



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

**LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD MÍNIMAMENTE
MODIFICADA ACTIVA A CD14, TLR4 Y TLR2 INDUCIENDO
LA SECRECIÓN DE CITOCINAS EN MONOCITOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA

JOSÉ ESTEBAN ESPINOSA LUNA.

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ.

ASESORA DE TESIS

Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN.



MÉXICO D.F., JUNIO DE 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

A mi FAMILIA: a Papá y Mamá por todo su esfuerzo y dedicación para que concluya este ciclo; a mis hermanos Martha y Juan; y Manuel.

A Conny por su compañía, su apoyo y su confianza.

Al M. en C. Luis Chávez por permitirme participar en este proyecto, su tiempo y conocimientos transmitidos.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunología: Dr. Francisco Blanco, Dra. Karina Chávez, Dra. Victoria Legorreta, por recibirme en su laboratorio.

A la Mtra. Patricia Vidal por su disposición en la asesoría de este trabajo y sus valiosas enseñanzas.

A los profesores de la FES Zaragoza: Dr. Rubén Marroquín, Mtra. Yolanda Flores, Mtra. Fabiola Martínez, por su colaboración en la revisión de este trabajo.

UNAM: por todo lo que representa y significa para mí.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, bajo la dirección del M. en C. Luis Chávez Sánchez y la asesoría de la Q.F.B. Patricia Vidal Millán.

Este trabajo fue financiado en parte con el apoyo del proyecto del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social con número 44171 de la convocatoria 2006 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y con el apoyo del programa del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número FIS/IMSS/PROT/MD09/734.

CONTENIDO.

Abreviaturas.....	i
Índice de figuras.	iii
Resumen.	1
Introducción.....	2
Marco Teórico.	4
Planteamiento del problema.	17
Hipótesis.	18
Objetivos.....	19
Diseño experimental.	20
Materiales y Métodos.	22
Diagrama de flujo.	28
Diseño estadístico.	29
Resultados.....	30
Análisis de resultados.	38
Conclusión.	41
Propuestas y/o recomendaciones	42
Referencias.	43

Tabla de contenido.

Abreviaturas.....	i
Índice de figuras.	iii
Resumen.	1
Introducción.....	2
Marco Teórico.	4
Enfermedades cardiovasculares.....	4
Lipoproteína de baja densidad (LDL).	5
Desarrollo de la lesión aterosclerosa.	6
Citocinas de la respuesta inflamatoria en aterosclerosis.	9
Receptores tipo Toll (TLR).	11
Planteamiento del problema.	17
Hipótesis.	18
Objetivos.....	19
General.....	19
Específicos.....	19
Diseño experimental.	20
Tipo de estudio.	20
Población de estudio.....	20
Criterios de inclusión.....	20
Criterios de Exclusión.	20
Criterios de Eliminación.....	20
Variables independientes.....	21
Variables dependientes.	21
Materiales y Métodos.	22
Obtención de la LDL nativa (LDL _n).....	22
Análisis de la LDL _n	22
Oxidación de la LDL _n	23
Determinación del grado de oxidación por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.	23
Detección de endotoxinas mediante el ensayo de lisado de amebocitos de <i>Limulus</i>	24
Obtención de células mononucleares.	24
Purificación de monocitos.	25
Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2.....	25
Ensayos de bloqueo de CD14, TLR4 y TLR2 al estímulo de la LDL _{mm}	26
Determinación de citocinas por citometria de flujo.....	27

Diagrama de flujo.....	28
Diseño estadístico.....	29
Resultados.....	30
Pureza de los monocitos.....	30
Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2.....	31
Caracterización de la LDL.....	33
La LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6 a través de CD14 y TLR4.....	35
La LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6 a través de TLR2.....	36
La LDLmm induce la secreción de IL-10 a través de CD14, TLR4 y TLR2.....	37
Análisis de resultados.....	38
Conclusión.....	41
Propuestas y/o recomendaciones.....	42
Referencias.....	43

Abreviaturas.

Ab	Anticuerpo
Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
CD	Grupo de diferenciación
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN- γ	Interferón- γ
IKB	Inhibidor del factor nuclear kappa-Beta
IL	Interleucina
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina
IRF	Factor regulatorio de interferón
LAL	Lisado de amebocitos de <i>Lymulus</i>
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLmm	Lipoproteína de baja densidad mínimamente modificada
LDLn	Lipoproteína de baja densidad nativa
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1

MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos-2
MyD88	Gen de la respuesta primaria para diferenciación mieloide 88
NF- κ B	Factor nuclear kappa-B
Pam3CSK4	Lipopéptido sintético tripalmitoilatado
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PECAM-1	Molécula de adhesión de plaquetas a células endoteliales-1
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RRL	Repeticiones ricas en leucina.
TBK1	Cinasa de unión a TANK1
TIR	Dominio homólogo al receptor Toll/ Interleucina-1
TIRAP	Proteína adaptadora del dominio TIR
TLR	Receptor tipo Toll
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TRAF	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRIF	Proteínas adaptadoras asociadas al dominio TIR inductoras de interferón
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

Índice de figuras.

Figura 1.	Estructura de la lipoproteína de baja densidad.	5
Figura 2.	Desarrollo de la lesión aterosclerosa.	8
Figura 3.	Estructura del receptor tipo Toll.	11
Figura 4.	Representación esquemática de las vías de señalización de los TLR.	14
Figura 5.	Determinación de la pureza de los monocitos.	30
Figura 6.	Capacidad de inhibición de los anticuerpos contra CD14, TLR4 y TLR2 determinada por la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10.	32
Figura 7.	Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación.	34
Figura 8.	Grado de oxidación de LDLn y LDLmm.	34
Figura 9.	Inhibición de secreción de IL-1 β e IL-6 bloqueando CD14 y TLR4.	35
Figura 10.	Inhibición de secreción de IL-1 β e IL-6 bloqueando TLR2.	36
Figura 11.	Inhibición de secreción de IL-10 bloqueando CD14, TLR4 y TLR2.	37

Resumen.

La aterosclerosis es considerada una enfermedad inflamatoria crónica y aunque aún se desconocen las causas que ocasionan esta respuesta diversos estudios han demostrado que los receptores CD14, los receptores tipo Toll (TLR)-4 y TLR2, así como la lipoproteína de baja densidad (LDL) modificada oxidativamente están involucrados en la enfermedad. El objetivo de esta investigación fue demostrar que la LDL mínimamente modificada (LDLmm) activa a los monocitos a través de CD14, TLR4 y TLR2 induciendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Las células fueron tratadas con anticuerpos monoclonales específicos para CD14, TLR4 y TLR2 antes de ser estimulados con la LDLmm y los niveles de citocinas se determinaron por citometría de flujo. El estímulo de la LDLmm provocó la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL10 y el bloqueo de CD14 inhibió la secreción de estas citocinas en un 72%, 58% y 63%; mientras que el bloqueo de TLR4 provocó una inhibición en la secreción del 67%, 63% y 60% y el bloqueo de ambos receptores mostró una disminución del 73%, 69% y 63%, respectivamente. Por otro lado, el bloqueo de TLR2 indujo la inhibición en la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10 del 65%, 62% y 72%, respectivamente. Estos resultados sugieren un mecanismo de activación de CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a la LDLmm mediante la secreción de citocinas pro- y anti-inflamatorias favoreciendo el proceso inflamatorio en la aterosclerosis.

Introducción.

Las enfermedades cardiovasculares, en particular los síndromes isquémicos agudos son la principal causa de muerte en países desarrollados, mientras que en México son la segunda causa de muerte de la población en general. Muchos estudios han mostrado que diferentes formas de lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox) contribuyen al desarrollo de la lesión aterosclerosa causando una respuesta inflamatoria caracterizada por la presencia de monocitos en la lesión que subsecuentemente son transformados en células espumosas. Recientemente se ha demostrado un aumento en la expresión de TLR4 y TLR2 en células endoteliales y macrófagos de lesiones aterosclerosas de ratón y humanas que se han asociado con la actividad inflamatoria. Se ha demostrado que los receptores CD14, TLR4 y TLR2 participan en el desarrollo de la placa aterosclerosa ya que la deficiencia de TLR4 y TLR2 en animales susceptibles a desarrollar aterosclerosis presentan reducción de la placa de alrededor de un 24% y 50% respectivamente, así como una disminución de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 produciendo un menor infiltrado de macrófagos en el sitio de la lesión; además se ha reportado que la deficiencia de CD14 en ratones disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias así como retardo en la activación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) en respuesta al lipopolisacárido (LPS).

Los receptores CD14 y TLR que expresan los monocitos en su superficie celular, pertenecen a una familia de receptores capaces de activar múltiples genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias como interleucina (IL)-1 β , IL-6 en respuesta a antígenos exógenos como *Chlamydia pneumoniae* o a antígenos endógenos como la LDLox generando un microambiente pro-inflamatorio en la aterosclerosis; más aún, se ha demostrado que la LDL mínimamente modificada (LDLmm) induce la secreción de

la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2 la cual es dependiente de TLR4 mientras que la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF) es independiente de TLR4 en macrófagos TLR4^{-/-} o MyD88^{-/-} de ratón; en contraste, otros autores utilizando células humanas reportaron que la síntesis de TNF es dependiente de TLR4 y esto es consolidado por la demostración de que la LDLmm se une a CD14 e induce la polimerización de F-actina en macrófagos a través del complejo TLR4/MD2.

A pesar de la evidencia existente se desconoce si la LDLmm es capaz de activar a CD14, TLR4 y TLR2 por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál es el papel de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias al estímulo de la LDLmm en monocitos?

En este proyecto se analizó el proceso inflamatorio por la secreción de IL-1 β e IL-6, así como de IL-10 en respuesta a la LDLmm mediante la activación de CD14, TLR4 y TLR2 tratando de caracterizar el fenómeno inflamatorio a fin de encontrar por un lado un mejor entendimiento de la enfermedad aterosclerosa y por otro una posible solución al problema de salud sugiriendo tratamientos alternativos como el uso de anticuerpos anti-TLR.

Marco Teórico.

Enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares, y en particular los síndromes isquémicos coronarios agudos, representan un grave problema de salud en el mundo. En países desarrollados y en algunos en vías de desarrollo estas patologías ocupan la principal causa de muerte de la población [1] mientras que en México, los síndromes isquémicos agudos fueron la segunda causa de muerte en población general durante 2008 originando 59,658 muertes, de las cuales 44,569 se presentaron en individuos mayores de 65 años (en personas mayores de 75 años causa el 70% de muertes) y 15,089 en individuos en edad productiva [2].

El síndrome coronario agudo es más frecuente en el género masculino presentándose generalmente en forma de infarto al miocardio, mientras que en el género femenino se presenta más frecuentemente como angina de pecho con relación aproximada de 1:10; sin embargo, en mujeres mayores de 65 años de edad se pierde ésta relación y se vuelven tan vulnerables como los hombres [3].

Los factores de riesgo asociados con las enfermedades cardiovasculares son: las dislipidemias, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial sistémica, el tabaquismo, el síndrome metabólico, la obesidad e inactividad física, y algunas infecciones por microorganismos como citomegalovirus, *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori*, entre otros [4-6]; de estos, las dislipidemias y en particular niveles elevados de colesterol total en suero y elevadas concentraciones de lipoproteína de baja densidad (LDL), así como bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), han cobrado importancia como uno de los factores más importantes de riesgo de aterosclerosis.

Lipoproteína de baja densidad (LDL).

La LDL es una molécula esférica con un diámetro de 22 nm y un peso molecular de 2500 KDa, la cual consiste de un núcleo hidrofóbico de alrededor de 1600 moléculas de ésteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos rodeada por una monocapa superficial de 700 moléculas de fosfolípidos (predominantemente fosfatidilcolina) y 600 moléculas de colesterol libre, embebida en la monocapa se localiza la apolipoproteína B-100 (ApoB-100), constituida de 4536 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 500 KDa (Figura 1) [7, 8], la cual es susceptible a la oxidación.

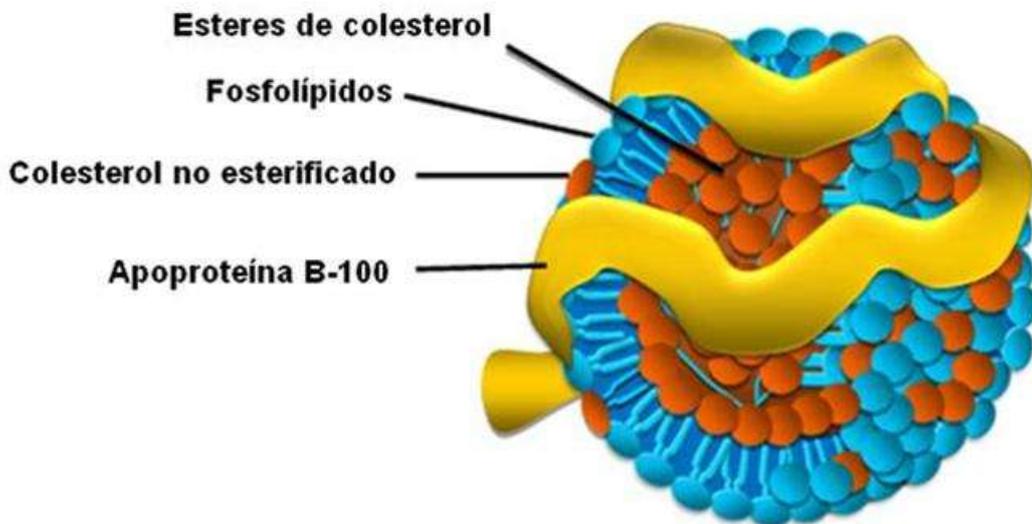


Figura 1. Estructura de la lipoproteína de baja densidad. La LDL es una molécula esférica compuesta por la ApoB-100, fosfolípidos, ésteres de colesterol y colesterol no esterificado [modificado de 9].

Desarrollo de la lesión aterosclerosa.

Existe evidencia que demuestra que la LDL oxidada (LDLox) participa en la fisiopatología de la enfermedad aterosclerosa [10] lo que ha quedado de manifiesto debido a que se ha encontrado LDLox en lesiones aterosclerosas de pacientes hiperlipidémicos a través de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra LDLox [11].

El proceso aterogénico inicia con la disfunción endotelial que representa uno de los primeros estadios en la patogénesis de la aterosclerosis (Figura 2). Esta primer fase consiste en una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio (anti-adhesiva, anti-agregante, anti-proliferativa, anti-oxidante, anti-trombótica y reguladora del tono vaso motor) y como consecuencia, en presencia de un endotelio disfuncional, se observa la expresión de moléculas de adhesión tales como las selectinas (E y P), moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales (PECAM)-1, moléculas de adhesión intercelular (ICAM)-1 y moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM) mediante las cuales se produce la interacción entre las células T y los monocitos circulantes con las células endoteliales (Figura 2A) [12]; además, las células del endotelio liberan quimioatrayentes como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, estimulando la migración de monocitos al sitio de la lesión [13]. Estos cambios tempranos que preceden a la formación de la lesión aterosclerosa incluyen un aumento en la permeabilidad endotelial a la LDL, que es retenida por interacciones de los grupos positivos de lisina y arginina que interactúan con cargas negativas de grupos sulfatos de cadenas de glicosaminoglicanos de proteoglicanos, posteriormente la LDL es modificada por lipoperoxidación en el espacio subendotelial por compuestos reactivos del oxígeno generándose una forma oxidada de LDL con propiedades quimioatrayentes de monocitos y linfocitos; el aumento de partículas de LDL en el espacio subendotelial

inicia la formación de la placa aterosclerosa [6]. En la lesión existe un infiltrado de macrófagos que expresan en su membrana celular receptores “scavenger” clase A tipo I y II, clase B y CD36 mediante los cuales identifican y endocitan a las partículas de la LDL modificada oxidativamente y se transforman en células espumosas (Figura 2B); otro evento que se inicia es la muerte celular de macrófagos por interferón (IFN)- γ que puede ser generada por la acumulación de lípidos promoviendo el avance del núcleo necrótico en la placa (Figura 2C). En la última etapa de la aterosclerosis ocurre ruptura o ulceración de la placa fibrosa, la vulnerabilidad de la placa se origina por un adelgazamiento de la lesión y ocurre por la inhibición en la secreción de matriz proveniente de células musculares lisas a través de IFN- γ secretado por linfocitos T, los macrófagos degradan la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa intersticial, gelatinasa y estromilisina. La degradación de la capa fibrosa frecuentemente se origina en los hombros de la lesión y puede conducir a una hemorragia donde las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo y la oclusión de la arteria (Figura 2D) [14].

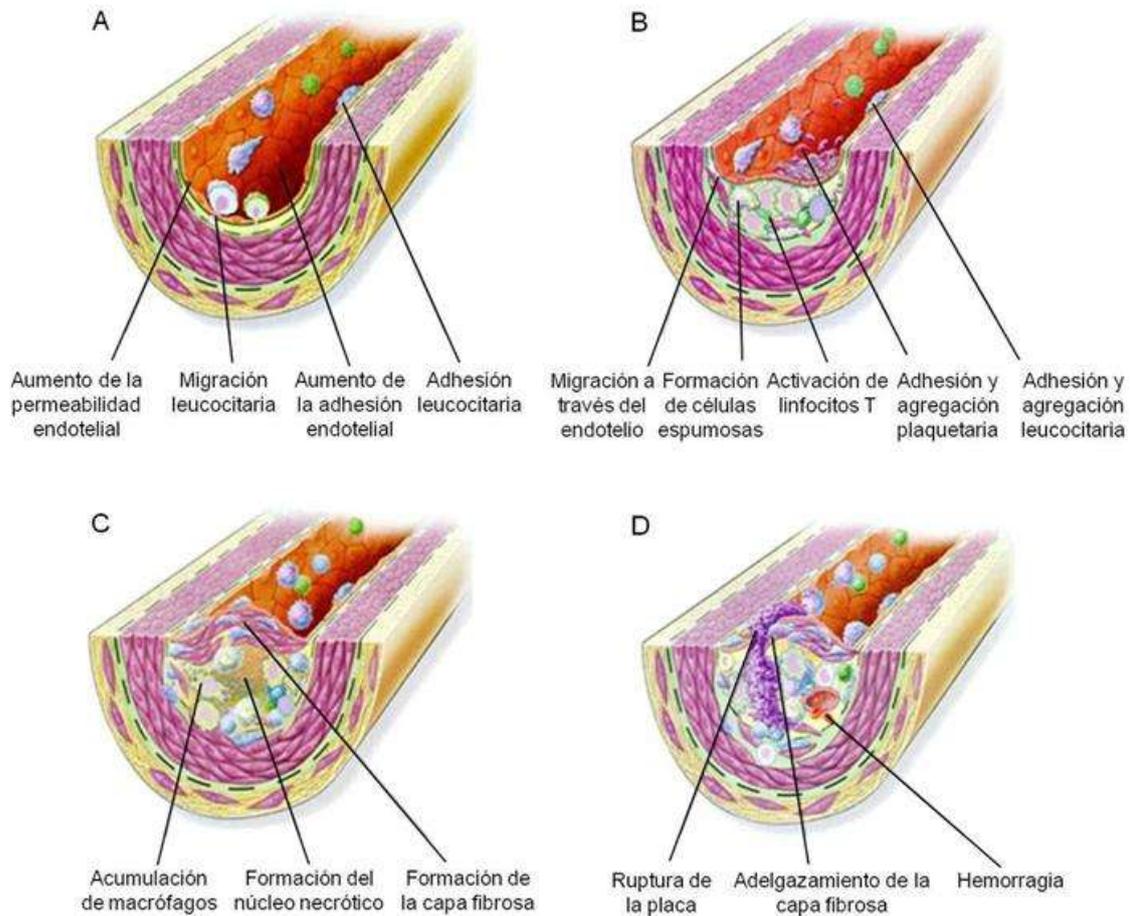


Figura 2. Desarrollo de la lesión aterosclerótica. (A) La lesión se origina por un daño al endotelio lo que permite la entrada de LDL, la cual es oxidada. (B) Las células activadas secretan $\text{TNF-}\alpha$ que induce la expresión de selectinas e integrinas en el endotelio. Se reclutan principalmente monocitos a la lesión. Los macrófagos en la lesión endocitan LDL oxidada a través de receptores como CD36 provocando su activación y la secreción de citocinas pro-inflamatorias. (C) En la lesión ocurre apoptosis o necrosis de células generándose el núcleo necrótico. (D) La placa aterosclerótica sufre la formación de la capa fibrosa, neovascularización y generación de células espumosas [modificado de 5].

Citocinas de la respuesta inflamatoria en aterosclerosis.

Los monocitos son células de la respuesta inmune innata esenciales en la enfermedad aterosclerosa secretando citocinas pro-inflamatorias como: interleucina (IL)-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF) y anti-inflamatorias como: IL-10 [15]

La IL-1 desempeña un papel central en el inicio de las reacciones inflamatorias, es producida principalmente por monocitos y macrófagos, y existe en dos formas biológicamente activas: la IL-1 β y la IL-1 α , de estas la IL-1 β es la isoforma que predomina en sangre periférica en humanos. La IL-1 se une a receptores que se encuentran en linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos, activa la cascada de la inflamación induciendo la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de las plaquetas; además induce la expresión de genes para factores de la coagulación e inhibidores de la fibrinólisis, la adhesión, migración de leucocitos a través del endotelio y la síntesis de factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos [16].

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria multifuncional que regula la respuesta humoral y celular, además participa en el daño tisular y juega un papel central en el proceso inflamatorio como principal mediador de la respuesta de fase aguda y de la producción hepática de proteína C reactiva así como de fibrinógeno, estimula la función de los linfocitos T y B, provoca la migración y diferenciación de macrófagos e induce la síntesis de enzimas degradadoras de matriz extracelular con lo cual se puede debilitar la placa aterosclerosa. Además, promueve la expresión de receptores de LDL-colesterol en la superficie de los macrófagos y estimula la proliferación de células musculares lisas favoreciendo la progresión de la placa [17, 18].

Otra citocina pro-inflamatoria que participa de forma importante es el TNF producido principalmente por monocitos y macrófagos aunque también es producida por linfocitos T, células asesinas naturales, células musculares lisas, células endoteliales [19, 20]; ejerce sus acciones pro-inflamatorias sobre las células lo que favorece la progresión e inestabilización de la placa aterosclerosa, también estimula la producción de IL-6 por células musculares lisas de la placa e induce la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 por células endoteliales y macrófagos [20]. Se ha identificado elevación en la producción de TNF por células mononucleares de pacientes después de un infarto agudo del miocardio, además las concentraciones del receptor soluble de TNF también aumentan rápidamente en estos pacientes [21].

Otras citocinas pro-inflamatorias involucradas en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular son la IL-18, IL-12 e IFN [15].

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que es expresada y secretada por varios tipos de células incluyendo células T, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células epiteliales generalmente después de un estímulo de activación pero su expresión está regulada de manera diferente por los diversos tipos de células que la segregan; esta actúa sobre una amplia variedad de células que incluyen linfocitos B, T, NK, macrófagos, células dendríticas entre otras. Evidencias *in vitro* demuestran que IL-10 inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias entre las que se encuentran: IFN- γ , IL-12, TNF, IL-1, IL-8 y moléculas del estallido respiratorio como óxido nítrico en monocitos/macrófagos [22].

Receptores tipo Toll (TLR).

A pesar de que aún no existen conocimientos suficientes que demuestren el posible mecanismo que provoca el proceso inflamatorio, diversos estudios han demostrado que los receptores tipo Toll (TLR) juegan un papel esencial en la respuesta inflamatoria y al parecer contribuyen de forma importante en la enfermedad aterosclerosa [23].

Los TLR son receptores transmembranales tipo I que se han conservado filogenéticamente y participan en la respuesta inmune innata brindando protección por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estos presentan tres características estructurales: 1) tienen un dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina que une a diversos ligandos, 2) un dominio transmembranal corto y, 3) un dominio citoplásmico homólogo al receptor de interleucina-1, el cual es necesario para el inicio de las cascadas de señalización (Figura 3) [23, 24].

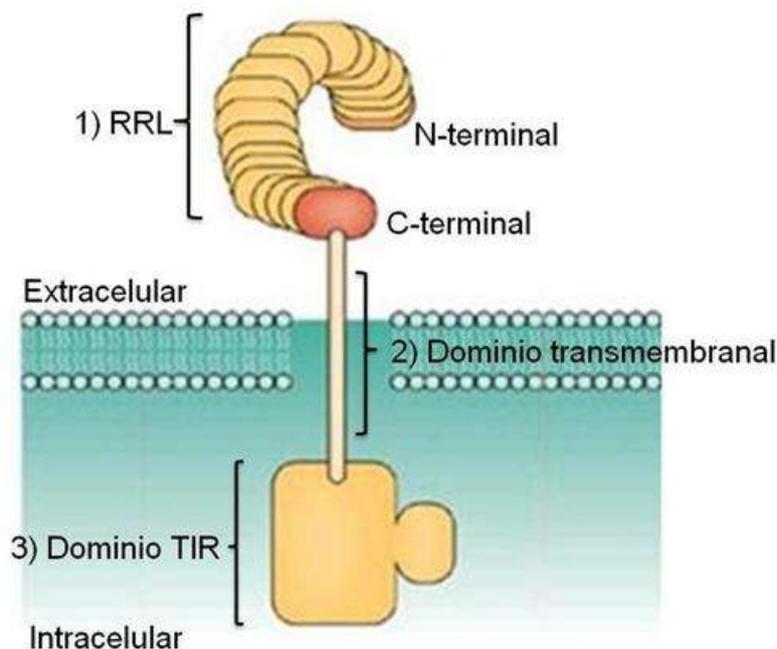


Figura 3. Estructura del receptor tipo Toll. El TLR presenta un dominio extracelular transmembranal y citoplásmico. RRL, repeticiones ricas en leucina; N-terminal, amino terminal; C-terminal, carboxilo terminal; dominio TIR, receptor Toll/IL-1R [modificado de 25].

Estudios *ex vivo* establecen que los TLR están involucrados en el reconocimiento de moléculas provenientes de microorganismos y virus (Cuadro 1).

Cuadro 1. TLR y algunos de sus ligandos [modificado de 26, 27].

TLR	Ligando	Origen ligando
TLR1/TLR2	Lipopéptidos triacetilados	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TLR2	Peptidoglicana	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Lipoarabinomana	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Lipoproteína	<i>Salmonella typhimurium</i>
	Fosfolipomanana	<i>Candida albicans</i>
TLR3	RNA de doble cadena	Virus
TLR4	Lipopolisacáridos	Bacterias gramnegativas
	Fosfatidilinositol manosidos	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Proteína F de envoltura	Virus sincial respiratorio
	Glicoinositolfosfolipido ceramidas	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TLR5	Flagelina	<i>Salmonella typhimurium</i>
TLR6/TLR2	Acido lipoteicoico	<i>Streptococcus</i> del gupo B
	Diacil lipopéptidos	Micoplasma
TLR7	RNA de cadena sencilla	Virus
TLR8	RNA de cadena sencilla	Virus
TLR9	DNA que contienen dinucleótidos CpG no metilados	Bacterias y virus
TLR11	Profilina	<i>Toxoplasma gondii</i>

Los TLR reconocen gran cantidad de componentes microbianos formando homodímero o heterodímeros, o colaborando con otros receptores como CD14. La activación de los TLR se inicia principalmente a través de las vías de señalización dependiente e independiente de la proteína MyD88 (gen de la respuesta primaria para diferenciación

mieloide) (Figura 4). En la ruta de señalización dependiente de MyD88, la proteína adaptadora del dominio TIR (TIRAP) es reclutada al dominio homólogo al receptor Toll/IL-1 (dominio TIR), así como MyD88 interaccionando con la cinasa asociada al receptor de interleucina (IRAK)-4 y fosforilando a IRAK1, que interacciona con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF)-6 generándose el complejo IRAK1-TRAF6 que interactúa con otras moléculas que inducen la fosforilación del inhibidor del factor nuclear kappa-B (IKK) permitiendo la liberación y posterior translocación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) al núcleo. Los TLR3 y TLR4 señalizan a través de la vía independiente de MyD88. En la ruta de señalización, las proteínas adaptadoras asociadas al dominio TIR inductoras de interferón (TRIF) interactúan con TRAF6 y con cinasas de unión a TANK (TBK)-1. La activación de TRIF dependiente de TBK1 conduce a la fosforilación del factor regulador de interferón (IRF)-3 y TRAF6 mediante la activación de NF- κ B, la activación de IRF3 y NF- κ B contribuyen a la síntesis de IFN- β . La activación de las rutas de señalización de los TLR inducen la activación de los factores NF- κ B e IRF involucrados en activar múltiples genes inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- β , CD80, CD86, ICAM-1, VCAM-1, IL-8 y MIP-1 α , entre otras moléculas [26-28].

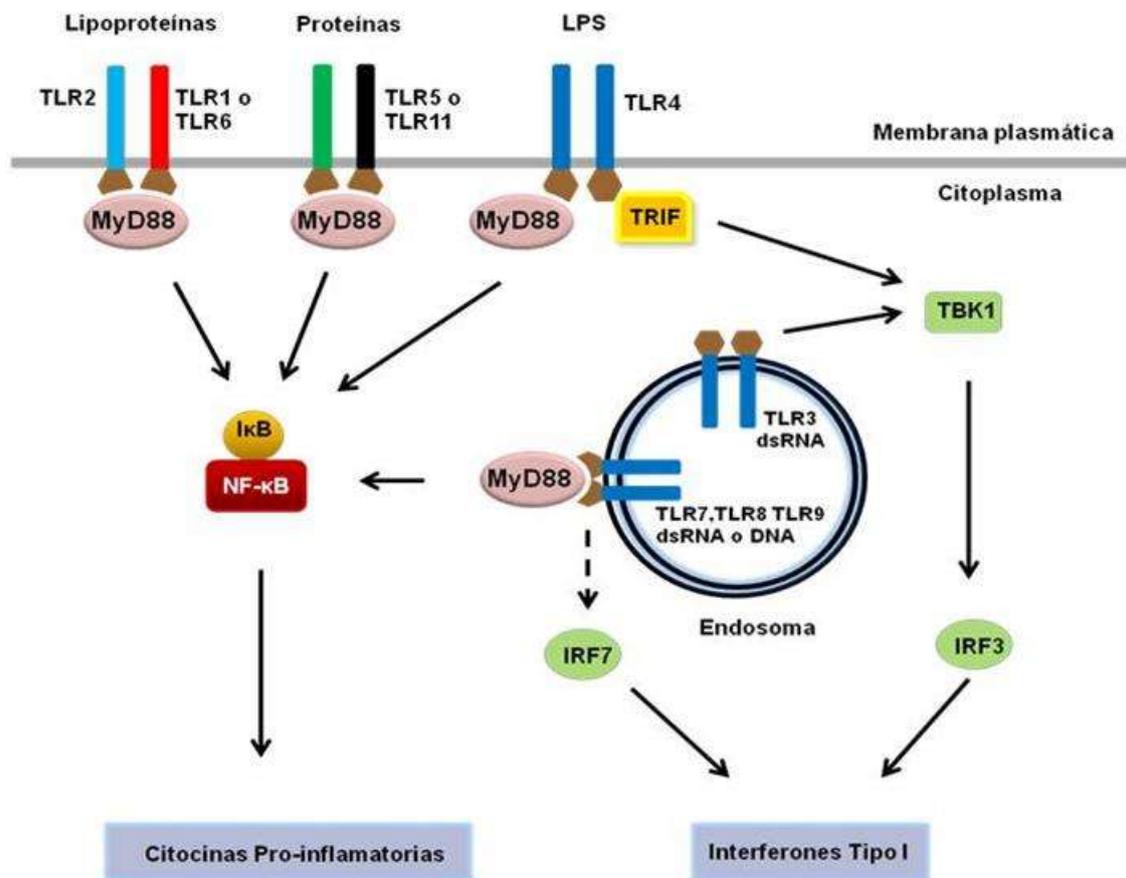


Figura 4. Representación esquemática de las vías de señalización de los TLR. La señalización de los TLR se inicia cuando reconocen a sus ligandos específicos. Los TLR que señalizan a través de la vía dependiente de MyD88, inician una compleja señalización la cual involucra diversas proteínas resultando en la activación del NF- κ B lo que genera la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , entre otras; así como en la activación de IRF7 induciendo la expresión de interferon tipo I. La señalización independiente de MyD88 involucra a la proteína TRIF, la cual se asocia con la proteína cinasa TBK1 e induce la fosforilación del factor de transcripción IRF3 permitiendo la expresión de intereferon tipo I. IKB: Inhibidor del factor nuclear kappa-B; IRF: Factor regulador de IFN; MyD88: Gen 88 de la repuesta primaria de la diferenciación mieloide; NF- κ B: Factor nuclear κ -B; TBK1: Cinasa que se une TANK; TLR: Receptor tipo Toll; TRIF: Adaptador que contiene la región TIR [modificado de 26].

La señalización de TLR4 activa la vía mediada por el dominio TIR y moléculas adaptadoras como MyD88 e inicia una compleja señalización la cual involucra a las cinasas IRAK1 e IRAK4, al factor TRAF6 y proteínas cinasas activadas por mitógeno resultando en la activación del NF- κ B lo que genera la expresión de citocinas pro-inflamatorias como: IL-1 β , IL-6, TNF- α , entre otras [27]. Por otro lado, la activación de

los TLR es regulada por varios mecanismos los cuales incluyen la producción de citocinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10 que asegura una adecuada regulación del balance pro- y anti-inflamatorio [29].

Recientemente se ha demostrado un aumento en la expresión de TLR4 y TLR2 en células endoteliales y macrófagos de lesiones aterosclerosas de ratón y humanas que han sido asociadas con la actividad inflamatoria [30, 31]. En monocitos de sangre periférica de personas sanas la LDL modificada oxidativamente incrementa la expresión del transcrito para TLR4 pero no de TLR2 [30]; en contraste, se ha demostrado que la LDLox al inducir células espumosas incrementa la expresión génica de TLR2 en macrófagos [32], también se ha demostrado (en el modelo porcino miniatura) que el incremento de la proteína y del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) para TLR2 se correlaciona de forma positiva con el aumento de la LDLox en la placa aterosclerosa [33]. En ratones ApoE^{-/-} al ser alimentados con una dieta rica en grasas se demostró que conforme aumenta la edad de los animales incrementa el RNAm para TLR2 en la placa aterosclerosa; al comparar las placas aterosclerosas de ratones ApoE^{-/-} y ApoE^{-/-}TLR2^{-/-} se determinó una reducción de la placa aterosclerosa en los ratones ApoE^{-/-}TLR2^{-/-} así como una disminución de la quimiocina MCP-1 lo que produjo menor infiltrado de macrófagos en el sitio de la lesión [27]; otro grupo determinó en ratones ApoE^{-/-}TLR4^{-/-} una reducción del 24% de la placa aterosclerosa, comparado con el ratón ApoE^{-/-}. Como apoyo a estas evidencias está el hecho de la participación de la molécula MyD88 en el desarrollo de la lesión; dos reportes por separado demuestran el papel de la molécula adaptadora MyD88 en la enfermedad aterosclerosa, usando ratones ApoE^{-/-}MyD88^{-/-}, las investigaciones revelaron una reducción del 65% en el tamaño de la lesión [34, 35].

Se ha reportado que la LDLmm al parecer se une a CD14 y mediante la vía TLR4/MD2 induce al “spreading” en macrófagos por la polimerización de F-actina [36]. Por otro lado, se ha reportado que la deficiencia de CD14 en ratones induce la disminución de citocinas pro-inflamatorias así como un retardo en la activación del NF- κ B en respuesta al LPS [37], mientras que el polimorfismo C269T en el promotor de CD14 es asociado con un aumento en la densidad de CD14 y es identificado como un factor de riesgo de infarto del miocardio, lo cual es apoyado por el hecho de que se encontró un aumento en la densidad de CD14 en monocitos de pacientes diabéticos con enfermedad cardiovascular comparado con pacientes no diabéticos [38, 39].

La importancia de la vía de TLR4 en aterosclerosis humana es apoyada por datos obtenidos en la población de Bruneck, Italia, en la que se demostró que el polimorfismo D299G de TLR4 atenúa la señalización del receptor asociándose con una disminución de riesgo de aterosclerosis [40]; sin embargo, otros estudios no apoyan estos descubrimientos [39]. Por consiguiente, estos datos sugieren un papel potencial de CD14, TLR4 y TLR2 en el fenómeno inflamatorio en respuesta a lipoproteína de baja densidad modificada oxidativamente.

Planteamiento del problema.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica en la que uno de los posibles factores que inducen esta respuesta es la LDL modificada oxidativamente induciendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias como: IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ , entre otras. La importancia de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en aterosclerosis es apoyada por datos obtenidos en modelos animales con un fondo genético deficiente de estos receptores, los cuales presentan una disminución significativa de la aterosclerosis aórtica estableciendo un papel claro de estos receptores en la enfermedad. A pesar de que aún no existen conocimientos suficientes que demuestren el posible mecanismo que provoca el fenómeno pro-inflamatorio, diversas evidencias han demostrado que CD14, TLR4 y TLR2 son esenciales en las respuestas inflamatorias y al parecer contribuyen de forma importante en la enfermedad aterosclerosa; por lo que fue adecuado plantear:

¿Cuál es el papel de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias al estímulo de la LDLmm en monocitos?

Hipótesis.

La activación de CD14, TLR4 y TLR2 por la LDLmm inducirá la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en monocitos provenientes de individuos sanos.

Objetivos.

General.

- * Demostrar que la LDLmm activa a los monocitos a través de CD14, TLR4 y TLR2 induciendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Específicos.

- * Determinar si la LDLmm es capaz de inducir la secreción de interleucinas en monocitos provenientes de sujetos sanos.
- * Determinar si la secreción de estas interleucinas depende de la activación de la vía CD14 & TLR4.
- * Determinar si la secreción de estas interleucinas depende de la activación de la vía TLR2.

Diseño experimental.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social y se condujo de acuerdo a las Guías de Declaración de Helsinki.

Tipo de estudio.

Se realizó un estudio experimental, transversal y prospectivo.

Población de estudio.

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

Criterios de inclusión.

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

Criterios de Exclusión.

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

Criterios de Eliminación.

1. Negativa a firmar consentimiento informado.

2. Donadores en los que no se logre obtener el número de monocitos necesarios para los experimentos.

Variables independientes.

- I. Células provenientes de los donadores:

Sujetos sanos.

- II. Lipoproteína de baja densidad mínimamente modificada (LDL mm).^a

Escala de medición: Presente o ausente.

Tipo de variable: Nominal.

Variables dependientes.

- I. Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias IL-1 β , IL-6 e IL-10.^b

Escala de medición: Variable de razón.

Tipo de Variable: Cuantitativa continúa.

^a **Definición conceptual:** La LDL modificada oxidativamente se considera cuando es modificada artificialmente por iones cobre, que catalizan la lipoperoxidación lipídica, generando hidroperóxidos de lípidos, peróxidos cíclicos y fragmentación lipídica.

Definición operacional: LDL nativa oxidada con iones cobre durante 1 hora a 37° C, con un grado de oxidación medida por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

^b **Definición conceptual:** Citocina pro-inflamatoria es una proteína producida por células activadas, participando en la inducción, expresión y regulación de otras moléculas inflamatorias. Citocina anti-inflamatoria es una proteína cuya principal función es inhibir a células activadas y por tanto, manteniendo un control homeostásico de las reacciones inmunitarias innatas y mediadas por células.

Definición operacional: Se consideran citocinas pro-inflamatorias a IL-1 β e IL-6; e interleucina anti-inflamatoria a IL-10. Para ambas se realizarán mediciones de proteína en el sobrenadante del cultivo celular mediante citometría de flujo.

Materiales y Métodos.

Obtención de la LDL nativa (LDL_n).

La LDL nativa (LDL_n) se recuperó de plasma de donadores sanos y ajustó a una densidad de 1.2 g/mL a 4° C por adición de KBr (J.T. Baker, New Jersey, USA)-NaCl (Caledon Laboratories Ltd, Georgetown, USA), posteriormente se realizó un gradiente de densidad a 4° C que consistió en 2.5 mL de plasma a una densidad de 1.2 g/mL y 2.5 mL de solución salina a una densidad de 1.006 g/mL en tubos de policarbonato a 4° C (las densidades se corroboraron por el método del picnómetro) y se centrifugó 4 horas a 80,000 rpm a 4° C en microultracentrífuga (Sorvall Discovery M150 SE en rotor S80AT3), después se separó la banda correspondiente a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) localizada a una densidad de 1.006 g/mL y adicionaron 2 mL de solución salina de densidad 1.065 g/mL por adición de KBr (J.T. Baker), se centrifugó nuevamente 4 horas a 80,000 rpm a 4° C. Finalizado el tiempo de centrifugación se recuperó la banda de la superficie la cual corresponde a la LDL_n, se concentró y dializó contra 1 L de regulador de fosfatos-cloruro de sodio (PBS) 1X libre de EDTA a un pH de 7.4 toda la noche a 4° C y se le determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Análisis de la LDL_n.

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

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

$LDL = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{Triglicéridos}/5)$.

Oxidación de la LDLn.

La concentración de proteínas de la LDLn se ajustó a 300 µg/mL con PBS libre de EDTA (Sigma-Aldrich) y se adicionó $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (Sigma-Aldrich) quedando una concentración final de 10 µM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. La muestra se incubó a 37° C, durante 1 hora y al terminar el tiempo de incubación se detuvo la reacción colocando el tubo en hielo. La LDLmm se dializó en 1 L de PBS-EDTA (Sigma- Aldrich) 0.5 mM a un pH de 7.4 durante toda la noche a 4° C. La determinación del grado de oxidación de la LDL se realizó por la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Determinación del grado de oxidación por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

En tubos por separado se colocaron 100 µg de LDLn y LDLmm respectivamente, y se adicionaron 2 mL de H_2SO_4 (J.T. Baker) 4 M y 0.25 mL de ácido fosfotúngstico (Caledon Laboratories Ltd) al 10%, se mezcló e incubó a temperatura ambiente 5 minutos, a continuación se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de H_2SO_4 4 M más 0.15 mL de ácido fosfotúngstico al 10% y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente; al término de la incubación se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se removió y el paquete se resuspendió con 2 mL de agua destilada y 0.5 mL de ácido 2- tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó 1 hora en baño de agua a 95° C y posteriormente los tubos se colocaron en hielo y se les adicionaron 2.5 mL de 1-butanol (Caledon, Ontario, Canadá) y se centrifugó a 2000 rpm. Se preparó una curva estándar de malonaldehído (MDA) (Sigma-Aldrich) con cantidades equimolares de MDA bajo las

condiciones de reacción utilizando TBA (Sigma-Aldrich) como estándar y se determinó la densidad óptica de las muestras y estándares a 535 nm.

Detección de endotoxinas mediante el ensayo de lisado de amebocitos de

Limulus.

A todas las preparaciones de LDLn y LDLmm, se les realizó la detección de endotoxinas utilizando el kit de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) por el método de “gel clot” (Charles River Endosafe, Charleston, S.C.). El estándar de endotoxinas (LPS de *Escherichia coli*) y el reactivo de LAL se reconstituyeron con agua libre de endotoxinas. En tubos por separado se colocaron 100 µL de LDLn y LDLmm y a cada tubo se les adicionó 100 µL del reactivo LAL, posteriormente se incubaron a 37° C por 1 hora en baño maría. Se realizó una curva estándar con el LPS de *Escherichia coli* de 0.03 EU/mL a 0.5 EU/mL bajo las condiciones de reacción para las lipoproteínas. Las lecturas de las muestras y estándares se realizaron invirtiendo cada tubo en un ángulo de 180°. Si se forma un gel intacto que no se desprende del tubo, entonces se considera positivo, cualquier otra condición se interpretó como un resultado negativo. Las muestras positivas se descartaron y sólo se usaron las que resultaron negativas en los experimentos.

Obtención de células mononucleares.

Las células mononucleares se obtuvieron de concentrados leucocitarios, los cuales se diluyeron 1:5 en PBS 1X a pH de 7.4 y se adicionaron 7 mL de la sangre diluida sobre una capa de 3mL de Lymphoprep (Axis-Shield, Cambridgeshire, UK) y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm por 30 minutos. Las células mononucleares se removieron de la interfase y se lavaron dos veces con PBS 1X a 1200 rpm a 15 y 10 minutos por lavado, respectivamente; después se resuspendieron con 2 mL de PBS 1X pH de 7.4, -BSA 0.5%, -EDTA 0.05 mM.

Purificación de monocitos.

La purificación de monocitos se realizó utilizando el Kit II para aislamiento de monocitos por selección negativa (Miltenyi Biotec MACS, Bergish Gladbach, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las células mononucleares se resuspendieron en regulador PBS-BSA al 0.5%-EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich) a 10^7 células/mL en 80 μ L de PBS-BSA 0.5%-EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich), y se adicionaron 20 μ L del cocktail de anticuerpos biotinilados contra CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 y glicoforina A; se incubó a 4° C durante 10 minutos en oscuridad, se lavaron dos veces con 1 mL de regulador, y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. El paquete celular se resuspendió en 80 μ L del regulador y se adicionaron 20 μ L de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-biotina, y se incubó a 4° C durante 15 minutos en oscuridad. Posteriormente, el paquete celular se lavó con regulador y se resuspendió en 500 μ L de regulador y se pasaron por la columna de separación LS MACS (Miltenyi Biotec MACS), se lavó la columna y se recuperó la fracción negativa. Las células recuperadas fueron teñidas con anti-CD14FITC y la pureza determinada por citometría de flujo. Se determinó la viabilidad celular por exclusión con la tinción de azul tripan.

Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2.

Los monocitos fueron cultivados en medio de cultivo RPMI en placas de 96 pozos a una concentración de 2×10^5 células/pozo. En los ensayos de bloqueo, los monocitos fueron preincubados 1 hora a 37° C con 10 μ g/mL de anti-CD14 (Clona MEM10, BD Biosciences, San Jose, California, USA) o anti-TLR4 (clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) y en presencia de ambos anticuerpos, posteriormente se estimularon con 100 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* serotipo O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Por otro lado, los monocitos fueron tratados

con 10 µg/mL de anticuerpo anti-TLR2 (clona TL2.1, eBioscience Inc, San Diego, California, USA) por 1 hora a 37° C y se estimularon con 20 ng/mL de Pam3CSK4 (Alexis Biochemicals, Plymouth Meeting, PA, USA). Como control adicional, las células fueron tratadas con 10 µg/mL de anticuerpo no relacionado antes de la estimulación con los ligandos de los TLR. Como testigo negativo, los monocitos fueron incubados sólo con medio de cultivo o con anticuerpo no relacionado pero sin agonistas. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados después de 24 horas de incubación a 37° C y se conservaron a -70° C.

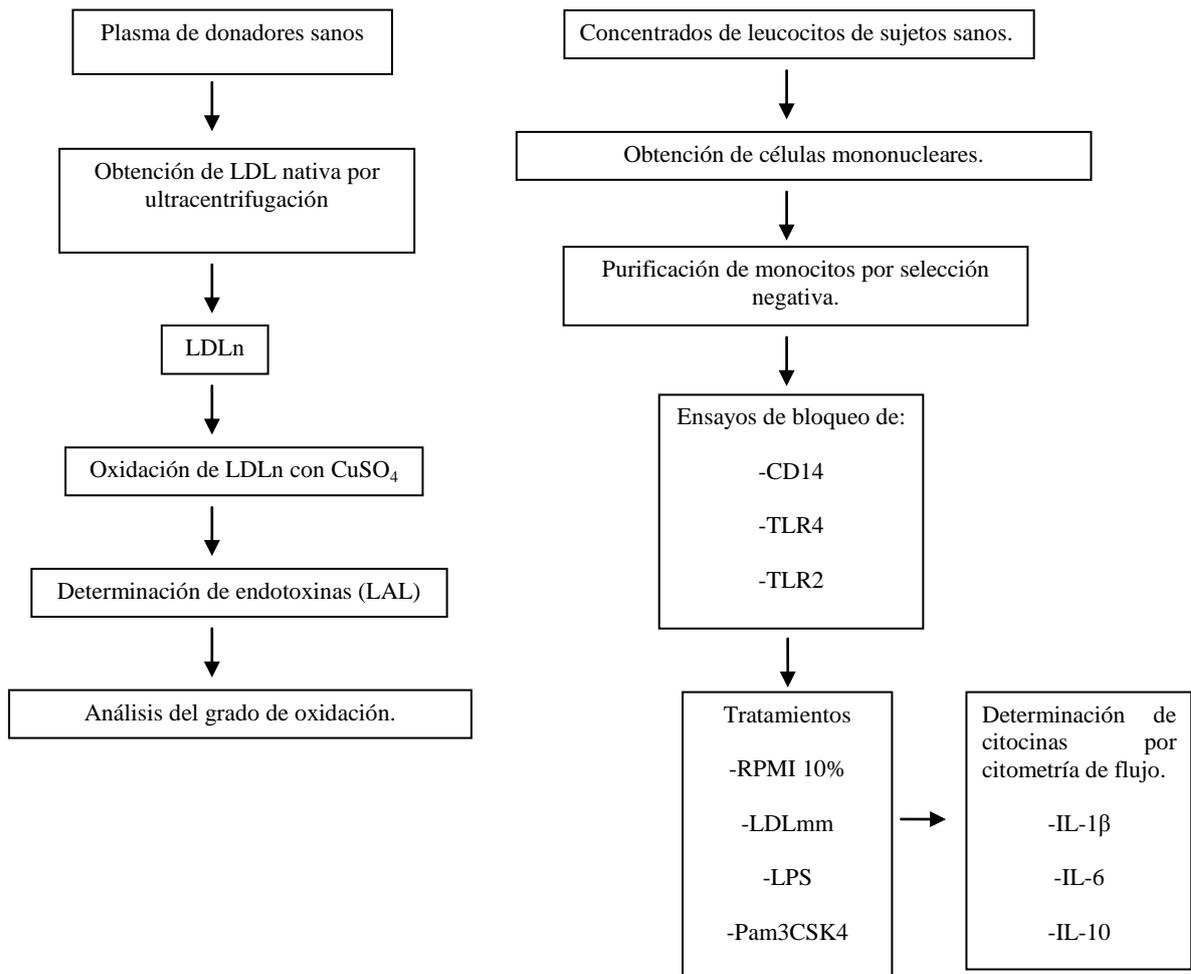
Ensayos de bloqueo de CD14, TLR4 y TLR2 al estímulo de la LDLmm.

Para los experimentos de bloqueo los monocitos fueron tratados con 10 µg/mL anticuerpo anti-CD14 (BD Biosciences) o 10 µg/mL anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology), y la combinación de ambos durante 1 hora a 37° C. Mientras tanto, en otro ensayo los monocitos fueron tratados con 10 µg/mL de anti-TLR2 (eBiosciences) por 1 hora a 37° C. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo y se estimularon con 64 µg/mL de LDLmm durante 24 horas a 37° C. Como control de anticuerpo, las células fueron tratadas con un anticuerpo no relacionado seguido del estímulo de la LDLmm. Como testigo negativo, los monocitos fueron incubados sólo con medio de cultivo o con anticuerpos no relacionados pero sin la LDLmm. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados después de 24 horas de incubación a 37° C y se conservaron a -70° C.

Determinación de citocinas por citometría de flujo.

Los niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-10 se cuantificaron en los sobrenadantes de los monocitos por citometría de flujo usando el kit “Cytometric Bead Array (CBA)” (BD Biosciences). Brevemente, los estándares fueron diluidos (de 5 a 5000 pg/mL). Un volumen de 50 μ L de las diluciones de los estándares y las muestras fueron colocadas en tubos y se mezclaron con 50 μ L de perlas de captura recubiertas con anticuerpos específicos contra las citocinas: IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70, y se adicionaron 50 μ L del reactivo de detección de citocinas marcado con PE. Los estándares y muestras fueron incubados por 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. La expresión de las citocinas fueron determinadas usando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View).

Diagrama de flujo.



Diseño estadístico.

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de Mann–Whitney. El nivel de significancia en todos los casos fue de una $p \leq 0.005$. El análisis fue realizado utilizando el programa de cómputo SPSS 15.0 para WINDOWS.

Resultados.

Pureza de los monocitos.

Los monocitos se purificaron a partir de células mononucleares humanas por selección negativa y la pureza celular se evaluó por citometría de flujo marcando las células con el anticuerpo monoclonal anti-CD14FITC. El porcentaje de células CD14+ fue superior al 96% (Figura 5) y la viabilidad celular se determinó por exclusión con la tinción de azul tripan, la cual fue mayor al 90% en todos los casos.

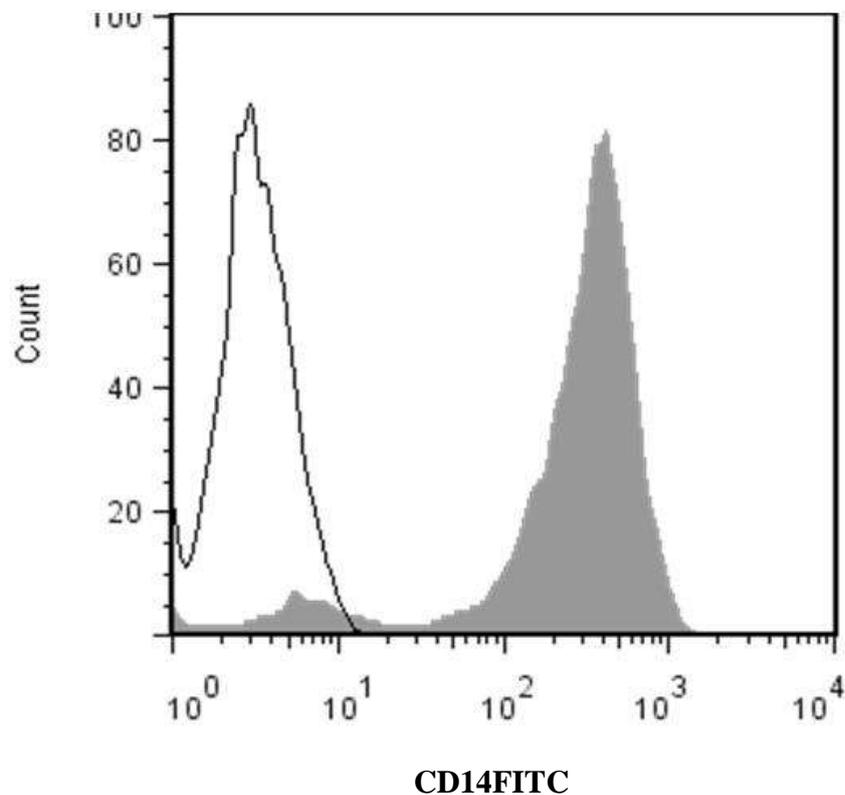


Figura 5. Determinación de la pureza de los monocitos. Histograma representativo de la expresión de CD14 en monocitos purificados por selección negativa. Histograma en blanco: control de isotipo. Histograma gris: CD14FITC.

Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2.

Para validar la capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2, los monocitos se preincubaron con los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y ambos anticuerpos y, posteriormente se estimularon con LPS como testigo positivo de la activación de la vía CD14/TLR4. Por otro lado los monocitos se incubaron previamente con anticuerpo anti-TLR2 y después se estimularon con Pam3CSK4 como testigo positivo de la activación de TLR2. Se encontró que los anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4 inhiben la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en monocitos en respuesta a LPS (barras blancas de la Figura 6A, 6B y 6C, respectivamente) y, en el mismo sentido, el bloqueo de TLR2 indujo una inhibición en la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10 (barras negras de la Figura 6A, 6B y 6C, respectivamente).

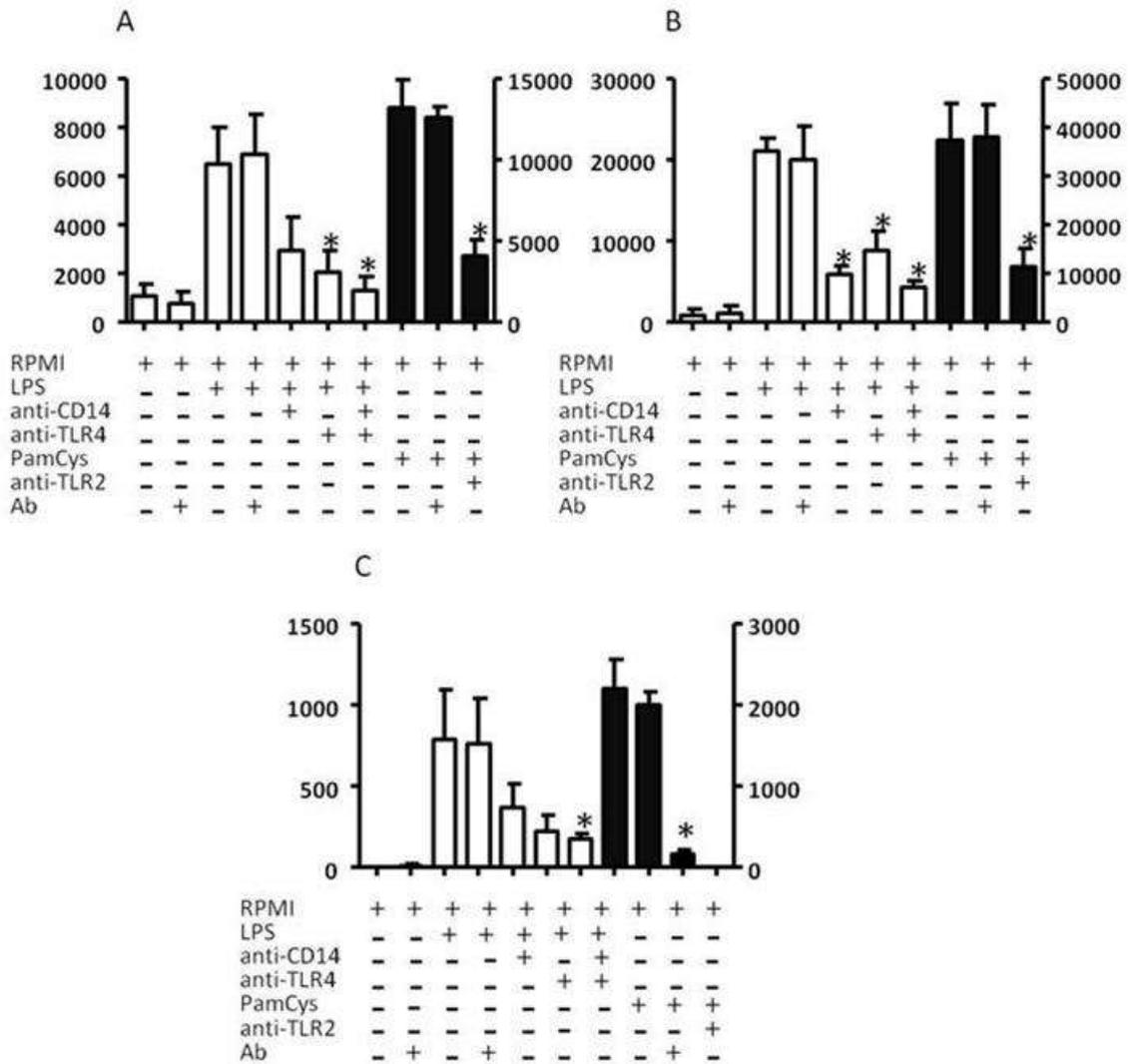


Figura 6. Capacidad de inhibición de los anticuerpos contra CD14, TLR4 y TLR2 determinada por la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Los monocitos fueron tratados con anticuerpo anti-CD14, anti-TLR4 o ambos y anti-TLR2 y estimulados con LPS y PAM3CSK4. Adicionalmente los monocitos fueron incubados con anticuerpo no relacionado en presencia o ausencia de los ligando de TLR. Se recolectaron los sobrenadantes y después de 24 horas y se determinaron las concentraciones IL-1 β (A), IL-6. (B) e IL-10 (C) por CBA. Los valores de las barras blancas se asocian con el eje Y de la izquierda y los valores de las barras negras se asocian con el eje Y de la derecha. * $p < 0.005$.

Caracterización de la LDL.

La LDLn se obtuvo por ultracentrifugación y a las muestras obtenidas se le determinó la expresión de HDL la cual fue de 0% y de VLDL que fue en promedio del 2%, la pureza de la LDL en promedio fue de 98% (Figura 7). Entonces, la LDL se oxidó con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y se determinó el grado de oxidación por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, el grado de oxidación promedio de la LDLn fue de 0.71 nmol/mL de equivalentes de malonaldehído y para la LDL modificada oxidativamente fue en promedio de 2.5 nmol/mL equivalentes de malonaldehído la cual se designó como LDLmm (Figura 8). Antes de realizar los ensayos para determinar el efecto biológico de la LDLmm sobre los receptores CD14, TLR4 y TLR2 se realizó la prueba de detección de endotoxinas a las preparaciones de LDL a través del ensayo de lisado de amebocitos de *Lymulus* y resultaron negativas.

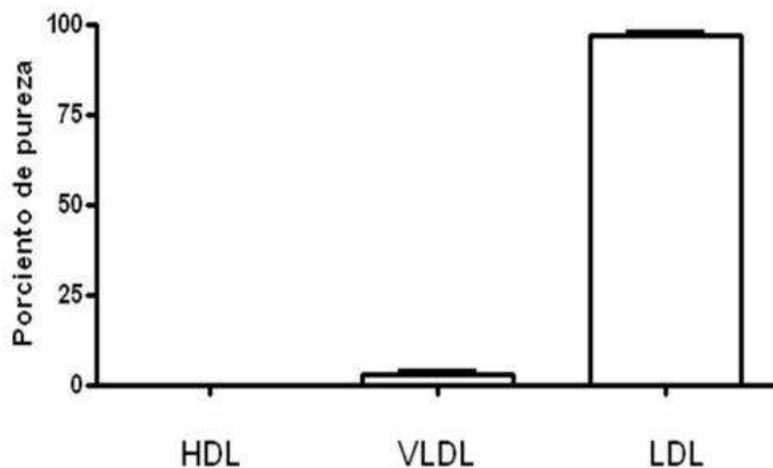


Figura 7. Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación. Cuantificación de las moléculas de lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL) de 5 extracciones de LDLn obtenidas de forma independiente.

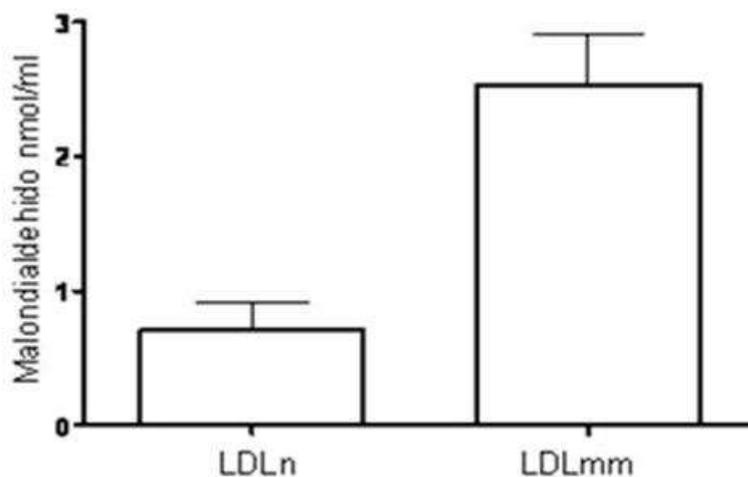


Figura 8. Grado de oxidación de LDLn y LDLmm. 300 $\mu\text{g/mL}$ de LDLn fueron oxidados con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a una concentración final de 10 μM durante una hora a 37° C. El grado de oxidación se cuantificó en 100 $\mu\text{g/mL}$ de LDLn y 100 $\mu\text{g/mL}$ de LDLmm, por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Los niveles de oxidación se expresan en equivalentes de malonaldehído (La reacción se midió a 535 nm).

La LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6 a través de CD14 y TLR4.

La estimulación con LDLmm provocó la secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6. Al bloquear el receptor CD14 previo a la estimulación con LDLmm, se observó una disminución en la secreción de IL-1 β del 72%, al bloquear TLR4 del 67% y al bloquear ambos receptores del 73% con respecto al control positivo (Figura 9A); asimismo se observó una disminución de IL-6 del 58% al bloquear CD14, del 63% al bloquear TLR4 y del 69% al bloquear ambos receptores con respecto al control positivo (Figura 9B). Al tratar las células con un anticuerpo no relacionado no se afecta la secreción de estas citocinas.

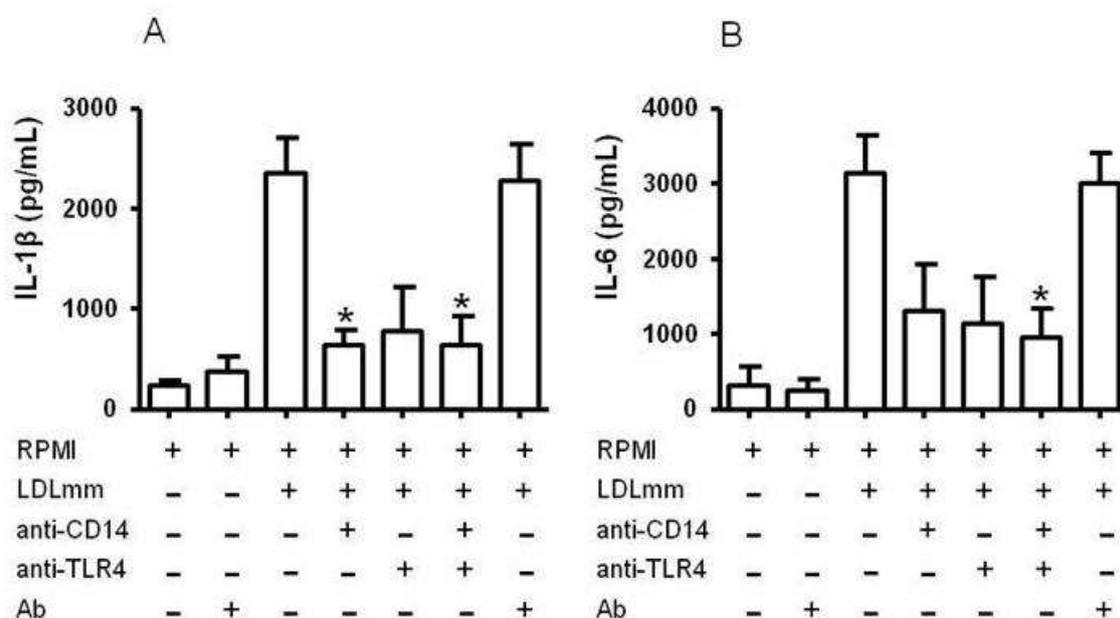


Figura 9. Inhibición de la secreción de IL-1 β e IL-6 por el bloqueo de CD14 y TLR4. Las células fueron estimuladas con 64 μ g/mL de LDLmm. Para bloquear a estos receptores, las células fueron tratadas con 10 μ g/mL de anti-CD14 y/o anti-TLR4 antes de ser estimuladas con la LDLmm.. A) Niveles de secreción de IL-1 β . B) Niveles de secreción de IL-6. * p <0.005.

La LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6 a través de TLR2.

La estimulación con LDLmm provocó la secreción de IL-1 β e IL-6 (Figuras 10A y 10B). Al bloquear TLR2 previo a la estimulación con LDLmm se observó una disminución en la secreción de IL-1 β del 65% (Figura 10A); así como de IL-6 del 62% (Figura 10B) con respecto a sus testigos positivos. Al tratar las células con un anticuerpo no relacionado no se afecta la secreción de estas citocinas.

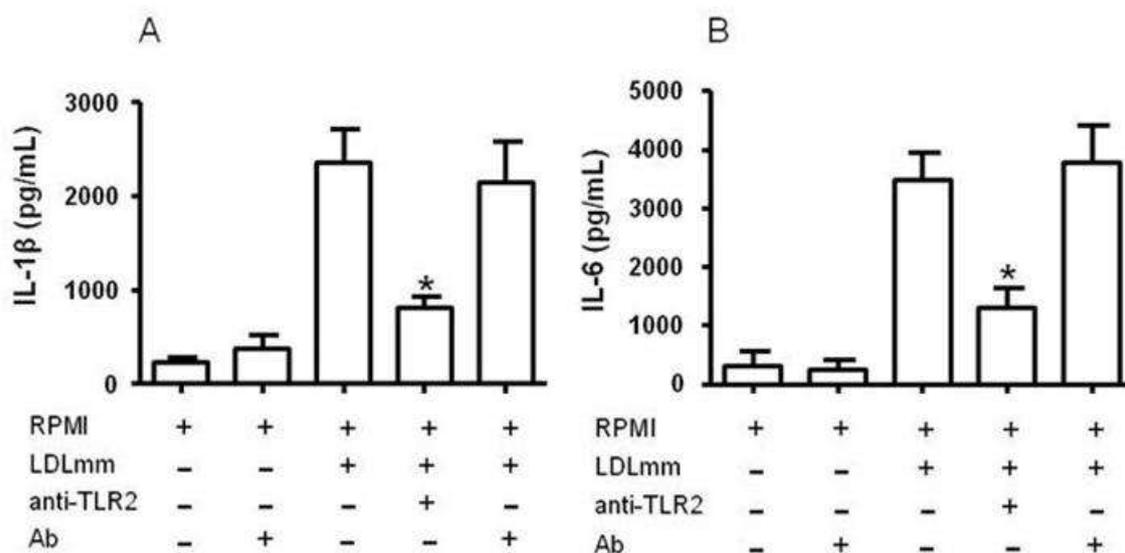


Figura 10. Inhibición de la secreción de IL-1 β e IL-6 por el bloqueo de TLR2. Las células fueron estimuladas con 64 μ g/mL de LDLmm. Se bloqueó TLR2 con anticuerpo monoclonal anti-TLR2 (10 μ g/mL), previo a la estimulación con la LDLmm.. A) Niveles de secreción de IL-1 β . B) Niveles de secreción de IL-6. * p <0.005.

La LDLmm induce la secreción de IL-10 a través de CD14, TLR4 y TLR2.

La estimulación con LDLmm también provocó la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Al bloquear a CD14 previo a la estimulación con LDLmm se observó una disminución en la secreción de IL-10 del 63%, así como, una disminución del 60% al bloquear a TLR4 y del 63% al bloquear a ambos receptores para esta misma citocina (Figura 11A); además se observó una disminución en la secreción de IL-10 del 75% al bloquear TLR2 (Figura 11B). Cuando las células fueron tratadas con un anticuerpo no relacionado no se afectó la secreción de IL-10.

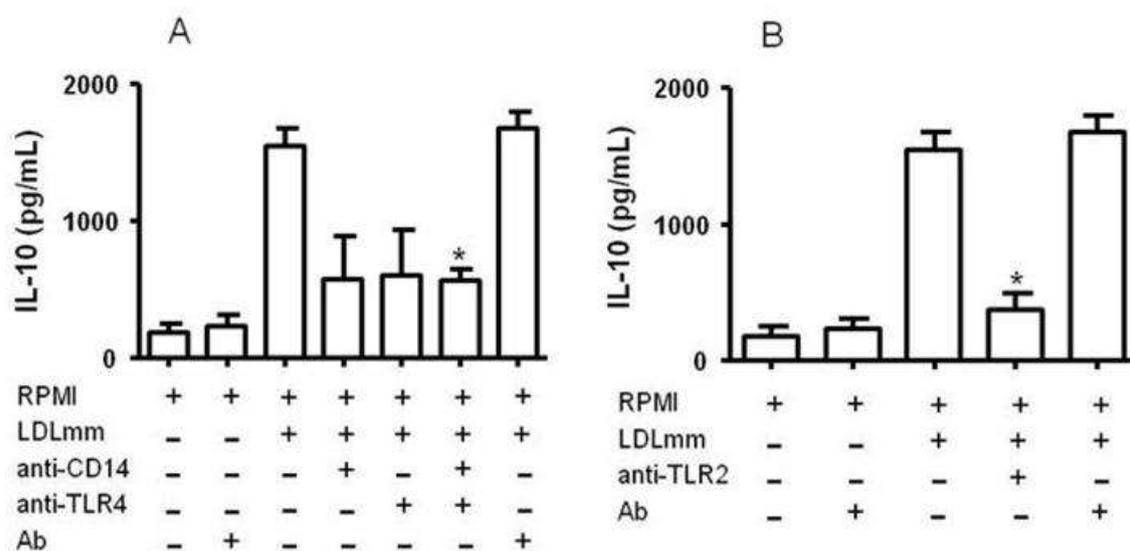


Figura 11. Inhibición de la secreción de IL-10 por el bloqueo de CD14, TLR4 y TLR2. Los monocitos fueron tratados con anticuerpos anti-CD14, y/o anti-TLR4, o anti-TLR2 (10 µg/mL) previo a la estimulación con la LDLmm (64 µg/mL). A) Niveles de secreción de IL-10 bloqueando CD14, TLR4 y ambos. B) Niveles de secreción de IL-10 bloqueando TLR2. * $p < 0.005$.

Análisis de resultados.

La aterosclerosis es actualmente considerada una enfermedad inflamatoria crónica en la que los monocitos son críticos y están involucrados diversos factores de riesgo como las altas concentraciones de LDL en plasma. Varios estudios han demostrado que las modificaciones oxidativas a la LDL influyen en el desarrollo de la placa aterosclerosa a través de una respuesta inflamatoria [10, 11]; además se han involucrado a receptores de la inmunidad innata en esta enfermedad, especialmente TLR4 y TLR2 demostrándose un incremento en la expresión de estos receptores en la placa y considerándose la posibilidad de que estos receptores sean activados por el reconocimiento de la LDL modificada oxidativamente iniciando o acelerando el fenómeno inflamatorio [30, 31].

Inicialmente fue evaluada la especificidad de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 y se demostró que los anticuerpos anti-CD14, y anti-TLR4 fueron capaces de inhibir la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en presencia de LPS y de forma similar el anticuerpo anti-TLR2 inhibió la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10 al estímulo de Pam3CSK4.

Los resultados muestran que la LDLmm induce un incremento en la secreción de IL-1 β e IL-6 en monocitos y dicho aumento concuerda con datos obtenidos por otros autores, los cuales encontraron que los monocitos expresan un aumento en la secreción de las mismas citocinas bajo el estímulo de LDLox [41].

En este trabajo se investigó la participación del correceptor CD14 en la secreción de IL-1 β e IL-6 en respuesta a LDLmm y los resultados muestran que el bloqueo de CD14 resulta en una considerable reducción en la producción de IL-1 β e IL-6 en monocitos cuando son estimulados con LDLmm. Estos datos son consistentes con estudios previos en los cuales se demostró que el bloqueo de CD14 en monocitos provoca una inhibición

significativa en la secreción de IL-1 β e IL-6 al estímulo de LDLox [41], más aún se ha demostrado que el bloqueo de CD14 ocasiona una reducción en la producción de TNF- α en monocitos en presencia de LDLmm [43]. Con estos resultados se sugiere que la activación de CD14 participa en la respuesta inflamatoria a la LDLmm.

Los TLR son esenciales en la respuesta inmune innata y al interactuar con los PAMP inducen la expresión de citocinas pro-inflamatorias [44]. Los resultados obtenidos demuestran que la LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6 a través de TLR4, estos resultados son apoyados por estudios previos que demuestran que el bloqueo de TLR4 en monocitos y macrófagos inhibe la secreción de TNF- α al estímulo de la LDLmm [43]; además, se ha demostrado que el bloqueo de TLR4 en macrófagos afecta la producción de TNF- α al estímulo de productos finales de la glicosilación avanzada de la LDL [45].

Se ha demostrado que la vía CD14/TLR4 es crítica en la activación de células presentadoras de antígenos [42, 46] por lo que se analizó esta vía en respuesta a la LDLmm, los resultados muestran que la secreción de IL-1 β e IL-6 al estímulo de la LDLmm se inhibe al bloquear a CD14 y TLR4 sugiriendo que ambos receptores participan en la respuesta pro-inflamatoria mediante la secreción de IL-1 β e IL-6 en respuesta a la LDLmm, estos resultados son apoyados por estudios previos donde se demuestra que el bloqueo de CD14 y TLR4 inhibe la secreción de TNF- α en monocitos y macrófagos al estímulo de la LDLmm [43, 45].

Estudios previos han establecido el papel de TLR2 en el desarrollo de la lesión aterosclerosa y han sugerido que antígenos endógenos puedan activarlo [47, 48] por lo que también se investigó la participación de este receptor al estímulo de la LDLmm y se demostró que la secreción de IL-1 β e IL-6 es también dependiente de TLR2 sugiriendo su participación en la secreción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LDLmm.

Resultados similares han demostrado que antígenos endógenos inducen la secreción de TNF- α a través de TLR2 [49].

Los resultados obtenidos indican que la activación de CD14, TLR4 y TLR2 por la LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6; ambas citocinas activan las células endoteliales induciendo la expresión de quimiocinas como la MCP-1 y sobre-regulan las moléculas de adhesión, facilitando la adhesión de leucocitos sobre las células endoteliales [50, 51] lo cual contribuye o exacerba la respuesta inflamatoria durante la aterosclerosis.

Por otro lado, se demuestra que la LDLmm induce la secreción de IL-10 a través de CD14, TLR4 y TLR2, ya que el bloqueo de estas vías produjo disminución en la secreción de esta citocina. Evidencias previas demuestran que la LDLox induce la secreción de IL-10 [52] y otros reportes indican que la LDL mínimamente oxidada induce la expresión del RNAm de IL-10 en macrófagos [53]. Esto sugiere que la LDLmm induce la secreción de IL-10 posiblemente para mantener un balance pro-inflamatorio y anti-inflamatorio [54, 55].

Conclusión.

Los resultados obtenidos demuestran que la LDLmm activa a los monocitos a través de CD14, TLR4 y TLR2 induciendo la secreción de IL-1 β e IL-6 y, además induce la secreción de IL-10.

Propuestas y/o recomendaciones

- * Con base en los resultados obtenidos se propone analizar la ruta de activación de estos receptores a través de la determinación de la fosforilación de NF- κ B y MAPK en respuesta a LDLmm.
- * Otra alternativa para el análisis de la activación de CD14, TLR4 y TLR2 con LDLmm sería a través de células provenientes de ratones deficientes de estos receptores.

Referencias.

1. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Trends in mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the World. *Heart* 2002;88:119-124.
2. Sistema Nacional de Información en Salud. Principales causas de mortalidad en edad productiva (de 15 a 64 años) y Principales causas de mortalidad en edad posproductiva (65 años y más). Modificado el 27 de Octubre de 2010. [Consultado el 22 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
3. Ruesga ZEA. *Cardiología. México: El Manual Moderno*; 2005. pp. 535-540.
4. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson K. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med* 2000;247:397-495.
5. Ross R. Mechanisms of disease. *New Engl J Med* 1999;340:115-126.
6. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
7. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 2001;42:1346-1367.
8. Krisko A, Etchebest C. Theoretical model of human apolipoprotein B-100 tertiary Structure. *Proteins* 2007;66:358-432.
9. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 2005;74:535-562.
10. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-USmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res* 2006;22:924-932.
11. Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1649-1654.
12. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA Jr. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:14871-14876.
13. Brauersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Trimb Haemost* 2007;97:714-721.
14. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbrario M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36- dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006;4:211-221.
15. Sociedad Española de Cardiología [Sitio en internet]. Grupo de Trombosis Cardiovascular. [Consultado: 2010 Oct. 21]. De Kaski JC, Pérez FR. Citoquinas pro y antiinflamatorias en la aterosclerosis. Disponible en: <http://www.gtcv.org/noticia25.php>
16. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin-1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:1024-1208.

17. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.
18. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004;110:3493-3500.
19. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214:149-160.
20. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:63-71.
21. Mahmoudi M, Curzen N, Gallagher PJ. Atherogenesis: the role inflammation and infection. *Histopathology* 2007;50:535-545.
22. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
23. Zhang Z, Schluesener HJ. Mammalian. Toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2006;24:2901-2907.
24. Wolowcsuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, Grangette C. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol* 2008;2008:639-803.
25. Nicholas G, Monique G, Alexander W. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 2010;6:693-968.
26. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007;7:179-190.
27. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-145.
28. Akira S. Toll like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003;278:38105-38108.
29. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of Toll-like receptor mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;6:446-458.
30. Xu XH, Shad PK, Faure E, Equilis O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001;104:3103-3108.
31. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions. A possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002;105:1158-1161.
32. Liu X, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Gibson FC 3rd, Genco CA. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis* 2008;196:146-154.
33. Holvoet P, Davey PC, De Keyser D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with Toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 as inversely with superoxide dismutase-1 expression: Studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cell. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1558-1565.

34. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:10685-10690.
35. Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT, Freeman MW. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nature Med* 2004;10:416-421.
36. Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2003;278:1561-1568.
37. Kenuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Govert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2006;113:2608-2615.
38. Arroyo-Espliguero R, El-Sharnouby K, Vázquez-Rey E, Kalidas K, Jeffery S, Kaski JC. CD14 C (-260) T promoter polymorphism and prevalence of acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2005;98:307-312.
39. Patino R, Ibarra J, Rodríguez A, Yagüe MR, Pintor E, Fernández-Cruz A, Figueredo A. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol* 2000;85:1288-1291.
40. Kiechl S, Lorenz E, Reindel M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Scharz DA. Toll-like receptors 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:185-192.
41. Pasini AF, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, Boccioletti V, Vassanelli C, Cominacini L. Enhanced levels of oxidized low-density lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via upregulation of CD14 and toll-like receptor 4 in unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1991-1997.
42. Shuto T, Kato K, Mori Y, Viriyakosol S, Oba M, Furuta T. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1402-1409.
43. Chávez L, Madrid A, Chávez K, Legorreta MV, Tesoro E, Blanco F. Activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified low-density lipoprotein in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response. *Hum Immunol* 2010;71(8):737-744.
44. Uematsu S, Akira S: Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 2006;9:712-725.
45. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K, Ye S. Advanced glycation end product of low density lipoprotein activates the toll like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2008;28:2275-2281.

46. Kaisho T, Akira S. Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* 2004;15:1388-1394.
47. Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by toll-like receptor 2. *J Clin Invest* 2005;115:3149-1456.
48. Schoneveld AH, Hoefler I, Sluijter JP, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Atherosclerotic lesion development and toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis* 2008;197:95-104.
49. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Makino H: Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1457-1467.
50. Sims JE, Smith DE: The IL-1 family regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:89-102.
51. Gabay C: Interleukin 6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006;8(suppl 2):S3.
52. Fei GZ, Huang YH, Swedendorg J, Frostegård J: Oxidised LDL modulates immune-activation by an IL-12 dependent mechanism. *Atherosclerosis* 2003;169:77-85.
53. Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI. Macrophages Generate Reactive Oxygen Species in Response to Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res* 2009;104:210-218.
54. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002;20:55-72.
55. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220.