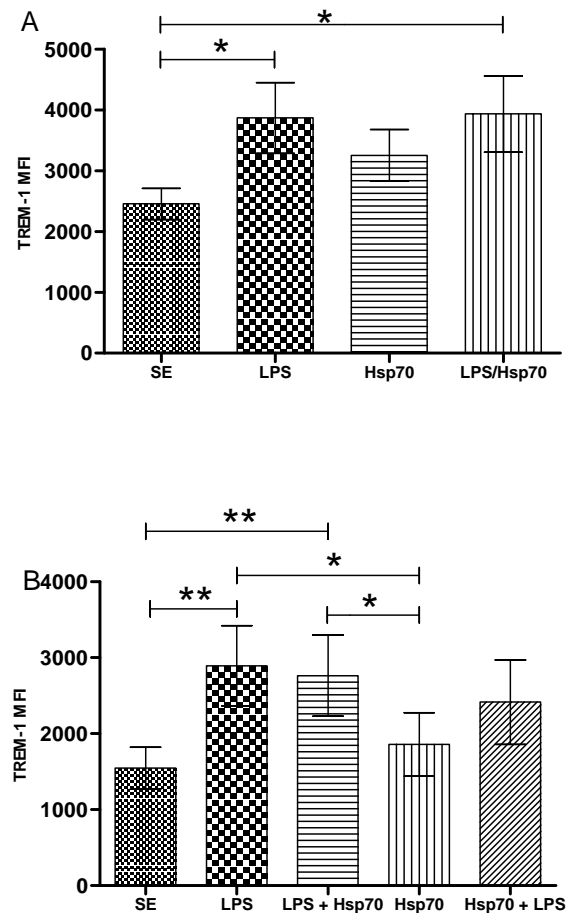


Fig. 10. Hsp70 no modifica la expresión de TREM1 en células CD14+ humanas. A) Se estimularon células de sangre total de donadores sanos con LPS (10 ng/ml) durante 24 horas; y se estimularon células de sangre total por 24 horas con LPS + Hsp70. B) En este panel se muestran los resultados de células de sangre total tratadas con LPS durante 8 horas y posteriormente se agregó Hsp70 por 16 horas más; en la otra se trataron las células con Hsp70 por ocho horas y posteriormente se añadió LPS por 16 horas más. Se despegaron las células y se tiñeron para analizar por citometría de flujo. * $P<0.05$ ** $P<0.01$. SE= sin estímulo

10.3. Tercera Sección. Papel de Hsp70 en la regulación de la respuesta inflamatoria.

El LPS es un MAMP que a través de TLR4 activa la cascada de señalización que lleva a la translocación nuclear de NF- κ B, y ésta a su vez induce la transcripción genética de diferentes citocinas pro y anti-inflamatorias, como por ejemplo TNF- α , IL-6 e IL-10. Por otro lado, Hsp70 es una proteína chaperona que, en el medio extracelular, se ha propuesto también como ligando de TLR4, capaz de inducir la producción de citocinas como TNF- α . Sin embargo, hay controversia en relación al papel inmunoestimulante de Hsp70, ya que existe la posibilidad de que los efectos observados de la proteína, se encuentren relacionados con la contaminación de la proteína por la endotoxina (Gao & Tsan, 2003c; Quintana & Cohen, 2005b). Los resultados de la segunda sección de esta tesis mostraron que el tratamiento de la sangre total con Hsp70, previo a la estimulación con LPS, regula negativamente la expresión de TREM-1. TREM-1 es un receptor que amplifica la respuesta inflamatoria y que su ligando aún se desconoce. Si Hsp70 regula negativamente la expresión de TREM-1, es probable que también regule parte de la respuesta inflamatoria, por tanto surge la pregunta en relación al papel que esta proteína chaperona puede tener en la regulación de la producción de citocinas pro-inflamatorias, en monocitos humanos tratados con ligandos de TLR.

La estimulación de monocitos humanos con Hsp70 no induce la producción de TNF- α .

Se decidió evaluar en primer lugar la capacidad de Hsp70 para inducir la producción de TNF- α en células humanas. Se estimularon monocitos humanos por seis horas y se determinó por ELISA la producción de TNF- α . Como puede observarse en la Figura 11A, la producción de esta citocinas es evidente en respuesta a LPS, sin embargo, los monocitos tratados con Hsp70 no producen TNF- α ($P < 0.05$ LPS vs. Hsp70). Cuando se utilizó la proteína no purificada – Hsp70 high endotoxin- el efecto de la contaminación por LPS se hizo evidente. Aunque la proteína que se utilizó para esta serie de experimentos es recombinante humana derivada de *E. coli*, la cantidad de LPS en la proteína utilizada en los experimentos es menor de 50 EU/mg, insuficiente para generar la producción de TNF- α a los niveles que la proteína Hsp70 *High endotoxin* (con alto contenido de endotoxina).

Adicionalmente se trataron monocitos humanos con tres diferentes concentraciones de Hsp70. Como se observa en la figura 11B, no hubo activación de monocitos con ninguna de las concentraciones utilizadas de Hsp70 (0.03, 0.3 and 3 $\mu\text{g/ml}$) en ninguno de los tiempos analizados (3, 6, 12 and 24 horas) ($P < 0.001$ LPS vs Hsp70).

Hsp70 disminuye la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 inducida por ligandos de TLR en monocitos humanos.

La liberación de Hsp70 como consecuencia de daño celular y tisular que ocurre como consecuencia de un proceso inflamatorio secundario a infección, favorece la exposición de esta proteína a microbios y sus componentes (MAMP).

Se decidió evaluar si la presencia de Hsp70 en el medio extracelular, modifica la habilidad de ciertos MAMP para activar células de la respuesta inmune innata, así como se observó que regula negativamente la expresión de TREM-1. Se utilizó Péptidoglicana (PG), como ligando de TLR2; Porinas, como ligandos de TLR2 y 4; LPS, como ligando de TLR4; y Flagelina, ligando de TLR5; para tratar monocitos humanos durante seis horas en presencia de Hsp70. La producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 se midió a través de la prueba de ELISA en sobrenadante. Hubo una evidente reducción de la producción de TNF- α con los cuatro ligandos de TLRs utilizados en presencia de Hsp70 (Figura 12).

Estos resultados se muestran de acuerdo al porcentaje de reducción en la producción de citocinas con respecto a cada ligando, ya que existe variación en la respuesta de los monocitos entre cada uno de los donadores (Figura 12A). Se pueden observar resultados similares en la producción de IL-6 e IL-10 en los casos de monocitos tratados con LPS y Porinas (ligandos de TLR4 y de TLR2 y 4, respectivamente); estos cambios fueron menos evidentes con PG y Flagelina, que son ligandos de TLR2 y TLR5, respectivamente (Figura 12B y C). Los resultados mostrados corresponden al momento en el que la producción de citocinas es la máxima en respuesta al ligando respectivo.

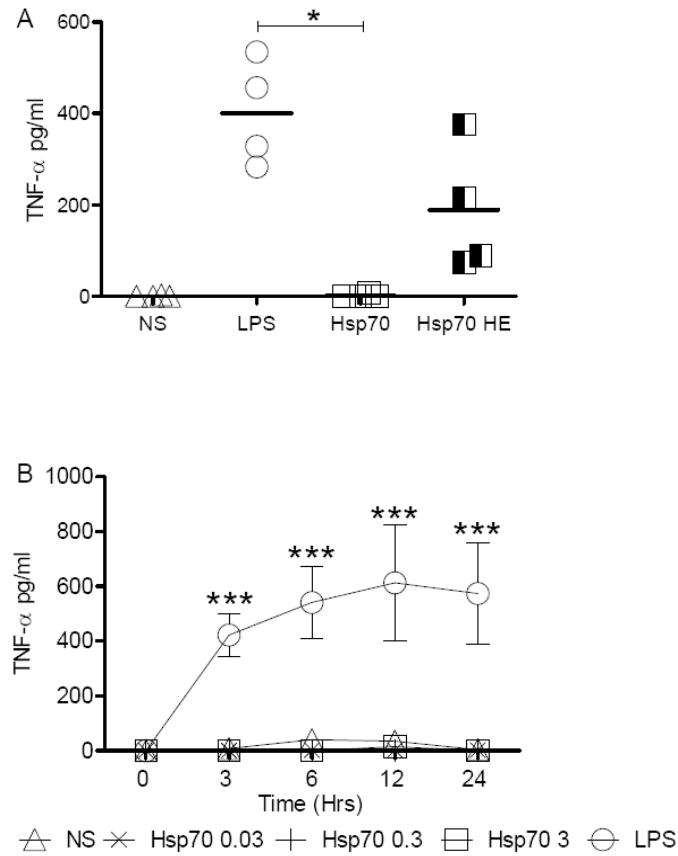


Fig. 11. La estimulación de monocitos humanos con Hsp70 no induce la producción de TNF- α . Se estimularon monocitos humanos durante seis horas y se determinó la producción de TNF- α por ELISA. 11A) Muestra la producción de TNF- α en respuesta al tratamiento con 100 ng/ml de LPS. Los monocitos tratados con 3 μ g/ml de Hsp70 no indujeron la producción de TNF- α ($P < 0.05$ LPS vs Hsp70). Las células se estimularon con 3 μ g/ml de Hsp70 no purificada (representada como Hsp70 HE). 11B) No hubo activación de monocitos con tres diferentes concentraciones de Hsp70 (0.03, 0.3 and 3 μ g/ml) en ningún momento del tiempo de estimulación (3, 6, 12 y 24 horas) ($P < 0.001$ LPS vs Hsp70). $*$ = $P < 0.05$; $***$ = $P < 0.001$. NS = Sin estímulo.

El efecto inmunomodulador de Hsp70 sobre monocitos se observa aún cuando el tratamiento con la proteína se hace en momentos diferentes al ligando de TLR y es dependiente de la concentración de Hsp70.

La estimulación de monocitos humanos con ligandos de TLR en presencia de Hsp70, disminuye la producción de TNF- α . Este fenómeno se observa con concentraciones fijas de la proteína y del ligando de TLR (LPS). Se decidió evaluar si el efecto de inmunoregulación de Hsp70 se encontraba relacionado con la concentración, tanto de la proteína como del ligando LPS. Para estudiar lo anterior, en primer lugar se estimularon monocitos humanos por seis horas y se utilizaron diferentes concentraciones de Hsp70 con una concentración fija de LPS. Se observó que la producción de TNF- α se correlacionó en forma inversa con la cantidad de Hsp70 utilizada (Figura 13A). Las concentraciones de Hsp70 entre 3 μ g/ml y 3 ng/ml fueron capaces de inhibir la producción de TNF- α , pero concentraciones menores fueron inefectivas para encontrar el efecto similar. Algo parecido se observa con concentraciones fijas de Hsp70.

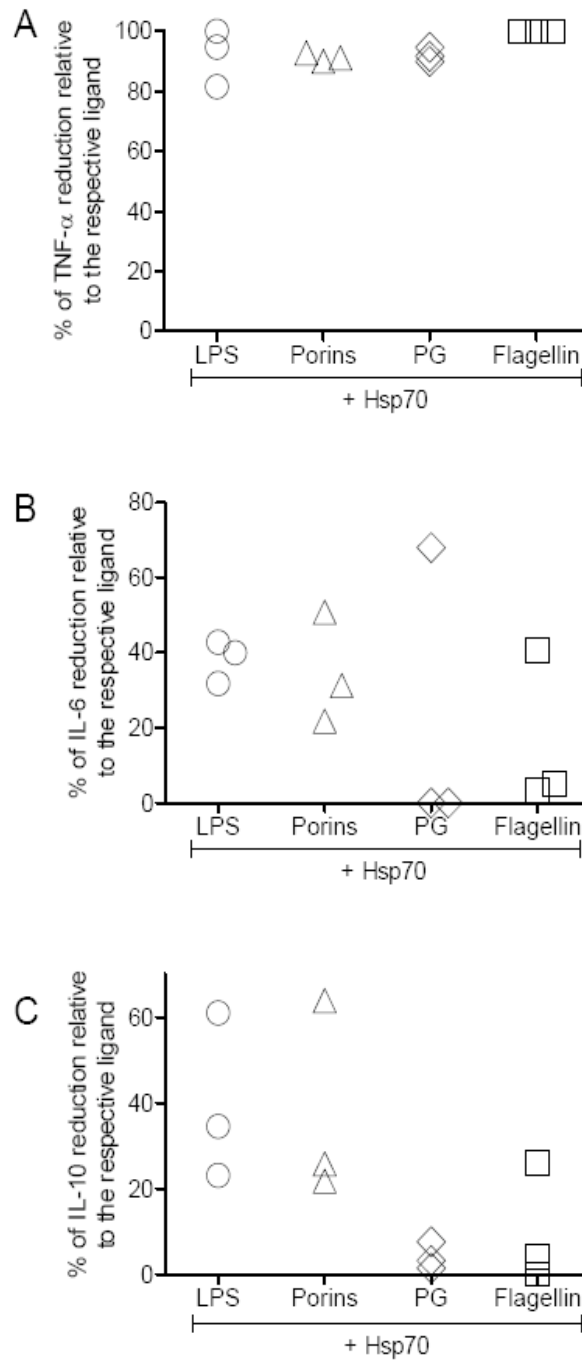


Fig. 12. Hsp70 disminuye la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10 por monocitos humanos estimulados por ligandos de TLR. Los monocitos humanos se trataron con Peptidoglicana (PG), Porinas, LPS y Flagelina por 6 horas en presencia de Hsp70. Los resultados se muestran en términos del porcentaje de reducción de la producción de la citocina con respecto al ligando respectivo. A) muestra el resultado de la producción de TNF- α por monocitos tratados por seis horas. En el caso de IL-6 e IL-10 los monocitos fueron tratados durante 24 h (B y C).

Como se puede ver en la figura 13B, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hsp70 fueron suficientes para inhibir el efecto de 1, 10 y 100 ng/ml de LPS, pero no de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS en relación a la producción de TNF- α .

En la segunda sección se aprecia que el efecto que tiene Hsp70 sobre la expresión de TREM-1 (analizado por citometría de flujo), se observa cuando la sangre total de los voluntarios sanos se trató durante 8 horas con Hsp70 y posteriormente se añadió el estímulo de LPS durante 16 horas más. Con base en este antecedente, se decidió evaluar el papel que tiene el tratamiento con Hsp70 en monocitos humanos, sobre la producción de TNF- α , antes o después del estímulo con LPS.

Se trataron monocitos durante cuatro horas con LPS, se lavaron y después se les añadió Hsp70. A las 24 horas se analizó en sobrenadante la producción de TNF- α por ELISA. La producción de citocinas declina después de la adición de Hsp70 (ver flecha en Figura 13C), este efecto es sostenido después de seis y 24 horas ($P < 0.001$ LPS vs. LPS + Hsp70). Cuando se trataron los monocitos humanos con Hsp70 durante cuatro horas y posteriormente se añadió el LPS, no se encontró producción de TNF- α en ningún momento durante el tiempo analizado (figura 13D).

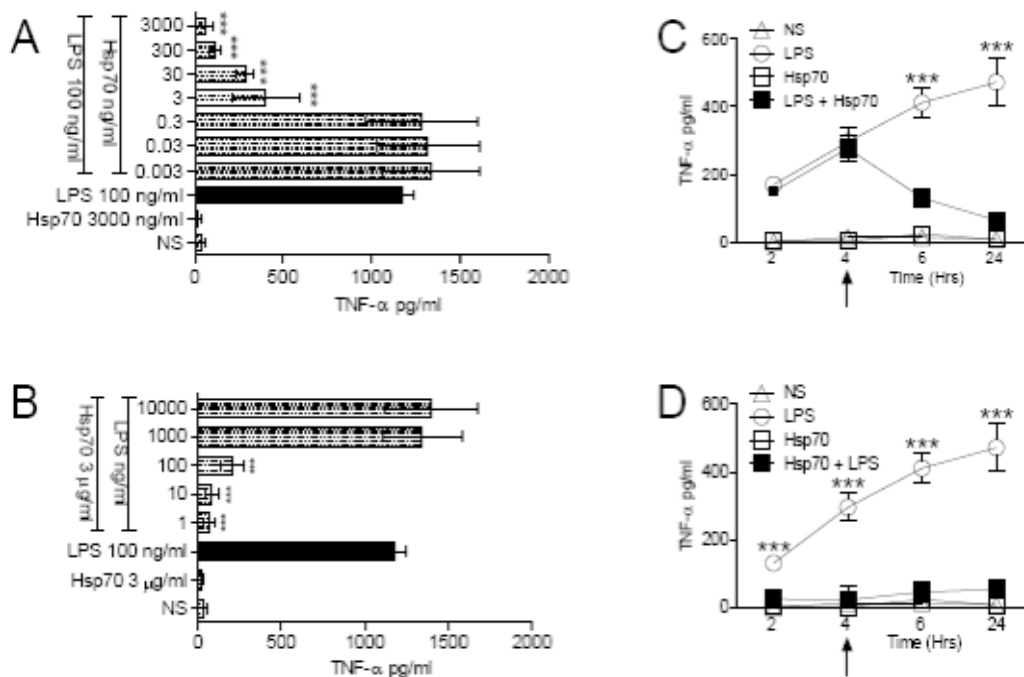


Fig. 13. El efecto inmunomodulador de Hsp70 sobre monocitos se observa aún cuando el tratamiento con la proteína se hace en momentos diferentes al ligando de TLR. Los monocitos se trataron con diferentes concentraciones de Hsp70 (3000, 300, 30, 3, 0.3, 0.03, 0.003 ng/ml) en presencia de 100 ng/ml de LPS durante seis horas. La disminución en la producción de TNF- α fue significativa en el rango de los 3000 a los 3 ng/ml ($P < 0.001$) (A). Una concentración fija de Hsp70 (3 μ g/ml) fue suficiente para inhibir la producción de TNF- α , efecto que se puede observar con 1, 10 y 100 ng/ml de LPS, pero no con 1 y 10 μ g/ml de LPS (B). Los monocitos se trataron con LPS durante cuatro horas y posteriormente se añadió Hsp70 durante 20 horas. La cantidad de TNF- α se determinó por ELISA, y la disminución en la producción de esta citocina fue evidente a partir de las dos horas en adelante posterior a la administración de la proteína ($P < 0.001$) (C). De forma similar se trataron monocitos con 3 μ g/ml de Hsp70 durante cuatro horas y posteriormente se añadieron 100 ng/ml de LPS. Se determinó en sobrenadante la producción de TNF- α por la prueba de ELISA. No se detectó la presencia de TNF- α en las células tratadas con Hsp70 previo al LPS ($P < 0.001$) (D). Las flechas muestran el momento de tratamiento con Hsp70 o LPS respectivamente. ***= $P < 0.001$. NS=Sin estímulo.

La disminución de la producción de TNF- α por Hsp70 se correlaciona con la disminución en el RNA mensajero (RNAm) de TNF- α .

Al momento estos resultados sugieren un mecanismo intracelular involucrado en la disminución de la producción de TNF- α . Para explicar parte de los mecanismos involucrados, se trataron monocitos humanos con LPS en presencia de Hsp70 y se analizó la cantidad de transcritos de TNF- α . Los resultados se compararon con los obtenidos en monocitos tratados solo con LPS o Hsp70. En la figura 14A se muestra el RNAm total de TNF- α detectado en gel de electroforesis; se amplificó de manera simultánea β -actina para verificar la integridad de RNA y asegurar, que cantidades equivalentes de los templates, fueron utilizadas. Se encontró una reducción evidente en el RNAm de TNF- α en cuatro diferentes tiempos (Figura 14B). Los niveles de la proteína de TNF- α en el sobrenadante de las mismas células de donde se obtuvo el RNA, se muestran para correlacionar la disminución de la proteína con la reducción en el RNAm (Figura 14C).

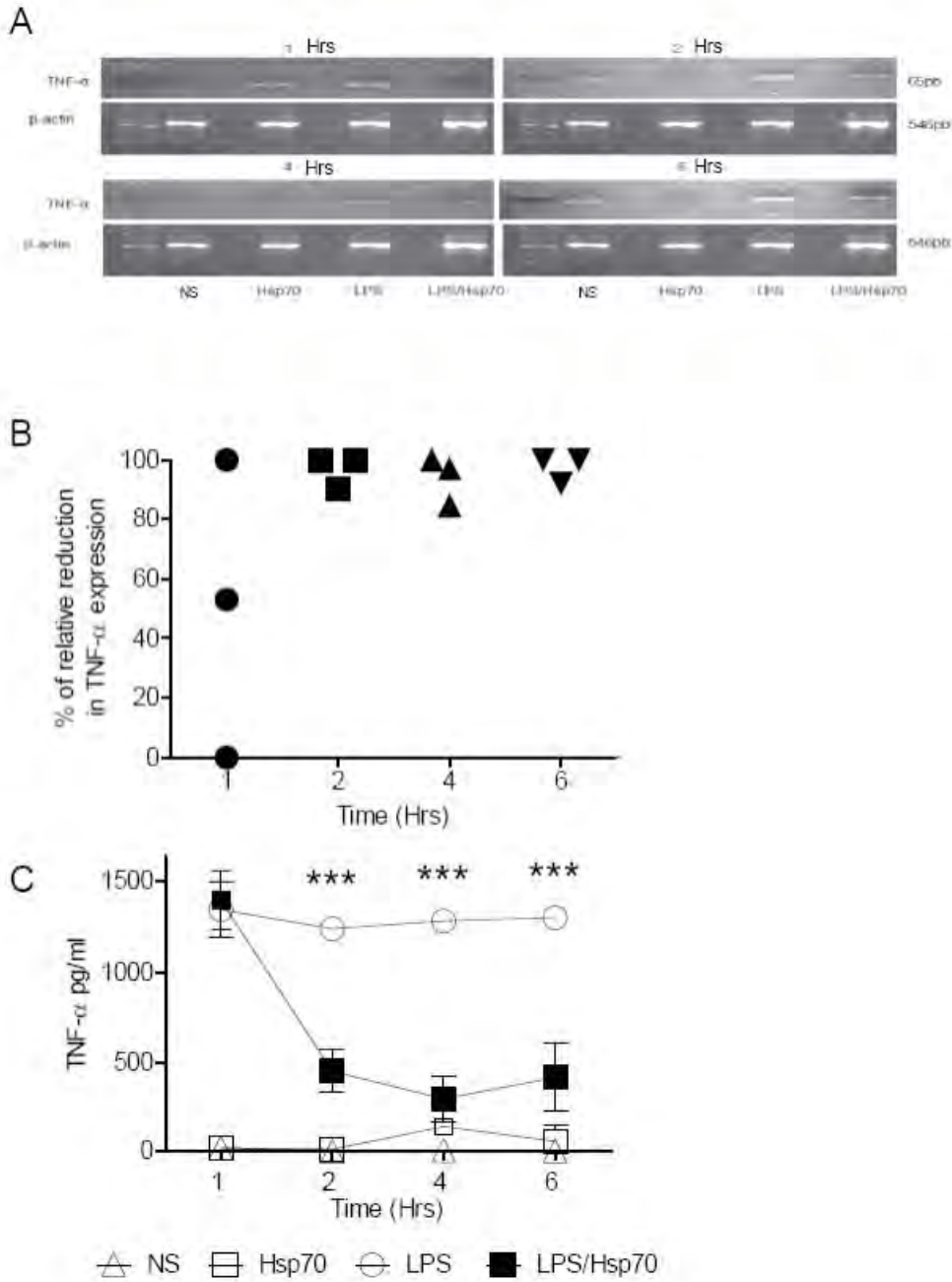


Fig. 14. La disminución en la producción de TNF- α inducida por LPS se correlaciona con la disminución del RNAm de TNF- α . Monocitos humanos se trataron con LPS en presencia de Hsp70 y se analizó la cantidad del mensajero de TNF- α . El Gel que se muestra en el panel A muestra una reducción significativa del RNAm de TNF- α en cuatro diferentes tiempos (1, 2, 4 and 6 horas). El porcentaje de reducción relativa en la expresión del mensajero de TNF- α fue evidente a las 2, 4 y 6 horas (B), y en los mismos tiempos se puede observar la disminución en la concentración de la proteína en el sobrenadante a través de la prueba de ELISA, con una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) (C). ***= $P < 0.001$. NS=Sin estímulo.51

11. Discusión

TREM-1.

La inflamación se produce como consecuencia de la liberación de múltiples mediadores inflamatorios de diferentes sistemas y se regula de manera más o menos estrecha, con el fin de limitar el daño tisular y al mismo tiempo eliminar el agente etiológico del daño. Sin embargo, paradójicamente esta misma respuesta puede ser deletérea para el propio organismo. Al momento, la inflamación es un tópico de principal interés en la investigación básica y clínica, especialmente la que se genera como consecuencia de un proceso infeccioso que en la clínica se le conoce como sepsis. La incidencia de ésta va en aumento y su elevada morbi-mortalidad se asocia con mayores gastos hospitalarios; por lo que es menester mejorar el conocimiento del proceso inflamatorio, en especial desde el punto de vista molecular, ya que finalmente son los mediadores, los orquestadores de la respuesta inflamatoria (Jaimes, 2005; Martin et al., 2003; Moss & Martin, 2004).

El presente estudio muestra que la expresión de TREM-1 en monocitos de pacientes quirúrgicos y con pancreatitis, se incrementó en ausencia de infección. De acuerdo a los antecedentes, TREM-1 es un receptor que aumenta su expresión en infecciones, amplifica la respuesta inflamatoria y se propone como un biomarcador de la presencia de infecciones en forma temprana, y pronóstico de la evolución del paciente (Gibot et al., 2004; Gibot et al., 2005). El incremento en la expresión de TREM-1 en situaciones claramente asociadas a inflamación, como en los pacientes intervenidos quirúrgicamente y los portadores de pancreatitis aguda, nos corrobora su asociación con la respuesta inflamatoria. Esta situación

se hizo muy evidente cuando se encontró que la expresión de TREM-1 en los pacientes con Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) fue significativamente mayor que en aquellos pacientes sin SIRS.

El incremento en la expresión de TREM-1 en los pacientes quirúrgicos, fue similar tanto en complicados como en no complicados con procesos infecciosos. Más aún, la expresión de TREM-1 en sépticos que se esperaba mostrara un franco incremento, no fue así. La expresión de TREM-1 en la primera muestra de los pacientes sépticos que sobrevivieron fue mayor que en los que fallecieron, con una diferencia estadísticamente significativa (Figura 3. J Surg Res). Sin embargo, esta relación no se mantuvo en la siguiente muestra, a las 72 horas, ya que en los pacientes que sobrevivieron, la expresión de TREM-1 disminuyó al mismo nivel que los pacientes que fallecieron en el mismo tiempo de la muestra (72 horas). El hecho de que en los pacientes sépticos las muestras se tomaran dentro de un rango de 72 horas de iniciado el padecimiento, abre la posibilidad de que exista una ventana de tiempo que no observamos en relación con la expresión de TREM-1. Este comportamiento de TREM-1 incrementado en la primera muestra y disminución subsecuente, también se observó en otros pacientes sépticos que fueron reclutados posteriormente (manuscrito en preparación). El patrón de expresión de TREM-1 en los pacientes portadores de sepsis requiere un análisis más extenso, ya que el incremento transitorio de los niveles de TREM-1 podría contribuir al desenlace favorable del paciente.

En este trabajo, todos los pacientes con pancreatitis aguda (Figura 1 Crit Care), mostraron incremento en la expresión de TREM-1, independientemente de

la gravedad del cuadro, y no hubo diferencias en la expresión entre la pancreatitis leve y la grave. Tampoco hubo diferencias en la expresión entre los que sobrevivieron de los que fallecieron, pero se conserva la misma tendencia en relación al mayor incremento de TREM-1 en los que sobreviven, como se mencionó en el párrafo anterior, en relación a los pacientes sépticos.

Como en los pacientes quirúrgicos en relación a la presencia de infecciones, TREM-1 no mostró diferencias entre los pacientes con pancreatitis aguda complicados o no, con infecciones. En este sentido, otros estudios también reportan que el incremento de TREM-1 se asocia con la presencia de enfermedades inflamatorias no infecciosas, como en los casos de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), una enfermedad pulmonar con un componente inflamatorio sistémico, en la que se observa incremento de la fracción soluble de TREM-1 (sTREM-1) (Radsak et al., 2007). También se reporta incremento de sTREM-1 en patologías neoplásicas. En pacientes con derrame pleural de diferente etiología, se determinaron las concentraciones de sTREM-1 por ELISA, y se encontró incrementada su concentración en los derrames pleurales de etiología neoplásica. Los autores demuestran que células tumorales de pulmón (CL1-5 y A549) cultivadas con macrófagos de sangre periférica, favorece el incremento de transcritos de TREM-1 y de sTREM-1 en sobrenadante (Ho et al., 2008).

Los estudios de TREM-1 en pancreatitis aguda son escasos. Se analizó la concentración sérica de sTREM-1, y el incremento en las concentraciones fue más evidente en los pacientes que no sobrevivieron. La tendencia se observa desde la

primera toma, sin embargo, la diferencia estadísticamente significativa está clara en la tercera muestra (Fig. 1d Crit Care). Este comportamiento de sTREM-1, también se observa en un grupo de pacientes sépticos que no sobrevivieron (Gibot et al., 2005). En pancreatitis aguda, hay un reporte que encuentra incremento en los transcritos de TREM-1 en leucocitos; este incremento se asocia con la gravedad del cuadro y con el pronóstico, sin embargo, los autores no estudian la fracción soluble de TREM-1 (Wang et al., 2004). Aunque los resultados observados en relación con el receptor de membrana, tanto en los pacientes quirúrgicos, en los sépticos y en los pacientes con pancreatitis aguda, no están acorde con algunos reportes de la literatura, los hallazgos vistos con la fracción soluble si lo están. Parece congruente que TREM-1 de membrana tenga que estar mayormente expresado para contribuir con la activación de las cascadas de señalización intracelular y mantener la producción de diferentes mediadores inflamatorios, necesarios para lograr la homeostasis que el organismo requiere. También se puede especular que la disminución en la expresión de TREM-1 de membrana en los pacientes que fallecen, puede indicar una alteración en las funciones celulares. Lo anterior estaría en relación con un estado de parálisis inmunológica, en el que los pacientes graves se encuentran frecuentemente se encuentran.

De acuerdo a lo anterior, en relación a TREM-1, estos resultados confirman la hipótesis que propone la asociación entre el incremento en la expresión de TREM-1 en pacientes quirúrgicos y pacientes con pancreatitis aguda, con la presencia del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica. Las hipótesis que

plantean que el incremento en la expresión de TREM-1 se asocia con la presencia de infecciones en pacientes quirúrgicos y con sepsis, no se lograron demostrar. El incremento en la expresión de TREM-1 se observa en pacientes con procesos inflamatorios en pacientes quirúrgicos y con pancreatitis aguda, independientemente de la presencia de infecciones. En relación al pronóstico, solo la forma soluble del receptor (sTREM-1) se asocia con el pronóstico de los pacientes con pancreatitis aguda. No se estudió esta forma en pacientes con sepsis y en pacientes quirúrgicos.

A los pacientes que se incluyeron en los dos artículos publicados, además de TREM-1, se analizó la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de Histocompatibilidad (HLA-DR); una molécula propuesta como biomarcador de la presencia de infecciones y del pronóstico de los pacientes. TREM-1 es un receptor que amplifica la respuesta inflamatoria y, como se hace evidente en los resultados de ambos artículos, el incremento en su expresión se asoció con la presencia del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica. Por otro lado, la disminución en la expresión de las moléculas HLA-DR, es uno de los eventos moleculares que caracterizan al Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora (CARS) (Venet et al., 2007). Las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-DR), tienen como función la presentación de antígenos a linfocitos T CD4. La disminución en su expresión puede dificultar la presentación de antígenos y favorecer con ello el establecimiento de procesos infecciosos. La disminución en la expresión de estas moléculas también se ha tratado de correlacionar con el pronóstico de los

pacientes. En el presente estudio fue evidente la disminución de la expresión del HLA-DR en el pre y post-operatorio de los pacientes quirúrgicos (Fig. 4A J Surg Res). La disminución en el preoperatorio se explica porque parte de estos pacientes fueron intervenidos de urgencia, y todos estos pacientes tenían un proceso inflamatorio subyacente (Fig. 4B J Surg Res). La respuesta inflamatoria implica la producción y liberación de múltiples mediadores inflamatorios; unos considerados pro-inflamatorios y otros anti-inflamatorios. Esta división se realiza en cuanto a las funciones reguladoras que tienen entre sí, pero su presentación no es lineal en una escala temporal. De acuerdo a esto, la producción de citocinas pro-inflamatorias es casi simultánea a la producción de las anti-inflamatorias, principalmente la IL-10. Esta última citocina tiene un efecto evidente en la regulación negativa de las moléculas HLA-DR. Como se aprecia en los pacientes quirúrgicos, la disminución de la expresión se encuentra en la muestra postoperatoria de los casos electivos y desde la preoperatoria en los casos de cirugía de urgencia. Esta situación favoreció el desarrollo de infecciones, por lo que un hallazgo esperado es la presencia de infecciones en los pacientes con disminución en la expresión de estas moléculas. Como se comentó en la introducción, la baja expresión de HLA-DR y el incremento de las concentraciones de IL-10, constituyen el Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora (CARS). La medición de HLA-DR es una forma indirecta de evaluar la actividad de interferón gamma (INF- γ), como inductor de la expresión de HLA-DR y la regulación negativa de la producción de IL-10 y TGF- β . El CARS se pensaba una etapa consecutiva al SIRS, sin embargo, ahora se sabe que frecuentemente se

presentan en forma simultánea. Lo anterior implica que mientras el paciente cumple los criterios clínicos de SIRS, molecularmente presenta CARS.

Se ha tratado de utilizar a HLA-DR como marcador pronóstico de la evolución de pacientes con diferentes padecimientos. En este reporte, los pacientes sépticos presentaron disminución de esta molécula al momento del internamiento y captura, lo que fue más evidente en aquellos que no sobrevivieron (Fig. 5 J Surg Res). La correlación entre la disminución de la expresión de HLA-DR y la muerte del paciente fue clara. Este dato es importante por dos razones: 1) por el hecho de encontrarse en las primeras horas de evolución del padecimiento; y 2) por ser un potencial biomarcador pronóstico en etapas tempranas de la evolución de la sepsis. Se ha observado que los pacientes con choque séptico que presentan incremento en los niveles de IL-10 y disminución en la expresión de HLA-DR (ambas características del CARS), tienen mal pronóstico (Monneret et al., 2004).

Queda pendiente establecer un punto de corte al momento de analizar por citometría de flujo la expresión de HLA-DR, y esto fortalecerá su papel como biomarcador. Esta molécula también se ha intentado usar como indicador para la administración de biológicos capaces de regular la función del sistema inmune, como el caso de INF- γ y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Lendemans et al., 2007). En un estudio de pacientes traumatizados se analizó la expresión de HLA-DR en macrófagos alveolares obtenidos de lavado bronquial. A los pacientes que presentaron expresión de HLA-DR menor al 30%, se les administró INF- γ inhalado (100 μ g de INF- γ

recombinante humano) y se observó, que además de incrementar la expresión de HLA-DR, la administración de INF- γ se asoció con la disminución en la incidencia de neumonías asociadas con ventilación mecánica; sin embargo, no encontró efecto sobre el desenlace final de los pacientes (Nakos et al., 2002). El efecto del GM-CSF sobre la expresión de HLA-DR lo demuestran también en otro estudio en el que utilizan monocitos de pacientes sépticos con Falla Orgánica Múltiple (Nierhaus et al., 2003). A pesar de lo anterior, existen reportes en los que no se logró establecer una correlación entre la disminución de la expresión de HLA-DR y la presencia de complicaciones sépticas, por lo que aún falta determinar la verdadera utilidad de HLA-DR como biomarcador pronóstico (Oczenski et al., 2003).

En los pacientes con pancreatitis aguda, la disminución de HLA-DR en la forma grave de la enfermedad, no fue evidente hasta la tercera muestra, en la que la disminución en la expresión fue estadísticamente significativa cuando se comparó con la tercera muestra de los pacientes con pancreatitis leve (Figura 2 Crit Care). Aunque la tendencia hacia la disminución en la expresión de HLA-DR es evidente, en este caso no es útil para diferenciar la forma leve de la grave. En esta misma situación se encuentra la expresión de la HLA-DR en relación con la mortalidad y la presencia de infecciones. Las gráficas muestran la tendencia a la baja expresión, pero en ambos casos no existe diferencia estadística. En los casos de pancreatitis aguda, los resultados reportados son diferentes de los observados en pacientes quirúrgicos. Una explicación quizá puede ser el tiempo en el que se valoró la expresión de HLA-DR, que fue dentro de los primeros tres días de haber

iniciado el cuadro. Recientemente se publicó un estudio en el que encontraron que HLA-DR ayudó a establecer un punto de corte con valor predictivo en un grupo de pacientes con pancreatitis aguda, sin embargo, esto se observó hasta el décimo día de evolución. En los tres paneles (Fig. 2 Crit Care), se observa la tendencia a la disminución, por lo que la posibilidad de que se repitan los hallazgos del reporte antes mencionado es real. En relación con la evaluación en forma tardía de HLA-DR existe un inconveniente; ya que para el décimo día de evolución, el estado clínico del paciente dará mucho más información que el molecular. Quizá la ventaja que podamos encontrar sería la de clasificar a los pacientes candidatos a algún tipo de terapia biológica del tipo de Interferón gamma (Ho et al., 2006). Un ejemplo de lo propuesto anteriormente se encuentra en un estudio en el que incluyeron pacientes con pancreatitis aguda grave (PAG), y analizaron la expresión de HLA-DR y evaluaron la función de monocitos *in-vitro*. La función de los monocitos se valoró a través de la producción de TNF- α en respuesta a LPS. Los monocitos de estos pacientes expresaron una media de 45% (el control con personas sanas fue de 98%). La expresión de HLA-DR correlacionó adecuadamente con los niveles producidos de TNF- α . En este estudio también se evaluó el papel de GM-CSF e INF- γ , y se observó que la baja expresión de HLA-DR revirtió posterior a la administración de ambas moléculas (Kylanpaa et al., 2005).

TREM-1 y Hsp70

La respuesta inflamatoria generalmente se acompaña de daño celular y/o tisular, lo que favorece la liberación de moléculas que alertan y activan a la

inmunidad innata, como Hsp70 y HMGB1. Estas moléculas, al liberarse como resultado de daño celular, inducen una respuesta inflamatoria a expensas de la producción de mediadores inflamatorios, como por ejemplo, citocinas. Por otro lado, TREM-1 que es un receptor que amplifica la respuesta inflamatoria, contribuye a que HMGB1 y Hsp70 estimulen la producción de citocinas del tipo de TNF- α , IL-6 e IL-8 (Basu et al., 2000a;Scaffidi et al., 2002;El Mezayen et al., 2007). Hsp70 en el medio intracelular tiene propiedades anti-inflamatorias (Chen et al., 2005), pero en el medio extracelular parece ejercer funciones pro-inflamatorias. Existen reportes que proponen a Hsp70 como ligando de TLR4 y de TLR2, capaz de inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias, y así participar en la respuesta inflamatoria (Asea et al., 2000;Asea et al., 2002).

Estas funciones de Hsp70 son aparentemente antagónicas, por lo que surgió la interrogante, si Hsp70 en el medio extracelular ejerce algún efecto sobre la expresión de TREM-1 de membrana. Para evaluar lo anterior, se utilizó Hsp70 recombinante humana para estimular monocitos humanos y se evaluó la expresión de TREM-1 por citometría de flujo. Como control positivo se utilizó LPS, un ligando de TLR4, para estimular monocitos humanos y evaluar la expresión de TREM-1 de membrana. Como se detalla en resultados, la expresión de TREM-1 incrementó en monocitos tratados con LPS. Cuando los monocitos se trataron con Hsp70, no se modificó la expresión de TREM-1. Cuando se trataron células con LPS y Hsp70 en forma simultánea, la expresión de TREM-1 fue similar a la observada solo con LPS. En estos experimentos llamó la atención en primer lugar que Hsp70 no ejercía ningún efecto sobre la expresión de TREM-1, especialmente en relación al

incremento de la misma (ver figura 10 panel A). En otra serie de experimentos se utilizaron diferentes condiciones para la estimulación de los monocitos. Como se observa en el panel B de la figura 10, el tratamiento de células con LPS previo a la estimulación con Hsp70, no modificó la expresión de TREM-1 con respecto a la estimulación con solo LPS. Si llama la atención el hallazgo de que TREM-1 no incrementó su expresión al tratar a las células primero con Hsp70 y posteriormente con LPS.

Una de las hipótesis de esta tesis propone que Hsp70 al actuar como Alarmina en el espacio extracelular, regula positivamente la expresión de TREM-1. Sin embargo, los resultados comentados nos muestran dos hechos que no se esperaban: 1) la incapacidad del LPS para incrementar la expresión de TREM-1 en monocitos humanos tratados previamente con Hsp70; y 2) la incapacidad de Hsp70 para incrementar la expresión de TREM-1 en monocitos humanos. Ambos motivaron el estudio del papel de Hsp70 como reguladora de la inflamación en el medio extracelular.

Hsp70.

El reconocimiento de MAMP por PRR como los TLR lleva a la activación de vías de señalización y factores de transcripción como NF- κ B, que inducen la síntesis de diferentes mediadores inflamatorios (Bhatia & Mochhala, 2004; Ishii & Akira, 2004; Osuchowski et al., 2006; Scaffidi et al., 2002; Williams et al., 2000). Durante el curso de una infección, diferentes componentes microbianos inducen la transcripción de Hsp70 (Campisi & Fleshner, 2003; Kimura et al., 2004), una proteína que a nivel intracelular tiene propiedades anti-inflamatorias y citoprotectoras, que resultan de su capacidad para inhibir la activación de factores de transcripción y la muerte celular por apoptosis, a diferentes niveles de las cascadas de señalización (Salminen et al., 2008; Yoo et al., 2000). Hsp70 se localiza predominantemente en el espacio intracelular, sin embargo, se puede liberar al medio extracelular como resultado de daño celular por necrosis (Basu et al., 2000). A nivel extracelular, Hsp70 ha sido propuesta como chaperocina por sus efectos sobre la producción de mediadores inflamatorios a través de diferentes receptores como CD91, CD40, Lox-1 y especialmente, TLR4 (Asea et al., 2002; Basu et al., 2001; Becker et al., 2002; Delneste et al., 2002). En procesos infecciosos, en el medio extracelular se pueden encontrar diferentes componentes microbianos (MAMP) que, a través de PRR, promueven una respuesta inflamatoria. Si Hsp70 se libera al medio extracelular por daño celular secundario a infección, también es posible que entre en contacto con diferentes MAMP.

Si recordamos que TREM-1 es un receptor que amplifica la respuesta inflamatoria a expensas de la producción de mediadores inflamatorios, por un

lado; y por otro lado, Hsp70 es una molécula propuesta como ligando de TLR4 que induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , los hallazgos en la segunda sección son inesperados y podrían traducir algún tipo de regulación negativa de Hsp70 sobre la expresión de TREM-1 en células estimuladas con LPS (Fig. 10B). Esto descubre una actividad hasta ahora desconocida de Hsp70 a nivel extracelular, un papel como reguladora de la respuesta inflamatoria.

Si el papel de Hsp70 propuesto era como chaperocina, un paso inicial para el estudio de Hsp70 como encargada de regular la respuesta inflamatoria, fue analizar su capacidad para inducir la producción de TNF- α . Como lo muestra la figura 11B, Hsp70 no indujo la producción de TNF- α , utilizando diferentes tiempos de estimulación y diferentes concentraciones. Debe resaltarse que la proteína usada en estos experimentos contiene concentraciones muy bajas de endotoxina; a diferencia de la proteína no purificada, que induce la producción de TNF- α , casi a los niveles que el LPS (Fig. 11A). Estos hallazgos coinciden con los reportes en los que atribuyen al LPS los efectos inmunoestimulantes de la proteína (Bangen et al., 2007; Gao & Tsan, 2003; Tsan & Gao, 2004). Hsp70 es una proteína humana que se obtiene de forma recombinante a partir de E coli, y este es uno de los principales argumentos en contra del papel de Hsp70 como una chaperocina, la contaminación por LPS. Sin embargo, papel de Hsp70 como inmunoreguladora aún es controversial, porque también hay reportes en los que la proteína purificada persiste con capacidad inmunoestimuladora (Asea et al., 2000; Quintana & Cohen, 2005; Tsan & Gao, 2004; Johnson & Fleshner, 2006).

Pese a lo anterior, el efecto que en los experimentos de este trabajo se observó, tiene que ver con la capacidad de regular negativamente la respuesta inflamatoria, a expensas de tres citocinas, como son TNF- α , IL-6 e IL-10. Se evaluaron cuatro ligandos de TLR: Peptidoglicana y Porinas, como ligandos de TLR2; LPS ligando de TLR4; y flagelina, ligando de TLR5. Se estimularon monocitos humanos con cada uno de los ligandos, solos y en presencia de Hsp70, y se evaluó la producción de las tres citocinas mencionadas. Se observó claramente la disminución en la producción de TNF- α , cuando los monocitos humanos se estimularon con los cuatro diferentes ligandos en presencia de Hsp70. Este efecto persistió, aunque en forma un poco menos evidente, con IL-6 e IL-10. Estos resultados corroboran una de las hipótesis propuestas en esta tesis: la presencia de Hsp70 en el medio extracelular regula la amplitud de la respuesta inflamatoria.

Cuando las células se estimularon con LPS o Porinas (ligandos de TLR4 y TLR2/TLR4 respectivamente), la cantidad de TNF- α , IL-6 e IL-10 disminuyó significativamente, comparado con los monocitos estimulados con el mismo MAMP pero en ausencia de Hsp70 (Fig. 12). El hecho de que esto no sea tan evidente cuando las células fueron estimuladas con PG y Flagelina, que son ligandos reconocidos por TLR2 y TLR5 respectivamente, podría señalar un papel específico de Hsp70 directamente sobre TLR4 o de forma alternativa sobre el ligando de TLR4. Hsp70 interactúa con péptidos hidrofóbicos y puede interactuar con ligandos de TLR, cuyas regiones hidrofóbicas se unen a los dominios ricos en Leucina (LRR, por sus siglas en inglés, *Leucin Rich Repeats*), que se encuentran

presentes en los TLR (Seong & Matzinger, 2004; Matsushima et al., 2007). Como consecuencia de esta posible interacción hidrofóbica entre Hsp70 y los ligandos de TLR, se puede proponer que los ligandos de TLR no pueden unirse a su receptor, y por tanto, la respuesta en relación a la producción de citocinas se bloquea.

Aunque la posibilidad de interacción de Hsp70 con los ligandos de MAMP es real, los resultados del presente reporte demuestran que el efecto inhibitor de Hsp70 es independiente de la presencia de esta proteína junto con el ligando de TLR. En la figura 13 del presente manuscrito se observa el efecto que ejerce Hsp70, sobre la producción de TNF- α , antes o después del estímulo con LPS. Este efecto también se puede ver que es dependiente de la concentración de Hsp70 y de la concentración del LPS. Lo anterior sugiere que pueden encontrarse involucrados mecanismos adicionales cuyos efectos ocurren a nivel intracelular (Fig. 13).

Una de las formas de investigar la disminución en la concentración de la proteína de TNF- α en el sobrenadante fue a través del análisis los transcritos de la citocina. En la figura 14 se observa una cinética en la que se evidencia una franca disminución de los transcritos de TNF- α (RNA mensajero de TNF- α) en los monocitos estimulados con LPS en presencia de Hsp70. Los antecedentes a este respecto se encuentran en estudios en los que la inducción de Hsp70 a través de un choque térmico, induce la translocación y asociación del factor transcripcional de choque térmico 1 (HSF-1), al promotor de TNF- α , cuando los monocitos se estimulan con LPS. Esto se ha demostrado en modelos murinos. La activación de HSF1 protege en contra de los efectos tóxicos de la endotoxina bacteriana a

través de la represión de la transcripción de genes de citocinas que incluyen TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Singh et al., 2002;Xiao et al., 1999;Xie et al., 2002). Actualmente estamos trabajando en la demostración de que la unión de HSF-1 al promotor de TNF- α , resulta en la disminución de los transcritos de la proteína. El mecanismo propuesto se resume en la Figura 15.

La respuesta inflamatoria se puede dividir en pro-inflamatoria si predomina la producción de citocinas involucradas en la génesis del proceso, o anti-inflamatoria, si el ambiente está constituido predominantemente por las citocinas anti-inflamatorias. En estos resultados se observa que Hsp70 regula la producción de TNF- α e IL-6 que son citocinas pro-inflamatorias, y de IL-10, que es una citocina anti-inflamatoria. TNF- α es responsable de iniciar la respuesta inflamatoria a nivel local y eventualmente a nivel sistémico, contribuyendo a la generación del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica. IL-6 es un importante citocina que contribuye a la generación del SIRS y es clave para la producción de proteínas de fase aguda -como la proteína C reactiva (PCR) y la lectina que una a manosas (MBL)- y un regulador de la respuesta inmune. Por otro lado, IL-10 junto con TGF- β , se encargan de contra regular la producción de citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e INF- γ , entre otras. Esta última se encarga de regular la expresión de HLA-DR, que en presencia de niveles altos de IL-10, disminuye su expresión y constituyen el Síndrome de Respuesta Anti-inflamatoria Compensadora. De acuerdo a los resultados del presente manuscrito, Hsp70 a nivel extracelular ejerce un efecto de regulación negativa sobre citocinas pro y anti-inflamatorias, actividad similar a la que lleva a cabo a nivel intracelular, como protectora celular. La actividad biológica de estas proteínas difiere

considerablemente, y cada vez hay más evidencia en el sentido de que las proteínas de choque térmico exhiben diferentes propiedades bajo diferentes circunstancias (Abboud et al., 2008;Deak et al., 1999;Luo et al., 2008;Tanaka et al., 1999;Tang et al., 2007;van et al., 2005).

Cada vez es mayor el interés por las funciones de las proteínas de choque térmico, en especial de Hsp70 a nivel extracelular en el contexto de las enfermedades inflamatorias y de las patologías neoplásicas. La lista de las actividades de esta proteína en diferentes tipos celulares y situaciones, se encuentra en aumento. A pesar de esto, el conocimiento dista mucho de ser completo, más allá de ello, aún es un tema controversial (Ganter et al., 2006;Johnson et al., 2005;Kim et al., 2006;Lee et al., 2006;Mortaz et al., 2006;Schmitt et al., 2007).

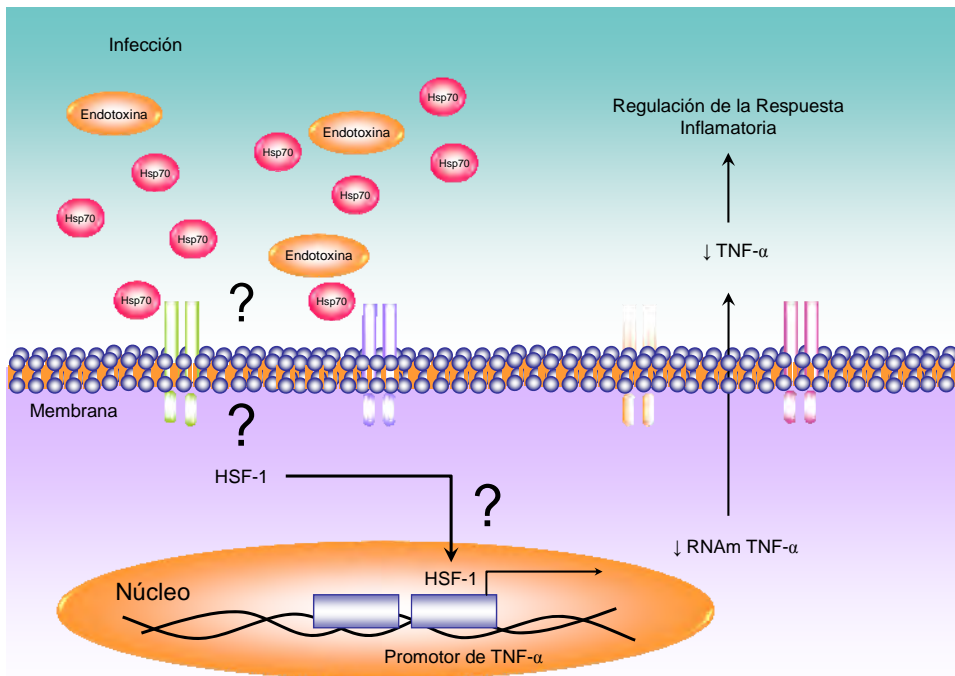


Figura 15. Mecanismo propuesto para la regulación de la respuesta inflamatoria en el contexto de TNF- α . La unión del factor de transcripción de choque térmico al promotor de TNF- reduce los transcritos de la citocina y por tanto la cantidad de proteína a nivel extracelular. La estimulación de monocitos con endotoxina (LPS) en presencia de Hsp70 tiene como resultado la disminución en la producción de TNF, sin embargo, la mecánica que lleva a tal efecto aún está pendiente por determinar y se señalan los puntos con signos de interrogación.

12. Conclusiones

El incremento de la expresión de TREM-1 en monocitos humanos de pacientes sometidos a cirugías electivas o de urgencia y en pacientes con pancreatitis aguda, se asocia con la presencia de procesos inflamatorios, en presencia o no de infecciones. El incremento de TREM-1 en pacientes con sepsis, habla de la presencia de un proceso inflamatorio desencadenado por un agente microbiano patógeno. Estos resultados descartan la posibilidad de utilizar a TREM-1 de membrana como un biomarcador de infección, sin embargo, la tendencia observada de incrementar su expresión en la membrana de los monocitos en los pacientes que sobrevivieron, requiere mayor atención, ya que existe la posibilidad de encontrar una relación entre el incremento en la expresión de TREM-1 de membrana y el pronóstico favorable del paciente. Perspectiva: Establecer la relación entre el incremento de TREM-1 de membrana con el pronóstico del paciente y evaluar si existe alguna correlación entre la expresión del receptor de membrana y la proteína soluble.

El incremento en la concentración sérica de la forma soluble de TREM-1 en pacientes con pancreatitis aguda que no sobrevivieron, abre la posibilidad de usarlo como un biomarcador pronóstico en las primeras etapas de la enfermedad. Este hecho se había reportado en pacientes con sepsis, sin embargo, no se había observado en pacientes con pancreatitis aguda. Existen varios biomarcadores pronósticos que se han empleado en la pancreatitis aguda (ej. Proteína C reactiva, Procalcitonina, IL-6, HLA-DR, etc), sin embargo, hasta el momento ningún marcador ha demostrado ser contundente.

Perspectiva: el estudio de las concentraciones séricas de TREM-1 en pacientes con pancreatitis aguda, puede ayudar a identificar pacientes portadores de pancreatitis aguda que tengan mayor riesgo de presentar una evolución desfavorable.

La disminución en la expresión de HLA-DR es una característica de los pacientes con sepsis; sin embargo, solo la disminución persistente a lo largo del tiempo de evolución puede diferenciar los pacientes que sobreviven de los que no sobreviven. En este trabajo el nivel de expresión de las moléculas HLA-DR correlaciona con la evolución en el caso de los pacientes sépticos. La determinación de las moléculas HLA-DR por citometría de flujo, es una forma sencilla y confiable de predecir la evolución de los pacientes portadores de sepsis, si la primera toma se realiza dentro de las primeras 72 horas de iniciado el padecimiento. También su descenso en la expresión se asocia con el desarrollo de complicaciones infecciosas. Perspectiva: La importancia de HLA-DR como biomarcador radica en la posibilidad de detectar oportunamente aquellos pacientes que pueden tener una evolución desfavorable y, en su caso, ofrecer algún tipo de terapia biológica, capaz de incrementar sus niveles de expresión en el momento adecuado durante el transcurso de una enfermedad como la sepsis. Es necesario estudiar más a fondo el papel de HLA-DR en los pacientes con pancreatitis aguda, ya que los resultados que se mostraron en este estudio, la descartan como una molécula biomarcadora.

Hsp70 juega un papel en la regulación de la respuesta inflamatoria; es una molécula sin efectos anti-inflamatorios, no solo porque reduce la producción de

citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6, sino también lo hace de forma discreta con moléculas anti-inflamatorias, como con IL-10. Quizá parte de su función a nivel extracelular sea similar a sus funciones al interior de la célula (inhibición de la translocación de factores de transcripción como NF- κ B, que es una de los principales factores que inducen la transcripción genética de mediadores pro y anti-inflamatorios). Esto nos deja ver lo complejo de los mecanismos celulares para el control de la inflamación. Perspectiva: es necesario completar el estudio de la mecanística del efecto que tiene Hsp70 a nivel intracelular. Para tal efecto se realizarán experimentos que estudien la activación de factores de transcripción como HSF-1 y su unión a sitios promotores de TNF- α .

13. Bibliografía

1992. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 20: 864-874.

Abboud PA, Lahni PM, Page K, Giuliano JS, Jr., Harmon K, Dunsmore KE, Wong HR, and Wheeler DS. 2008. The role of endogenously produced extracellular hsp72 in mononuclear cell reprogramming. *Shock* 30: 285-292.

Akira S and Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499-511.

Akira S, Takeda K, and Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2: 675-680.

Angele MK and Faist E. 2002. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 6: 298-305.

Aoki N, Zganiacz A, Margetts P, and Xing Z. 2004. Differential regulation of DAP12 and molecules associated with DAP12 during host responses to mycobacterial infection. *Infect. Immun.* 72: 2477-2483.

Asea A, Kabingu E, Stevenson MA, and Calderwood SK. 2000. HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress. Chaperones*. 5: 425-431.

Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, and Calderwood SK. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6: 435-442.

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, and Calderwood SK. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277: 15028-15034.

Bangen JM, Schade FU, and Flohe SB. 2007. Diverse regulatory activity of human heat shock proteins 60 and 70 on endotoxin-induced inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359: 709-715.

Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, and Srivastava PK. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. 14: 303-313.

Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, and Srivastava PK. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial

maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* 12: 1539-1546.

Baue AE. 2006. MOF, MODS, and SIRS: what is in a name or an acronym? *Shock* 26: 438-449.

Bausinger H, Lipsker D, Ziylan U, Manie S, Briand JP, Cazenave JP, Muller S, Haeuw JF, Ravanat C, de la SH, and Hanau D. 2002. Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur. J. Immunol.* 32: 3708-3713.

Becker T, Hartl FU, and Wieland F. 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell Biol.* 158: 1277-1285.

Beere HM. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest* 115: 2633-2639.

Beere HM and Green DR. 2001. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 11: 6-10.

Bhatia M and Mochhala S. 2004. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 202: 145-156.

Bianchi ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81: 1-5.

Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, and Modlin RL. 2003. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.* 170: 3812-3818.

Bone RC. 1991. Let's agree on terminology: definitions of sepsis. *Crit Care Med.* 19: 973-976.

Bone RC. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS
1. *Crit Care Med.* 24: 1125-1128.

Bouchon A, Dietrich J, and Colonna M. 2000. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* 164: 4991-4995.

Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, and Colonna M. 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410: 1103-1107.

Campisi J and Fleshner M. 2003. Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats. *J. Appl. Physiol* 94: 43-52.

Chen HW, Kuo HT, Wang SJ, Lu TS, and Yang RC. 2005. In vivo heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock* 24: 232-238.

Deak T, Nguyen KT, Fleshner M, Watkins LR, and Maier SF. 1999. Acute stress may facilitate recovery from a subcutaneous bacterial challenge. *Neuroimmunomodulation*. 6: 344-354.

Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, and Levy MM. 2004. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 32: 858-873.

Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K, Kawakami-Honda N, Goetsch L, Sawamura T, Bonnefoy J, and Jeannin P. 2002. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*. 17: 353-362.

Dinarello CA. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112: 321S-329S.

Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, and Tobias PS. 2004. TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J. Immunol*. 173: 1166-1170.

El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, McCall CE, Dreskin SC, and Nicolls MR. 2007. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol. Lett.* 111: 36-44.

Ganter MT, Ware LB, Howard M, Roux J, Gartland B, Matthay MA, Fleshner M, and Pittet JF. 2006. Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 291: L354-L361.

Gao B and Tsan MF. 2003. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 278: 174-179.

Gibot S, Cravoisy A, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Faure G, Bollaert PE, and Levy B. 2005. Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Crit Care Med.* 33: 792-796.

Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Bollaert PE, Lozniewski A, Mory F, Levy B, and Faure GC. 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J. Exp. Med.* 200: 1419-1426.

Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Cravoisy A, Levy B, Faure GC, and Bollaert PE. 2004. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann. Intern. Med.* 141: 9-15.

Gibot S, Le Renard PE, Bollaert PE, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, Faure GC, and Levy B. 2005. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock. *Intensive Care Med.* 31: 594-597.

Gibot S, Massin F, Le Renard P, Bene MC, Faure GC, Bollaert PE, and Levy B. 2005. Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: expression patterns in murine sepsis. *Crit Care Med.* 33: 1787-1793.

Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, duna-Vicente R, Wong-Baeza I, Esquivel-Callejas N, studillo-de I, V, Sanchez-Fernandez P, rriaga-Pizano L, Villasis-Keever MA, Lopez-Macias C, and Isibasi A. 2005. Expression of triggering receptor on myeloid cell 1 and histocompatibility complex molecules in sepsis and major abdominal surgery. *World J. Gastroenterol.* 11: 7473-7479.

Guettouche T, Boellmann F, Lane WS, and Voellmy R. 2005. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC. Biochem.* 6: 4.

Harris HE and Raucci A. 2006. Alarmin(g) news about danger: workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep.* 7: 774-778.

Ho CC, Liao WY, Wang CY, Lu YH, Huang HY, Chen HY, Chan WK, Chen HW, and Yang PC. 2008. TREM-1 expression in tumor-associated macrophages and clinical outcome in lung cancer. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 177: 763-770.

Ho YP, Sheen IS, Chiu CT, Wu CS, and Lin CY. 2006. A strong association between down-regulation of HLA-DR expression and the late mortality in patients with severe acute pancreatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 101: 1117-1124.

Hunt C and Morimoto RI. 1985. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82: 6455-6459.

Ishii KJ and Akira S. 2004. Toll-like Receptors and Sepsis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 6: 361-366.

Jaimes F. 2005. A literature review of the epidemiology of sepsis in Latin America. *Rev. Panam. Salud Publica* 18: 163-171.

Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, and Platt JL. 2002. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 168: 5233-5239.

Johnson GB, Brunn GJ, and Platt JL. 2004. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 172: 20-24.

Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M, and Fleshner M. 2005. Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J. Appl. Physiol* 99: 1789-1795.

Johnson JD and Fleshner M. 2006. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J. Leukoc. Biol.* 79: 425-434.

Kaczmarek L, Calabretta B, Kao HT, Heintz N, Nevins J, and Baserga R. 1987. Control of hsp70 RNA levels in human lymphocytes. *J. Cell Biol.* 104: 183-187.

Kiang JG and Tsokos GC. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80: 183-201.

Kim HP, Morse D, and Choi AM. 2006. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 10: 759-769.

Kim SA, Yoon JH, Lee SH, and Ahn SG. 2005. Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress. *J. Biol. Chem.* 280: 12653-12657.

Kimura F, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Ohtsuka M, Shimamura F, Kato A, Nukui Y, and Miyazaki M. 2004. Circulating heat-shock protein 70 is associated with postoperative infection and organ dysfunction after liver resection. *Am. J. Surg.* 187: 777-784.

Kumar H, Kawai T, and Akira S. 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388: 621-625.

Kylanpaa ML, Mentula P, Kemppainen E, Puolakkainen P, Aittomaki S, Silvennoinen O, Haapiainen R, and Repo H. 2005. Monocyte anergy is present in patients with severe acute pancreatitis and is significantly alleviated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma in vitro. *Pancreas* 31: 23-27.

Lawrence T, Willoughby DA, and Gilroy DW. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 787-795.

Lee KJ, Kim YM, Kim DY, Jeoung D, Han K, Lee ST, Lee YS, Park KH, Park JH, Kim DJ, and Hahn JH. 2006. Release of heat shock protein 70 (Hsp70) and the effects of extracellular Hsp70 on matrix metalloproteinase-9 expression in human monocytic U937 cells. *Exp. Mol. Med.* 38: 364-374.

- Lendemans S, Kreuzfelder E, Waydhas C, Schade FU, and Flohe S. 2007. Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFNgamma) after severe trauma. *Inflamm. Res.* 56: 38-44.
- Luo X, Zuo X, Zhou Y, Zhang B, Shi Y, Liu M, Wang K, McMillian DR, and Xiao X. 2008. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res. Ther.* 10: R41.
- Marshall JC. 2006. Biomarkers of Sepsis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 8: 351-357.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, and Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348: 1546-1554.
- Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, and Kuroki Y. 2007. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC. Genomics* 8: 124.
- Matzinger P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305.
- Mayer MP and Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 670-684.

McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, Willette-Brown J, Mikhael AI, Geahlen RL, Nakamura MC, Linnemeyer P, Seaman WE, Anderson SK, Ortaldo JR, and Mason LH. 1998. DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 32934-32942.

Meisner M. 2005. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr. Opin. Crit Care* 11: 473-480.

Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, and Lepape A. 2004. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* 95: 193-198.

Morimoto RI, Sarge KD, and Abravaya K. 1992. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* 267: 21987-21990.

Mortaz E, Redegeld FA, Nijkamp FP, Wong HR, and Engels F. 2006. Acetylsalicylic acid-induced release of HSP70 from mast cells results in cell activation through TLR pathway. *Exp. Hematol.* 34: 8-18.

Moseley PL. 1998. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856: 206-213.

Moss M and Martin GS. 2004. A global perspective on the epidemiology of sepsis. *Intensive Care Med.* 30: 527-529.

Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, and Lekka ME. 2002. Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Crit Care Med.* 30: 1488-1494.

Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, Schneider CG, Pothmann W, Brassel AK, and Schulte Am EJ. 2003. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 29: 646-651.

Nystrom PO. 1998. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl A: 1-7.

Oczenski W, Krenn H, Jilch R, Watzka H, Waldenberger F, Koller U, Schwarz S, and Fitzgerald RD. 2003. HLA-DR as a marker for increased risk for systemic inflammation and septic complications after cardiac surgery. *Intensive Care Med.* 29: 1253-1257.

Opal SM. 1998. The uncertain value of the definition for SIRS. Systemic inflammatory response syndrome. *Chest* 113: 1442-1443.

Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, and Remick DG. 2006. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J. Immunol.* 177: 1967-1974.

Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, and Mackersie RC. 2002. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. *J. Trauma* 52: 611-617.

Quintana FJ and Cohen IR. 2005. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J. Immunol.* 175: 2777-2782.

Radsak MP, Taube C, Haselmayer P, Tenzer S, Salih HR, Wiewrodt R, Buhl R, and Schild H. 2007. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Dev. Immunol.* 2007: 52040.

Ran R, Lu A, Zhang L, Tang Y, Zhu H, Xu H, Feng Y, Han C, Zhou G, Rigby AC, and Sharp FR. 2004. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev.* 18: 1466-1481.

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, and Wenzel RP. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 273: 117-123.

Ritossa F. 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress. Chaperones.* 1: 97-98.

Salazar-Gonzalez RM, Maldonado-Bernal C, Ramirez-Cruz NE, Rios-Sarabia N, Beltran-Nava J, Castanon-Gonzalez J, Castillo-Torres N, Palma-Aguirre JA, Carrera-Camargo M, Lopez-Macias C, and Isibasi A. 2004. Induction of cellular immune response and anti-Salmonella enterica serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol. Lett.* 93: 115-122.

Salminen A, Paimela T, Suuronen T, and Kaarniranta K. 2008. Innate immunity meets with cellular stress at the IKK complex: regulation of the IKK complex by HSP70 and HSP90. *Immunol. Lett.* 117: 9-15.

Scaffidi P, Misteli T, and Bianchi ME. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418: 191-195.

Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, and Garrido C. 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 81: 15-27.

Seong SY and Matzinger P. 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 469-478.

Serhan CN, Chiang N, and Van Dyke TE. 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 349-361.

Shi Y, Evans JE, and Rock KL. 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-521.

Singh IS, He JR, Calderwood S, and Hasday JD. 2002. A high affinity HSF-1 binding site in the 5'-untranslated region of the murine tumor necrosis factor-alpha gene is a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 277: 4981-4988.

Takahashi H, Tsuda Y, Kobayashi M, Herndon DN, and Suzuki F. 2006. CCL2 as a trigger of manifestations of compensatory anti-inflammatory response syndrome in mice with severe systemic inflammatory response syndrome. *J. Leukoc. Biol.* 79: 789-796.

Tanaka S, Kimura Y, Mitani A, Yamamoto G, Nishimura H, Spallek R, Singh M, Noguchi T, and Yoshikai Y. 1999. Activation of T cells recognizing an epitope of heat-shock protein 70 can protect against rat adjuvant arthritis. *J. Immunol.* 163: 5560-5565.

Tang D, Kang R, Xiao W, Wang H, Calderwood SK, and Xiao X. 2007. The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *J. Immunol.* 179: 1236-1244.

Tavaria M, Gabriele T, Kola I, and Anderson RL. 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress. Chaperones.* 1: 23-28.

Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, and Simon JC. 2002. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 195: 99-111.

Theriault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, and Calderwood SK. 2005. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.* 579: 1951-1960.

Tissieres A, Mitchell HK, and Tracy UM. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84: 389-398.

Tracey KJ. 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859.

Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, and Triantafilou K. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* 115: 2603-2611.

Triantafilou M and Triantafilou K. 2003. Receptor cluster formation during activation by bacterial products. *J. Endotoxin. Res.* 9: 331-335.

- Tsan MF and Gao B. 2004. Cytokine function of heat shock proteins. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 286: C739-C744.
- Vabulas RM, hmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, and Wagner H. 2002. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 15107-15112.
- van EW, van der ZR, and Prakken B. 2005. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 318-330.
- Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, Ayala A, and Monneret G. 2007. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med.* 35: 1910-1917.
- Vincent JL. 1997. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you.. *Crit Care Med.* 25: 372-374.
- Volk HD. 2002. Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 6: 279-281.
- Wang DY, Qin RY, Liu ZR, Gupta MK, and Chang Q. 2004. Expression of TREM-1 mRNA in acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 10: 2744-2746.

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, and Tracey KJ. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285: 248-251.

Welch WJ and Feramisco JR. 1984. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 259: 4501-4513.

Williams DL, Ha T, Li C, Laffan J, Kalbfleisch J, and Browder W. 2000. Inhibition of LPS-induced NFkappaB activation by a glucan ligand involves down-regulation of IKKbeta kinase activity and altered phosphorylation and degradation of IkappaBalpha. *Shock* 13: 446-452.

Wolk K, Kunz S, Crompton NE, Volk HD, and Sabat R. 2003. Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J. Biol. Chem.* 278: 18030-18036.

Wong-Baeza I, Gonzalez-Roldan N, Ferat-Osorio E, Esquivel-Callejas N, duna-Vicente R, rriaga-Pizano L, studillo-de I, V, Villasis-Keever MA, Torres-Gonzalez R, Estrada-Garcia I, Lopez-Macias C, and Isibasi A. 2006. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) is regulated post-transcriptionally and its ligand is present in the sera of some septic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 145: 448-455.

Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, and Benjamin IJ. 1999. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.* 18: 5943-5952.

Xie Y, Chen C, Stevenson MA, Auron PE, and Calderwood SK. 2002. Heat shock factor 1 represses transcription of the IL-1beta gene through physical interaction with the nuclear factor of interleukin 6. *J. Biol. Chem.* 277: 11802-11810.

Yoo CG, Lee S, Lee CT, Kim YW, Han SK, and Shim YS. 2000. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 164: 5416-5423.