



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**PARTICIPACIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD
MÍNIMAMENTE MODIFICADA EN LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS
DE CD14 Y LOS RECEPTORES TIPO TOLL 2 Y/O 4 EN MONOCITOS.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M.en C. LUIS CHAVEZ SANCHEZ

TUTOR RESPONSABLE: DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

**MEXICO D.F..
2011**

Diciembre



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.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Francisco Antonio Blanco Favela.

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.

El sustentante fue becario del CONACYT con registro de becario número 105569, durante sus estudios de doctorado.

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Blanco Favela por su amistad, apoyo incondicional en todo momento, consejos y por su dirección para la realización de esta tesis

A los miembros de mi comité tutorial. Dra. Gloria Soldevila y al Dr. Edgar Zenteno por su amistad y por sus valiosas aportaciones para la realización de esta tesis.

Al jurado de grado: Dr. Ricardo Lascurain, Dra. Carmen Maldonado, Dr. Carlos Rosales y al Dr. Rafael Saavedra por su tiempo y por sus comentarios de esta tesis.

Al personal de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del CMN SXXI, IMSS, en especial a la Dra. Karina Chávez, Dra. Victoria Legorreta y al Dr. Eduardo Montoya por su amistad y por sus consejos.

A Yadira por su amor, por su apoyo en todo momento, comprensión y por siempre estar a mi lado en cualquier circunstancia.

A Daniel por su amor incondicional y por ser el impulso en todo lo que realizó.

A mis papas: Arnulfo Chávez y María de los Angeles Sánchez, por su amor y apoyo que siempre me han brindado.

A mis hermanos: Elsa, Vidal y Miguel Angel por estar siempre a mi lado cuando los necesito.

A todos mis amigos por su amistad desinteresada.

Contenido

	Página
Abreviaturas	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Introducción	1
Justificación	19
Hipótesis	19
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Diseño experimental	21
Materiales y métodos	22
Resultados	33
Discusión	47
Conclusiones	58
Perspectivas	58
Bibliografía	59

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
AGE-LDL	Productos finales de glicosilación de LDL
Apo B	Apolipoproteína B
Apo E	Apolipoproteína E
ATP	Adenosina-trifosfato
CBA	“Cytometric Bead Array”
CD	Grupo de diferenciación
EDA	Dominio extracelular A de fibronectina
G3P	Glicerol-3-fosfato
GPO	Glicerol-3-oxidasa
GK	Glicerol cinasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IKB	Inhibidor del factor nuclear kappa-B
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IFN- γ	Interferón- γ
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina-1
IRF	Factor regulador de IFN
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
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotrayente de monocitos-1
MDA	Malondihaldehído
MDA5	Gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma

MMP	Metaloproteinasas
MyD88	Gen 88 de la respuesta primaria de la diferenciación mieloide
NF- κ B	Factor nuclear kappa-B
Pam3CSK4	Lipopéptido sintético tripalmitoilatado
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PECAM-1	Molécula de adhesión de plaquetas a células endoteliales-1
PMA	Forbol miristato-acetato
RIG	Genes inducibles por el ácido retinoico-1
SFB	Suero fetal bovino
SICA	Síndromes isquémicos coronarios agudos
TBK1	Cinasa de unión a TANK1
TIRAP	Proteína adaptadora del dominio TIR
TIR	Receptor de IL-1 tipo Toll
TLR	Receptor tipo Toll
TRAM	Molécula relacionada al adaptador
TRIF	Adaptador que contiene la región TIR
TNF- α	Factor - α de necrosis tumoral
TRAF	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
VCAM	Molécula de adhesión de células vasculares
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

Índice de figuras

	Página
Figura 1.- Estructura de la lipoproteína de baja densidad	3
Figura 2.- Proceso de lipoperoxidación	4
Figura 3.- Desarrollo de la placa aterosclerosa	8
Figura 4.- Estructura del receptor tipo Toll	13
Figura 5.- Representación esquemática de las vías de señalización de los TLR	16
Figura 6.- Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en la producción de TNF- α	33
Figura 7.- Capacidad de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en inhibir la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10	34
Figura 8.- Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación	35
Figura 9.- Grado de oxidación de la LDL nativa y de la LDL mínimamente modificada	35
Figura 10.- Efecto de la LDLmm en la secreción de TNF- α en monocitos y macrófagos	36
Figura 11.- Efecto de la polimixina en la producción de TNF- α inducida por la LDLmm	37
Figura 12.- Papel de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a la LDLmm en monocitos	38
Figura 13.- Papel de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a la LDLmm en macrófagos	39
Figura 14.- Papel de CD14 y TLR4 en la producción de IL-1 β en respuesta a la LDLmm	40
Figura 15.- Papel de CD14 y TLR4 en la secreción de IL-6 en respuesta a la LDLmm	41
Figura 16.- Papel de TLR2 en la secreción de IL-1 β e IL-6 en respuesta de la LDLmm	42

Índice de figuras

	Página
Figura 17.- Papel de CD14, TLR4 y TLR2 en la secreción de IL-10 en respuesta a la LDLmm	43
Figura 18.- Redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular al estímulo de la LDLmm	45
Figura 19.- Incremento en la expresión de TLR2 y TLR4 al estímulo de la LDLmm	45

Índice de tablas

Tabla 1.- TLR y algunos de sus ligandos

Resumen

La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica. Muchos estudios han mostrado que diferentes formas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidada y los receptores tipo toll (TLR) contribuyen al desarrollo de la lesión aterosclerótica, causando una respuesta inflamatoria. Esta respuesta es caracterizada por la presencia de monocitos/macrófagos los cuales expresan CD14, TLR2 y TLR4 en su superficie y son activados por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos. Sin embargo, no se conoce con claridad el papel que juegan CD14, TLR2 y TLR4 a moléculas endógenas como la LDL modificada oxidativamente. El objetivo de esta investigación fue analizar el papel de CD14, TLR4 y TLR2 en la respuesta a la LDL mínimamente modificada (LDLmm) en monocitos y macrófagos humanos. Los monocitos y macrófagos humanos fueron incubados con anticuerpos monoclonales anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2. Entonces, los monocitos y macrófagos humanos fueron estimulados con la LDLmm por 24 horas y se determinó TNF- α de los sobrenadantes de los cultivos celulares. Los monocitos y macrófagos secretaron TNF- α en respuesta a la LDL. Esta secreción fue inhibida por el bloqueo de CD14, TLR4 y TLR2. Por otro lado, se determinó que el bloqueo de estos receptores también afecta la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10 en respuesta a LDLmm. Así también, determinamos que la LDLmm induce la redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular. Adicionalmente, demostramos que la LDLmm induce la sobre-regulación de TLR4 y TLR2. En este trabajo concluimos que la LDLmm induce la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 a través de CD14, TLR4 y TLR2. El estímulo de la LDLmm induce la redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 e incrementa la expresión de TLR4 y TLR2. Estos resultados proveen nuevas perspectivas para el entendimiento de cual es papel de la LDLmm en el proceso inflamatorio en aterosclerosis.

Abstract

Atherosclerosis is considered a chronic inflammatory disease. Many studies have shown that different forms of oxidized low-density lipoprotein (LDL) and toll-like receptors (TLR) contribute to the development of atherosclerotic lesions, causing an inflammatory response. This response is characterized by the presence of monocytes/macrophages, which express CD14, TLR2, and TLR4 on their surface and are activated by recognition of pathogen-associated molecular patterns. However, the role that these receptors play in the recognition of endogenous ligands such as oxidized low-density lipoprotein is not clear. The aim of this research was to analyze the role of CD14, TLR4, and TLR2 in response to minimally modified LDL (mmLDL) in human monocytes and macrophages. Human monocytes and macrophages were incubated with monoclonal antibodies against to CD14, TLR4, and TLR2 in order to block these molecules. Then, human monocytes and macrophages were stimulated with mmLDL for 24 hours, and TNF- α was determined. Monocytes and macrophages secreted TNF- α in response to mmLDL. This secretion was inhibited after blocking CD14, TLR4, and TLR2. On the other hand, we determined that blockade of these receptors affected the secretion of IL-1 β , IL-6, and IL-10 in response to mmLDL. Moreover, mmLDL induced redistribution of CD14, TLR4, and TLR2 on the cell surface. Additionally, we demonstrated that TLR2 and TLR4 are upregulated in response to mmLDL. We concluded that mmLDL inducing the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10; through of CD14, TLR4, and TLR2; also its induced the redistribution of CD14, TLR4, and TLR2; and increased the expression of TLR4 and TLR2. These results provide new perspectives for understanding the mmLDL role in atherosclerosis inflammatory processes.

Introducción

Síndromes isquémicos coronarios agudos

Las enfermedades cardiovasculares, y en particular los síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA), 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 [1]. La cardiopatía isquémica incluye las alteraciones que tienen lugar en el miocardio a causa de un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno. Los SICA incluyen diferentes tipos de presentaciones clínicas como: la angina inestable, la cual representa la transición entre la enfermedad arterial coronaria estable y el estado en el que el paciente se encuentra en alto riesgo de presentar un infarto. De hecho, la angina inestable es la primera forma de presentación clínica en algunos pacientes. La angina inestable se caracteriza clínicamente por dolor precordial de origen isquémico, o dolor en extremidades superiores, en mandíbula y en epigastrio. El dolor es desencadenado con el esfuerzo o aún en reposo; tiene una duración menor a 30 minutos. El inicio de los síntomas es menor a 8 semanas, en pacientes previamente asintomáticos [2]. En el infarto agudo del miocardio, las manifestaciones clínicas habitualmente tienen una duración superior a los 30 minutos; también existe elevación de marcadores séricos de necrosis miocárdica [3]. En México, los síndromes isquémicos agudos fueron la segunda causa de muerte en población general en el 2001. Actualmente ocupan el primer lugar, originando 81,242 muertes por año, de las cuales 60,610 se presentaron en individuos mayores de 65 años y alrededor de 20,631 en individuos en edad productiva; en personas mayores de 75 años los SICA causan el 70% de todas las muertes [4]. El SICA es más frecuente en el género masculino que en el femenino; sin embargo, en mujeres después de los 65 años de edad, se pierde esta relación y se vuelven tan vulnerables como los hombres. La forma más frecuente de presentación clínica

de la enfermedad coronaria en las mujeres es la angina de pecho, mientras que en los hombres se presenta más a menudo en forma de infarto del miocardio [5].

Factores de riesgo asociados con enfermedades cardiovasculares

Los factores de riesgo asociados con enfermedades cardiovasculares incluyen: dislipidemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo, inactividad física, infecciones por microorganismos como *Chlamydia pneumoniae* y *Helicobacter pylori* [6-8]. Entre estos, la dislipidemia, en particular los niveles elevados de colesterol total en suero, las altas concentraciones de lipoproteína de baja densidad (LDL) y las bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), han cobrado importancia como factores de riesgo de aterosclerosis.

Lipoproteína de baja densidad

La LDL es una partícula esférica con un diámetro de 22 nm y un peso molecular de 2500 kDa. La partícula consiste en un núcleo hidrofóbico alrededor de 1600 moléculas de ésteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos rodeado 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 (apo B), consistiendo de 4536 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 500 kDa (figura 1). Además, la LDL contiene cantidades variables de ácidos grasos poli-insaturados, también contiene diversos antioxidantes, uno de los más importantes es el α -tocoferol. La vida media de la LDL en circulación es de 2.5 días [9]. El principal mecanismo de eliminación en sangre es por endocitosis en las células nucleadas a través del receptor de

LDL, siendo la principal fuente de colesterol para el mantenimiento de membranas celulares. La LDL es una molécula extremadamente susceptible a la oxidación [9,10].

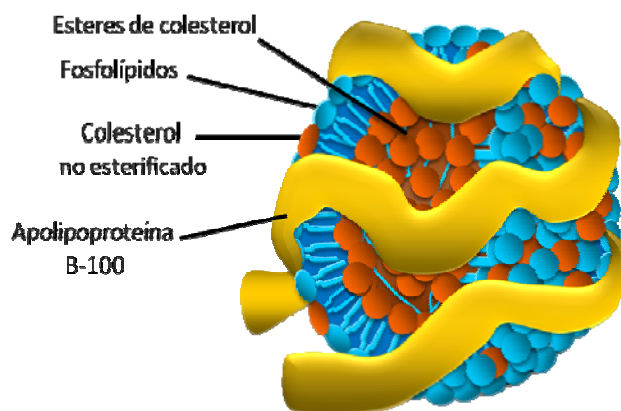


Figura 1. Estructura de la lipoproteína de baja densidad. La LDL es una molécula esférica compuesta por la apolipoproteína B-100, fosfolípidos, ésteres de colesterol y colesterol no esterificado [9].

Lipoperoxidación

La modificación oxidativa de un lípido es un proceso complejo. En general el proceso de lipoperoxidación comienza con el ataque de un radical libre (anión hidroxilo, anión superóxido y peróxido de hidrógeno) el cual sustrae un átomo de hidrógeno que constituía un enlace covalente en la cadena del ácido graso (figura 2A). Entonces el ácido graso retiene un electrón y sufre un reordenamiento de su estructura molecular generándose sobre el ácido graso un radical (figura 2B). Posteriormente, el ácido graso se estabiliza produciendo dobles enlaces en arreglo secuencial que reacciona con el oxígeno molecular, adicionalmente se produce el radical peroxilo (figura 2C). El radical peroxilo estimula la reacción en cadena al sustraer átomos de hidrógeno de otras cadenas de lípidos insaturadas e intactas (figura 2D). La adición de un hidrógeno al radical peroxilo provoca se forma el hidroperóxido (figura 2E). Finalmente, los hidroperóxidos forman moléculas como

aldehídos o malondialdehído [11]. El colesterol en la partícula de LDL puede ser oxidado a oxiterol como el 7-ketosterol, hidróxido linoleato de colesterol, 7 beta hidroperoxicolesterol. La oxidación de los ácidos grasos insaturados produce fragmentos de 3 a 9 carbonos de longitud, incluyendo aldehídos que pueden conjugarse especialmente con los grupos amino de la apo B. [12].

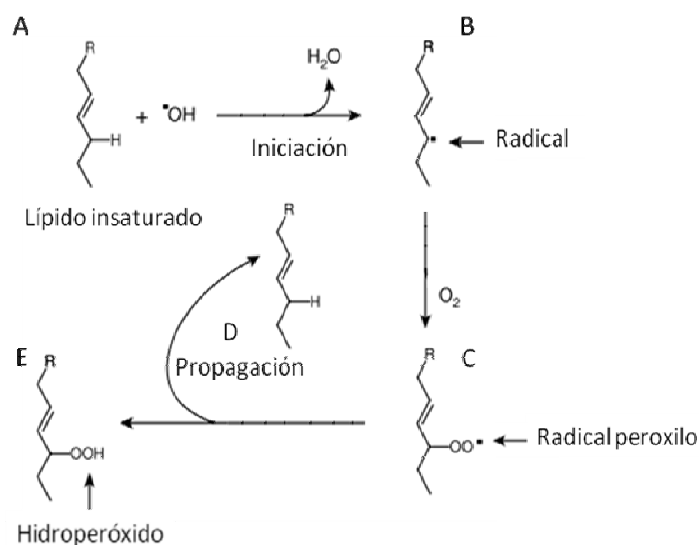


Figura 2. Proceso de lipoperoxidación. (2A) La lipoperoxidación se inicia por el ataque de radicales libres a un lípido insaturado. (2B) En la molécula lípídica se genera un grupo radical. (2C) El grupo radical en presencia de oxígeno molecular provoca se genere el radical peroxilo. (2D) Se genera una reacción en cadena de la lipoperoxidación. (2E) El radical peroxilo se transforma en un hidropéroxido [11].

Lipoproteína de baja densidad y el desarrollo en la lesión aterosclerosa

Se ha demostrado que la oxidación de la LDL es clave para el desarrollo de la lesión aterosclerosa [13]. Además la literatura, mencionan a dos tipos funcionales de LDL modificada por oxidación. Estas moléculas se han designado como LDL oxidada (LDLox) o extensamente oxidada y la LDL mínimamente modificada (LDLmm) o formas tempranas de LDLox. Las diferencias radican en que la LDLox es reconocida por receptores “scavenger”, como CD36 y también presenta altos niveles de oxidación [14,15]. En

contraste la LDLmm no es reconocida por receptores “scavenger”, como CD36 y presenta niveles más bajos de oxidación que la LDL extensamente oxidada [15,16]. Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que las formas de LDLox son rápidamente endocitadas por macrófagos a través de CD36; la acumulación de LDLox generó células espumosas [17]. En 1980 se demostró que células endoteliales y de músculo liso modifican la LDL *in vitro*, lo que la hace más susceptible de ser endocitada por macrófagos. A esta LDL modificada por las células se le ha denominado LDL mínimamente modificada. Los efectos de las células sobre la LDL se pueden mimetizar incubando LDL con iones de cobre como catalizador de la oxidación [18]. Diversos estudios muestran que la LDLox participa en la fisiopatología de la enfermedad. Se han obtenido LDL de placas aterosclerosas de arterias de humanos y de modelos animales que presentan las mismas propiedades y características de la LDLox *in vitro*: una alta movilidad electroforética, alto contenido de colesterol libre y en la fracción de fosfolípidos, la proporción esfingomielina y lisofostidilcolina se encuentra elevada [19-20]. Además se ha demostrado que la LDLox se encuentra *in vivo*, mediante análisis inmunohistoquímico, se ha encontrado la LDL modificada oxidativamente en lesiones aterosclerosas de conejos hiperlipidémicos utilizando anticuerpos contra LDLox [21]. También se ha encontrado LDL modificada oxidativamente en lesiones aterosclerosas de pacientes diabéticos a través de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos contra LDLox [12,19].

Desarrollo de la placa aterosclerosa

El proceso aterogénico se inicia con la disfunción endotelial, la cual representa uno de los primeros estadios en la patogénesis de la aterosclerosis. La primera fase consiste en una pérdida de las funciones homeostáticas del endotelio (anti-adhesiva, anti-agregante,

antiproliferativa, antioxidante, anti-trombótica y reguladora del tono vasomotor). Estos cambios tempranos que preceden a la formación de la lesión aterosclerosa incluyen un aumento de la permeabilidad endotelial (figura 3A) [7] a lipoproteínas de baja densidad, las cuales se retienen en la matriz extracelular. La LDL es modificada por lipoperoxidación en el espacio subendotelial por compuestos reactivos del oxígeno derivados de las células [8]. El acúmulo de partículas de LDL en el espacio subendotelial, inicia la formación de la placa aterosclerosa [7,8]. La lipólisis de la LDL por fosfolipasa A2 y la liperoxidación, generan lisofosfatidilcolina la cual potencia el efecto pro-inflamatorio en la íntima de la arteria [22]. Como consecuencia, en presencia de un endotelio disfuncional, se observa la expresión de moléculas de adhesión como: moléculas de adhesión de plaquetas a células endoteliales (PECAM)-1, moléculas de adhesión intercelular (ICAM)-1 y molécula de adhesión de células vasculares (VCAM)- α [23], las cuales producen la interacción entre los linfocitos T y los monocitos circulantes con las células endoteliales [7,8]. Además, las células del endotelio y musculares lisas sintetizan y liberan moléculas quimiotrayentes como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1 [7,8]. Estimulando la migración y acumulación de monocitos al sitio de la lesión (figura 3A) [7]. En esta etapa de la lesión, las células musculares lisas migran a la placa (figura 3B) estimuladas por el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento de fibroblastos, entre otros estímulos [7]. Adicionalmente, los linfocitos T son reclutados (figura 3B) [7] y son activados por TNF (factor de necrosis tumoral)- α [7,8]. Los monocitos/macrófagos participan en la respuesta inmune innata y son células efectoras esenciales en la enfermedad aterosclerosa. Estas células expresan en la superficie celular receptores “scavenger” clase A tipo I y II, clase B, CD36, los cuales identifican e internalizan las partículas de LDLox [24], induciendo su transformación en células espumosas (figura 3B); estos eventos preceden a la

formación de la placa fibrosa (figura 3C) caracterizada por un crecimiento extracelular de lípidos, particularmente colesterol, ésteres de colesterol y matriz derivada de células musculares lisas [7]. Los macrófagos activados presentes en la placa secretan citocinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentran interleucina (IL)-1 β , IL-8, TNF- α , factor estimulador de colonias de macrófagos y MCP-1 [8]. También existe un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86 en macrófagos que participan en la regulación de la activación de los linfocitos [25]. Otra molécula que se ha demostrado que se sobre-expresa en la placa es CD40; la activación de células vasculares con CD40L induce la liberación de IL-1 β [26]. Otro evento que se inicia es la muerte celular de macrófagos por interferón (IFN)- γ [7]. Por otro lado, la apoptosis o necrosis puede ser generada por la acumulación de lípidos promoviendo el avance del núcleo necrótico en la placa (figura 3C) [7]. Además, los macrófagos producen TNF- α , IL-1 β y metaloproteinasas que pueden ser críticos en el daño a la lesión [7,8]. En la última etapa de la aterosclerosis ocurre la ruptura (figura 3D) o ulceración de la placa fibrosa lo que conduce a síndromes de angina inestable o al infarto de miocardio [7]. La vulnerabilidad de la placa se origina por un adelgazamiento de la lesión y ocurre por inhibición de la secreción de matriz proveniente de células musculares lisas a través de IFN- γ secretado por linfocitos T. Los macrófagos degradan la matriz de la capa fibrosa por medio de colagenasa intersticial, gelatinasa y estromilina. La degradación de la capa fibrosa frecuentemente se origina en los hombros de la lesión y puede conducir a una hemorragia (figura 3D); las plaquetas activadas se adhieren a la arteria lesionada ocasionando la formación de un trombo y la oclusión de la arteria [7,8]. Con base en lo anterior, actualmente la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica en la que las citocinas juegan un papel relevante [7,8].

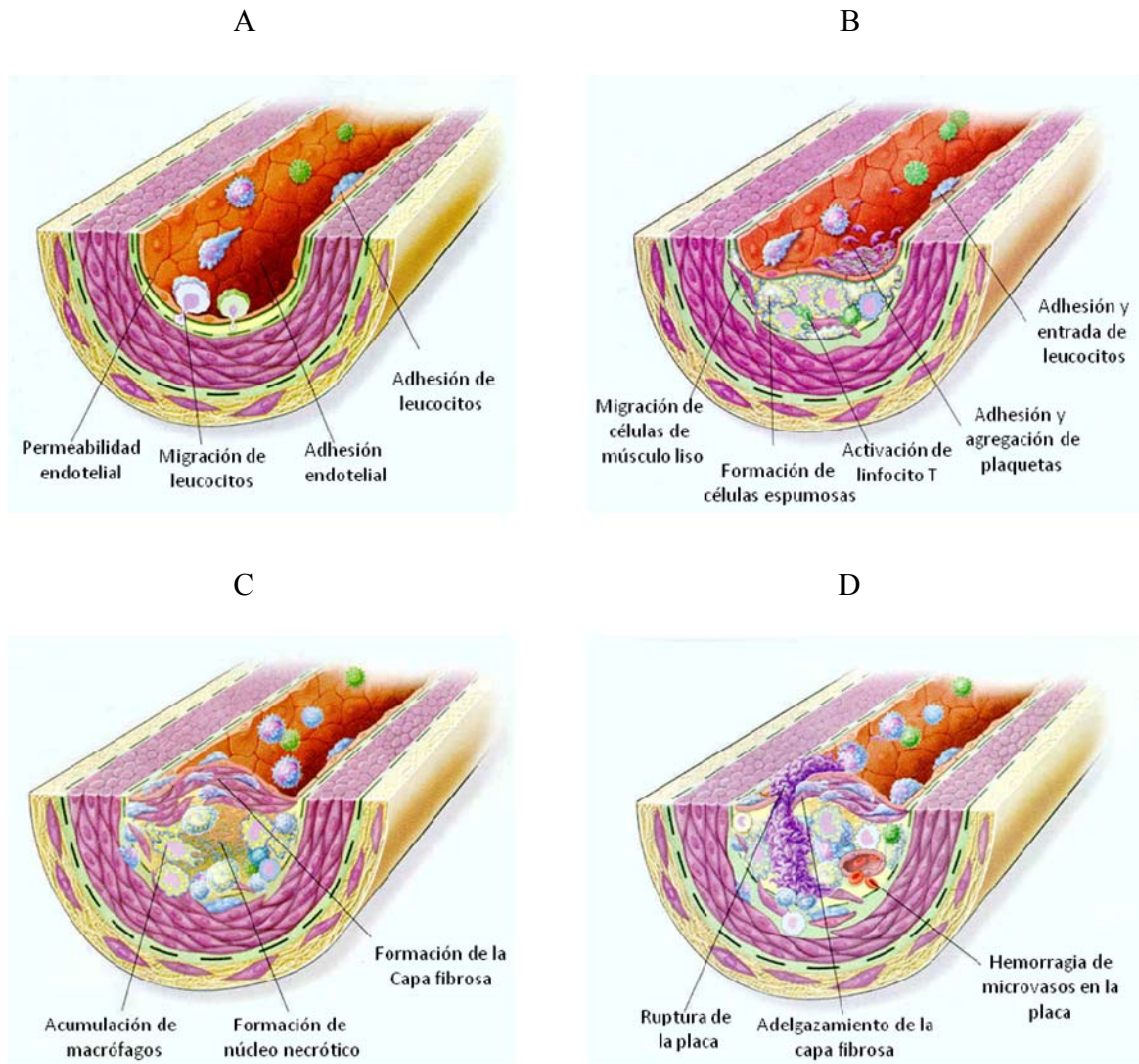


Figura 3. Desarrollo de la placa aterosclerosa. (3A) La lesión se origina por un daño al endotelio, lo que permite un incremento en la permeabilidad endotelial, ocasionando la migración y adhesión de leucocitos. (3B) En la siguiente etapa de la lesión, las células de músculo liso migran a la lesión, los macrófagos se transforman a células espumosas, los linfocitos T presentes se activan, las plaquetas se adhieren y agregan a la lesión y continúa el arribo de leucocitos. (3C) En la lesión ocurre una acumulación macrófagos los cuales mueren por apoptosis o necrosis, generándose el núcleo necrótico y formación de la capa fibrosa. (3D) En las etapas finales la lesión, sufre un adelgazamiento de la capa fibrosa, ruptura de la placa y hemorragias de microvasos [7].

Citocinas involucradas en la aterosclerosis.

La IL-1 desempeña un papel central en el inicio de las respuestas inflamatorias. Es producida por monocitos y macrófagos. Existen dos formas biológicamente activas: la IL-1 α y la IL-1 β ; de éstas, 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. La IL-1 provoca la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos factor activador de plaquetas y óxido nítrico sintasa en células musculares lisas. La IL-1 también, induce la expresión de genes para factores de la coagulación, la adhesión y migración de leucocitos a través del endotelio, así como, la síntesis de factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos e inhibidores de la fibrinólisis [27]. Se ha demostrado que la ausencia de IL-1 β disminuye la severidad de la lesión en ratones propensos a desarrollar aterosclerosis [28].

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria multi-funcional, regula la respuesta humoral y celular, participa en el daño tisular y juega un papel central en el proceso inflamatorio. Es el principal mediador de la respuesta de fase aguda y de la producción hepática de proteína C reactiva así como de fibrinógeno. La IL-6 también, provoca la migración y diferenciación de macrófagos e induce la síntesis de enzimas degradadoras de matriz extracelular, lo cual 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 [29,30].

Otra citocina pro-inflamatoria importante es el TNF- α , siendo los monocitos y macrófagos sus principales productores, aunque también es secretado por linfocitos T, células asesinas

naturales, células musculares lisas y células endoteliales. El TNF- α ejerce acciones pro-inflamatorias sobre estas células lo que favorece la progresión e inestabilización de la placa aterosclerosa. También estimula la producción de IL-6 en células musculares lisas de la placa, y la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E, ICAM-1, VCAM-1 por células endoteliales y macrófagos. Se ha identificado aumento en la producción de TNF- α por células mononucleares de pacientes después de un infarto agudo del miocardio. Además, la concentración del receptor soluble de TNF también se incrementa rápidamente en estos pacientes [31,32].

En el desarrollo de la placa aterosclerosa participa otro grupo de citocinas, las cuales ejercen efectos inhibitorios frenando la respuesta inflamatoria. Una de estas citocinas es la IL-10. La IL-10 tiene la capacidad de inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (IL- β , IL-6, IL-8, IFN- γ). Actúa sobre diferentes tipos celulares incluyendo timocitos, linfocitos T citotóxicos, mastocitos, linfocitos B y monocitos/macrófagos [33]. La IL-10 ha sido identificada en fases tempranas y avanzadas de lesiones aterosclerosas, principalmente localizada en el citoplasma de los macrófagos, también en células musculares lisas y en la matriz extracelular [34]. Se ha demostrado que pacientes con angina inestable presentaban niveles séricos de IL-10 significativamente más bajos que aquellos con angina crónica estable. Estos hallazgos sugieren que niveles séricos bajos de IL-10 se asocian a mayor inestabilidad de la placa y consecuentemente a la presentación de eventos cardiovasculares agudos [35].

Quimiocinas involucradas en la aterosclerosis.

Las quimiocinas son pequeños péptidos con función quimioatrayente que median la migración, crecimiento y activación de linfocitos T, células naturales asesinas, monocitos y macrófagos [36]. En 1991, se demostró la expresión de MCP-1 en lesiones aterosclerosas humanas. La MCP-1 es expresada por macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales. También se ha descrito que la MCP-1 induce la adhesión y el rodamiento de monocitos sobre células endoteliales activadas y el reclutamiento de éstos [37]. El tratamiento de las células endoteliales con LDLox *in vitro* induce la secreción de MCP-1, homocisteína, la adhesión de plaquetas activadas y la producción de TNF- α . Al eliminar el gen que codifica para MCP-1 en ratones apoE^{-/-} resulta en una marcada reducción del tamaño de las lesiones aterosclerosas. Estas evidencias demuestran la importancia de MCP-1 en las lesiones aterosclerosas [38].

Moléculas co-estimuladoras involucradas en la aterosclerosis.

En el proceso de formación de la placa aterosclerosa, los macrófagos activados expresan moléculas de histocompatibilidad clase II, CD40 y CD86. Se ha demostrado que la molécula CD40 se expresa en macrófagos y CD40L en células T de lesiones aterosclerosas, *in vivo* [39]. La señalización de CD40 puede promover la expresión de mediadores pro-aterogénicos regulados probablemente por citocinas como la IL-1, TNF- α , IFN- γ , metaloproteinasas (MMP-1, MMP-2 y MMP-9) y moléculas de adhesión celular (selectina E, VCAM-1, ICAM-1) [39]. Existen estudios que demuestran que la disfunción del sistema CD40-CD40L puede retardar la iniciación de la formación de la placa de ateroma. El tratamiento con anticuerpos anti-ratón CD40L, limita la aterosclerosis en ratones deficientes del receptor de LDL, cuando son alimentados con una dieta alta en colesterol

durante 12 semanas. En ellos se encontró una reducción significativa en el tamaño y contenido de lípidos en la lesión aórtica aterosclerosa [39]. También se ha demostrado que al estimular monocitos con LDLox se incrementa la expresión de CD86 y se induce la activación de linfocitos T. Los linfocitos T expresan de manera constitutiva el ligando CD28 el cual puede ser reconocido por CD86; la interacción CD28 con CD86 resulta en la activación del linfocito T, provocando su proliferación y la secreción de citocinas como IFN- γ [40]. Se ha determinado que células dendríticas de pacientes con enfermedad cardiovascular presentan un incremento en la expresión de CD80, CD86 y CD40 al ser comparados con los testigos sanos; este incremento correlacionó de forma positiva con factores de riesgo [41].

Receptores tipo Toll

Uno de los posibles factores que inducen la respuesta inflamatoria en aterosclerosis es la LDL modificada oxidativamente. A pesar que aún no existen conocimientos suficientes que demuestren el posible mecanismo que provoca este suceso, diversas evidencias han demostrado que los receptores tipo Toll (TLR) juegan un papel esencial en las respuestas inflamatorias [42,43] y al parecer contribuyen de forma importante en la enfermedad aterosclerosa [44,45]. El gen que codifica para los receptores Toll fue descubierto al inicio de la década de los 80 como un componente esencial de la vía que establece el eje dorsoventral en el embrión temprano de *Drosophila melanogaster* [46]. En 1996 Lemaitre y colaboradores documentaron el primer receptor Toll involucrado en la respuesta inmune antifúngica en *D. melanogaster* [47], y el descubrimiento del primer receptor tipo Toll en el humano (TLR) 4 se realizó en 1997 por Medzhitov y col., el cual fue crucial para el entendimiento de muchos mecanismos importantes implicados en la inmunidad innata y

adaptativa [48]. En mamíferos, se han descrito 13 TLR y en el humano 10 TLR los cuales se localizan en la superficie celular, así como, en vesículas intracelulares [49]. Los TLR constituyen una familia de receptores que se han conservado filogenéticamente y presentan tres características estructurales: 1.-Tienen una región extracelular rica en repeticiones ricas en leucina, 2.- Poseen un región transmembranal corta y 3.- Una región citoplásmica que es homóloga al receptor de la IL-1 y se denomina receptor de IL-1 tipo Toll (TIR), la cual es necesaria para el inicio de las cascadas de señalización (figura 4) [50].

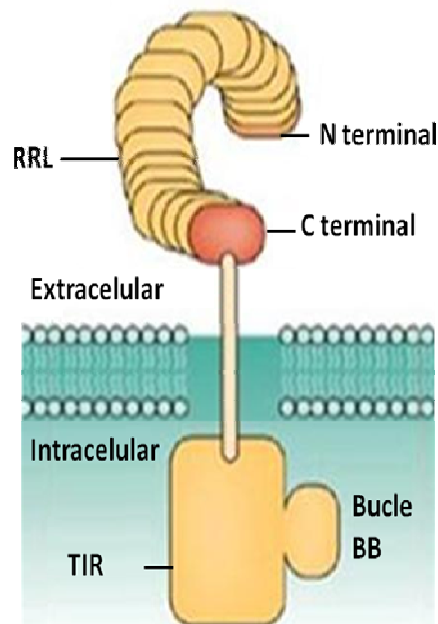


Figura 4. Estructura del receptor tipo Toll. El TLR presenta una región extracelular, transmembranal y citoplásmica. Repeticiones ricas en leucina (LRR) en la región extracelular. C: carboxilo terminal; N: amino terminal; TIR: receptor de IL-1 tipo Toll [51].

Los TLR participan en la respuesta inmune innata, reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Figura 3). Estudios *ex vivo* establecen que los TLR están involucrados en el reconocimiento de moléculas provenientes de microorganismos (Tabla 1) [49].

Tabla 1. TLR y algunos de sus ligandos

TLR	Ligando	Origen ligando
TLR1/TLR2	Lipopéptidos triacetilados	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TLR2	Peptidoglicana	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Lipoarabinomanana	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Lipoproteína	<i>Salmonella typhimurium</i>
	Fosfolipomanana	<i>Candida albicans</i>
TLR3	RNA de doble cadena	Virus
TLR4	Lipopolisacáridos	Bacterias Gram negativas
	Fosfatidilinositol	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Proteína F de envoltura	Virus sincial respiratorio
	Glicoinositolfosfolipido	<i>Trypanosomacruzi</i>
	Ceramidas	
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	CpG DNA (Secuencias de DNA no metilado)	Bacterias y virus
TLR11	Profilina	<i>Toxoplasma gondii</i>

Señalización de los receptores tipo Toll

La activación de los TLR involucra la formación de dímeros, heterodímeros o colaborando con otros receptores como CD14. Adicionalmente, en el proceso de activación los TLR sufren una redistribución y agregación en la superficie celular [52-53]. Los TLR utilizan las vías de señalización dependiente de MyD88 (gen 88 de la repuesta primaria de la diferenciación mieloide) e independiente de MyD88. La señalización dependiente de MyD88 se inicia en la región TIR, causando el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88, la cual promueve la asociación de IRAK (quinasas asociada al receptor de IL-1) 4 e IRAK1. Durante la formación de este complejo IRAK4 se activa y fosforila a IRAK1, que a su vez interacciona con TRAF (factor asociado al receptor de TNF) 6. Generándose el complejo IRAK1-TRAF6 el cual interactúa con otras moléculas que inducen la activación del complejo IKK que consiste de IKK α , IKK β las cuales catalizan la fosforilación de la I κ B. Posteriormente la I κ B es ubiquitinada y degradada por el proteasoma, permitiendo la liberación y posterior translocación de NF- κ B al núcleo. La vía independiente de MyD88 involucra la proteína TRIF (adaptador que contiene la región TIR), la cual se asocia con la proteína cinasa serina-treonina (TBK) 1 y TBK1 induce la fosforilación del factor de transcripción IRF3 permitiendo su translocación al núcleo. La activación de las rutas de señalización de los TLR inducen la activación de los factores NF- κ B e IRF (factor regulador de IFN), 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 MIP1- α entre otras moléculas (figura 5) [49,50].

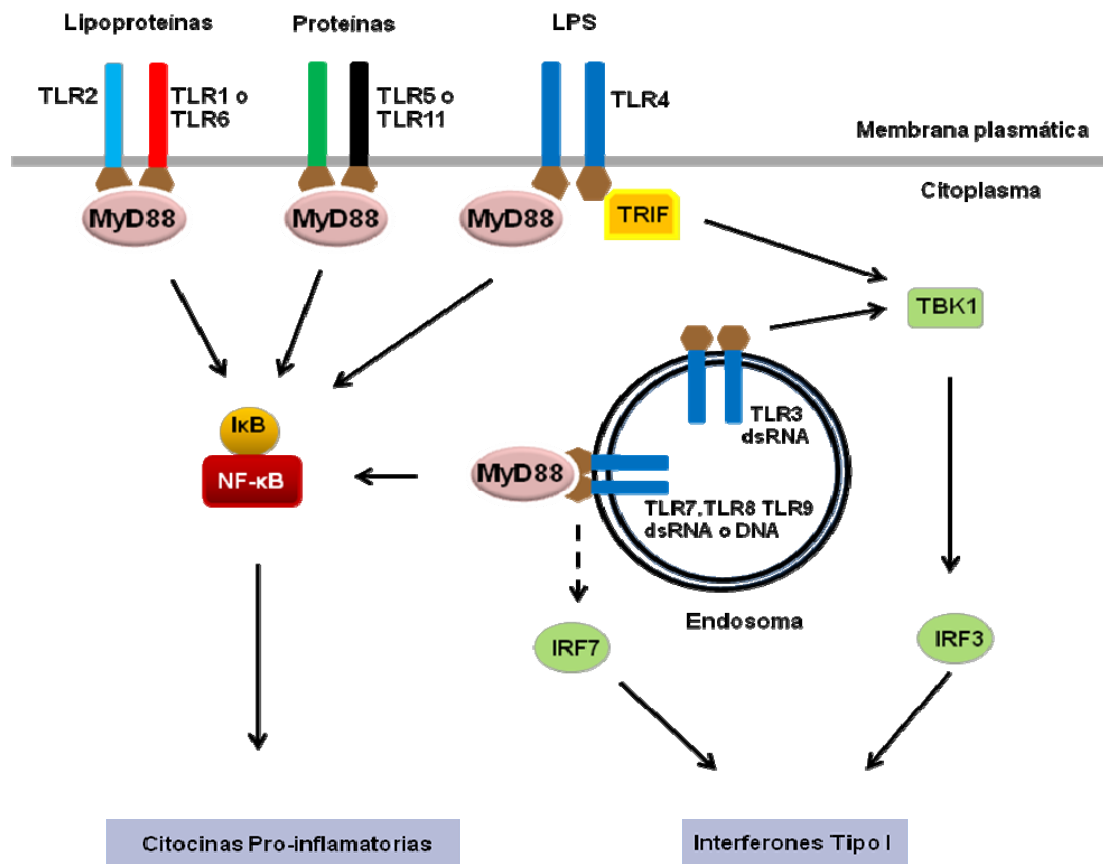


Figura 5. Representación esquemática de las vías de señalización de los TLR. La señalización de los TLR se inicia cuando reconocen a sus ligandos específicos. Los TLR señalizan a través de la vía dependiente de MyD88 e inician una compleja señalización la cual involucra diversas proteínas resultando en la activación de NF-κB lo que genera la expresión de citocinas pro-inflamatorias 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 la proteína TRIF, la cual se asocia con la proteína cinasa de unión a TANK (TBK1) la cual induce la fosforilación del factor de transcripción IRF3 permitiendo la expresión de interfeferon tipo I. IκB: Inhibidor del factor nuclear kappa-B; IRF: Factor regulador de IFN; MyD88: Gen 88 de la repuesta primaria de la diferenciación mieloide; NF-κB: Factor nuclear κ -B; TBK1: Cinasa que se une TANK; TLR: Receptor tipo Toll; TRIF: Adaptador que contiene la región TIR; [modificado de 52].

Receptores tipo Toll en aterosclerosis

La expresión de los TLR ha sido evaluada en las lesiones aterosclerosas humanas y de ratón. Se ha demostrado que los macrófagos predominantemente sobreexpresan TLR2 y TLR4 en las lesiones que las células endoteliales presentes en la lesión [54,55]. Se ha demostrado que los TLR promueven el desarrollo de lesión aterosclerosa. En modelos animales susceptibles a desarrollar aterosclerosis Apo (apolipoproteína) E^{-/-} que tienen un fondo deficiente de TLR2, al inducirles la enfermedad aterosclerosa; presentaron una reducción de la placa de ateroma. Así como, una disminución en el infiltrado de macrófagos en el sitio de la lesión [44]. Por otro lado, otro grupo ha reportado una reducción del 24% de la placa aterosclerosa en ratones Apo^{-/-}/TLR4^{-/-}. Adicionalmente, los ratones Apo^{-/-}/TLR4^{-/-} presentaron una reducción en el contenido lipídico e infiltrado de macrófagos en la lesión [45]. Por otro lado, la deficiencia de CD14 en ratones propensos a desarrollar aterosclerosis; provoca una reducción en los niveles de citocinas pro-inflamatorias con respecto a los niveles encontrados en los ratones testigo. Así como, un retardo en la activación de NF-κB en respuesta al LPS [56]. Estas evidencias demuestran claramente que los TLR y CD14 participan en la aterosclerosis.

Por otro lado, existen evidencias que sugieren que antígenos endógenos activan a los TLR. Se ha demostrado que la deficiencia de TLR2 y TLR4 en animales susceptibles a desarrollar aterosclerosis presentan una reducción en el desarrollo de la lesión bajo condiciones libres de patógenos [44,45], lo que sugiere que moléculas endógenas activan a los TLR en la placa aterosclerosa. Una de las moléculas endógenas que se encuentra en la placa aterosclerosa es la LDLox [13]. Estudios *in vitro* han demostrado que la LDLmm se une a CD14 y mediante la activación de la vía de señalización de TLR4/MD2 induce la

polimerización de F-actina y el “spreading” (expansión) en macrófagos [16]. Por otro lado, existe evidencia que la LDLox incrementa la expresión del transcrito para TLR2 y TLR4 [54,57].

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 [58]. Mientras que, el polimorfismo C269T en el promotor de CD14, es asociado con una alta densidad de CD14 y es identificado como un factor de riesgo de infarto del miocardio [59]. Adicionalmente, se ha demostrado que el polimorfismo C260T de CD14 incrementa el fenómeno inflamatorio en la placa aterosclerosa [60]. Por consiguiente, estos datos sugieren un papel potencial de CD14, TLR2 y TLR4 en el fenómeno inflamatorio en respuesta a la lipoproteína de baja densidad modificada por oxidación.

Justificación

La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica. Uno de los posibles factores que inducen la respuesta inflamatoria es la LDL modificada oxidativamente. A pesar de que aún no existen conocimientos suficientes que demuestren el posible mecanismo que provoca la inflamación; diversas evidencias han demostrado que CD14 y TLR juegan un papel esencial en las respuestas inflamatorias y al parecer contribuyen de forma importante en la enfermedad aterosclerosa. Por lo que nos parece interesante explorar si CD14, TLR4 y TLR2 participan en respuesta a la LDLmm en monocitos y macrófagos humanos.

Hipótesis

Si los receptores TLR4 y TLR2 son activados por la LDLmm, incrementará la expresión de citocinas pro-inflamatorias y la expresión de TLR2 y TLR4 en monocitos y macrófagos.

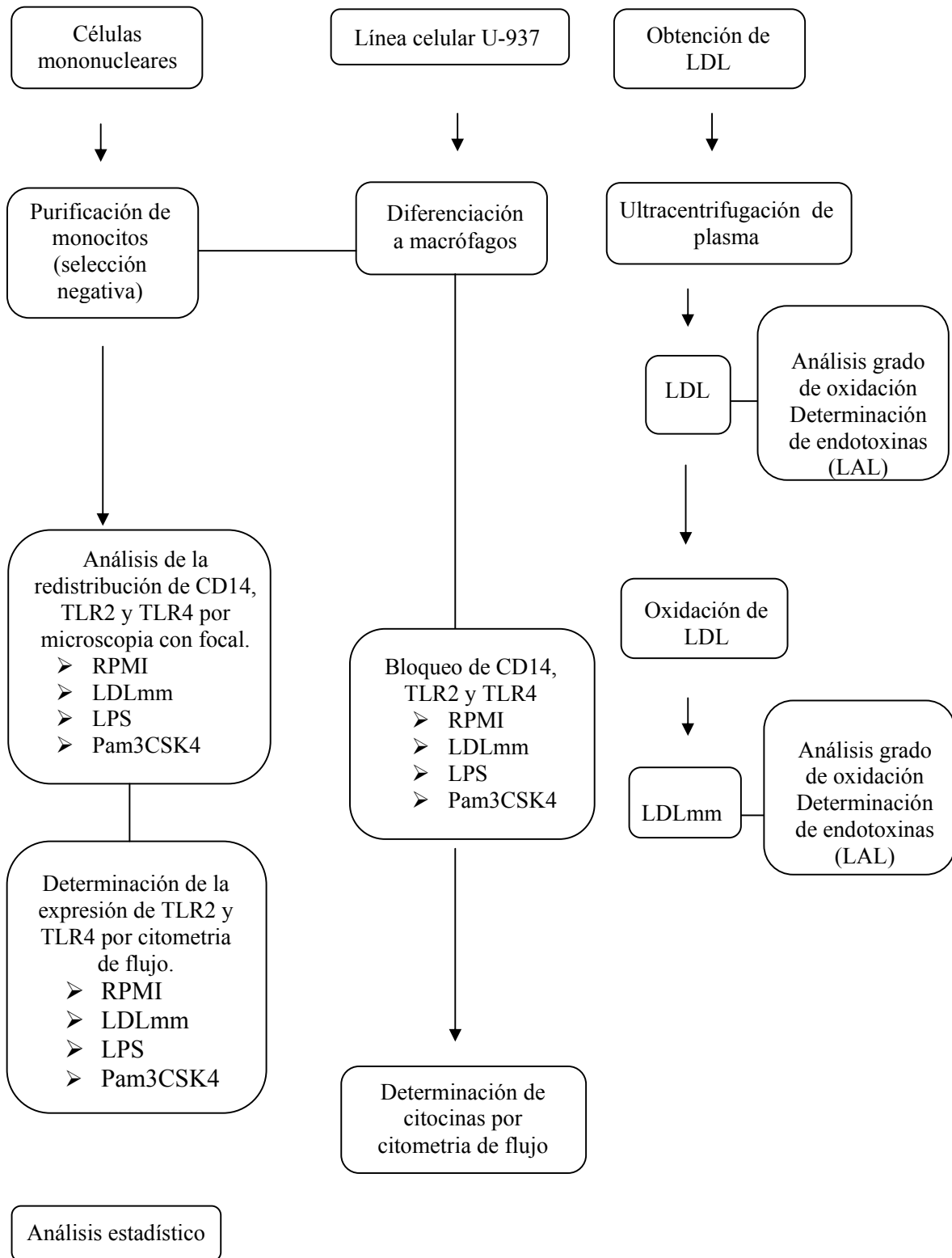
Objetivo general

Demostrar que el aumento en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y la expresión del TLR2 y TLR4 inducido por la LDLmm se debe a que dicha molécula activa a TLR4 y TLR2 y que en este proceso de activación participa CD14, en monocitos y macrófagos.

Objetivos específicos

- Demostrar que la LDLmm activa a TLR2 y TLR4 induciendo la producción de TNF- α y que CD14 es necesario para la síntesis de TNF- α .
- Determinar que la activación de TLR2 y TLR4 por la LDLmm induce la síntesis de IL-1 β , IL-6 e IL-10 y que CD14 es necesario para la síntesis de estas citocinas.
- Analizar si el estímulo de LDLmm induce la redistribución de CD14, TLR2 y TLR4.
- Analizar si el estímulo de LDLmm incrementa la expresión de TLR2 y TLR4.

Diseño experimental



Materiales y métodos

Las células mononucleares fueron obtenidas de concentrados leucocitarios. Los concentrados leucocitarios se diluyeron 1:5 en regulador de fosfatos 0.01M (J.T. Baker, New Jersey, USA) con cloruro de sodio 0.15M (Caledon Laboratories Ltd, Ont, Canada) (PBS) 1X pH=7.4. Posteriormente se colocaron 15 ml de lymphopred (Axis-Shield, Liverpool, UK) en tubos de 50 ml y se adicionaron 30 ml de la solución diluida del concentrado leucocitario y se centrifugaron los tubos a 2000 rpm durante 30 minutos. Las células mononucleares fueron removidas de la interfase y se lavaron dos veces con PBS a 12000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 2 ml de PBS 0.01M-BSA 0.5% (Sigma, St. Louis, MO, USA)-EDTA 0.05mM, pH=7.4 (Sigma).

Purificación de monocitos humanos.

Los monocitos se purificaron utilizando el Kit II para aislamiento de monocitos por selección negativa (Miltenyi Biotec MACS, Bergish Gladbach, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, las células mononucleares 10^7 se resuspendieron en 80 μ l de regulador PBS (0.01M)-BSA (0.5%)-EDTA (2mM) (Sigma) y se adicionaron 20 μ l de la mezcla de anticuerpos unidos a biotina: anti-CD3, anti-CD7, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD56, anti-CD123 y anti-glicoforina A; se incubaron 10 minutos a 4°C, en oscuridad. Posteriormente, 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 magneticas acopladas a anticuerpo anti-biotina, posteriormente se incubó a 4°C durante 15 minutos en oscuridad. Después, 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). La columna se lavo con

el regulador y se recuperó la fracción de células. Las células recuperadas fueron teñidas con anti-CD14-FITC y la pureza determinada por citometría de flujo fue mayor al 98%. Se determinó la viabilidad celular por exclusión con azul tripano.

Diferenciación de las células U937 a macrófagos.

La línea celular promonocítica U937 fue ajustada a 2×10^6 /ml en medio de cultivo RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía 10% de suero fetal bovino (SFB) y forbol miristato-acetato (PMA) (Sigma) a una concentración final de 2.5 ng/ml y se incubaron 24 horas a 37°C. Posteriormente, las células adherentes fueron lavadas tres veces con PBS pH = 7.4 para remover el PMA y se incubaron 24 horas a 37°C antes de ser usadas en los experimentos en medio de cultivo que contenía 10% de SFB sin PMA. La maduración de las células U937 fue evaluada por la expresión de CD14 mediante citometría de flujo.

Obtención de lipoproteína de baja densidad nativa.

A partir de plasma humano de donadores sanos se obtuvo la LDL nativa (LDL_n) por ultracentrifugación. A 20 ml de plasma se le adicionaron 4 g de KBr (J.T. Baker, New Jersey, USA) para obtener una densidad de 1.2 g/ml a 4°C. Posteriormente, se realizó un gradiente de densidad a 4°C que consistió de 2.5 ml de plasma con una densidad de 1.2 g/ml y 2.5 ml de solución salina a 0.15 M con una densidad de 1.006 g/ml en tubos de policarbonato. Después, los tubos se colocaron en el rotor de ángulo fijo ST80AT3 (Thermo Scientific Inc, Boston MA, USA) y se centrifugó 4 horas a 80,000 rpm a 4°C en microultracentrífuga “sorvall discovery” modelo M150 SE (Thermo Scientific Inc). Finalizada la centrifugación, se separó la banda localizada en la parte superior a una densidad de 1.006 g/ml que corresponde a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL).

Posteriormente, se recupero el resto del volumen y se colocó en otro tubo, al cual se le adicionaron 2 ml de solución salina a 0.15 M, a una densidad de 1.065 g/ml y se homogenizó gentilmente. Los tubos se centrifugaron nuevamente durante 4 horas a 80,000 rpm a 4°C en microultracentrífuga (Sorvall Discovery M150 SE). Posteriormente, se separó la banda localizada en la parte superior de los tubos que corresponde a LDLn. La banda recuperada (LDLn) se colocó en una membrana de nitrocelulosa (Sigma) y se dializó contra 4 litros de PBS 0.01M 1X a un pH de 7.4 durante toda la noche a 4°C.

Determinación de la concentración de la lipoproteína de baja densidad.

A las muestras obtenidas después de la ultracentrifugación se les determinó la concentración de LDL empleando la fórmula de Friedewald: $LDL = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL} + \text{Triglicéridos}/5)$. Para ello, se determinó la concentración de colesterol total a las muestras. A un tubo se le colocaron 3 μl de la muestra y posteriormente se adicionó un volumen de 300 μl que contiene las enzimas colesterol esterasa, oxidasa de colesterol (Dade Behring, Deerfield, Illinois, USA). El método consiste en que la enzima colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres. Entonces, la colesterol oxidasa, oxida al colesterol para formar la 4-colestenona y peróxido de hidrógeno; obteniendo como producto final la quinoneimina, la reacción se determina a 520nm. La concentración de triglicéridos se determinó por la actividad de la enzima glicerol cinasa (Dade Behring). A un tubo se le colocaron 10 μl de la muestra y posteriormente se le adicionaron 1000 μl del reactivo que contiene las enzimas lipoproteína lipasa (LPL), glicerol cinasa (GK), glicerol-3-oxidasa (GPO), así como, el p-clorofenol, 4-aminofenazona y adenosina-trifosfato (ATP) (Dade Behring). El ensayo consiste en que los triglicéridos al ser incubados con la LPL liberan glicerol y ácidos grasos libres. Entonces, el

glicerol es fosforilado por la GPO en presencia de ATP. Posteriormente la GK produce el glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato. El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrogeno por la GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona y el p-clorofenol generando una quinona, la reacción se determina a 505nm. Para la determinación de HDL. En tubo se colocan 3 µl de la muestra y posteriormente se adicionan 300 µl del reactivo de reacción que contiene sulfato de dextrano y sulfato de magnesio; en esta etapa se precipitan las fracciones de LDL y la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), dejando a la fracción de HDL colesterol en solución. Además, el reactivo de reacción contiene las enzimas colesterol esterasa, oxidasa de colesterol (Dade Behring, Deerfield, Illinois, USA). Las reacciones enzimáticas son similares a las descritas para la determinación de colesterol total.

Oxidación de la lipoproteína de baja densidad nativa.

La LDLn se sometió a un proceso de oxidación *in vitro* utilizando como catalizador de la oxidación al CuSO₄. La concentración de proteínas de la LDLn se ajustó a 300 µg/ml, posteriormente se adicionó 1 mM de CuSO₄ (Sigma-Aldrich) quedando una concentración final de 10 µM de CuSO₄ (Sigma). La muestra se incubó 1 hora a 37°C. Al terminar el tiempo de incubación se detuvo la reacción colocando el tubo en hielo (A la LDL sometida bajo este proceso se le denomino LDLmm). La LDLmm, se colocó en una membrana de nitrocelulosa (Sigma) con un poro de y se dializó contra 4 litros de regulador de PBS-EDTA 0.5 mM a un pH de 7.4 durante toda la noche a 4°C.

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

A la LDLn y LDLmm se les determinó el grado de oxidación a través del método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. En tubos por separado se colocaron 100 µg/ml de LDLn y LDLmm y se adicionaron 2 ml de H₂SO₄ 4M (Caledon Laboratories) y 0.25 ml de ácido fosfotúngstico al 10% (Caledon Laboratories), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y al paquete se le adicionó 1 ml de H₂SO₄ 4 M (Caledon Laboratories) más 0.15 ml de ácido fosfotúngstico al 10% (Caledon Laboratories), la mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, se removió el sobrenadante y el paquete se resuspendió con 2 ml de agua destilada y se adicionaron 0.5 ml de 2-ácido tiobarbitúrico (Sigma). La mezcla se incubó 1 hora en baño de agua a 95°C, posteriormente los tubos se colocaron en hielo y se adicionaron 2.5 ml de butanol (Sigma) y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Para cuantificar los niveles de oxidación de la LDLn y LDLmm, se preparó una curva estándar de malondihaldehído (MDA) (Sigma) con concentraciones de nmol de MDA; bajo las condiciones de reacción de la muestras. A las muestras y estándares se les determinó la densidad óptica a 535 nm.

Detección de endotoxinas en la lipoproteína de baja densidad mínimamente oxidada.

A todas las preparaciones de LDLn y LDLmm, se les realizó la detección de endotoxinas utilizando el kit de lisado de Limulus amoebocyte (LAL) por el método de “gel clot” (Charles River Endosafe, Charleston, S.C.). Brevemente, 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, a cada tubo se les adicionó

100 µl del reactivo LAL, posteriormente se incubaron a 37°C 1 hora en un baño maría. Se realizó una curva estándar con el LPS de *Escherichia coli* de 0.5 EU/ml a 0.03 EU/ml bajo las condiciones del fabricante. 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.

Curva dosis respuesta a LDLmm.

Para determinar la concentración adecuada de LDLmm para activar a monocitos y macrófagos se procedió a realizar una curva dosis respuesta a LDLmm. Los monocitos y macrófagos a una concentración de 2×10^5 /ml fueron estimulados con LDLmm (6.0 µg/ml a 50 µg/ml para monocitos y entre 9.0 µg/ml a 70 µg/ml para macrófagos) por 24 horas a 37°C. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados después de 24 horas de incubación a 37°C y se conservaron a -70°C.

Neutralización del efecto biológico del LPS.

A la LDLmm se le realizó otra prueba para descartar la posible contaminación de LPS. La prueba consiste en neutralizar el efecto biológico de LPS con polimixina B. Brevemente, se preincubaron 50 µg/ml de LDLmm, así como, 100 ng/ml de LPS (Sigma) por separado con polimixina B (Calbiochem, Germany) a una concentración de 1 µg/ml, durante 1 hora. Posteriormente, monocitos a una concentración de 2×10^5 /ml se incubaron por separado bajo las siguientes condiciones: LDLmm (50 µg/ml) - polimixina B (1 µg/ml), LPS (100 ng/ml) - polimixina B (1 µg/ml), LDLmm (50 µg/ml), LPS (100 ng/ml) y RPMI 10%, durante 24

horas a 37°C. Finalizados los tratamientos se recuperaron los sobrenadante y se congelaron a -70°C.

Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en la producción de TNF- α en respuesta a sus ligandos específicos.

La capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4 se evaluó en respuesta a su ligando específico y a otro ligando no específico. De manera similar se evaluó el anticuerpo anti-TLR2. Los monocitos a una concentración de 2×10^5 /ml fueron preincubados por 1 hora a 37°C, con 10 μ g/ml de anticuerpo CD14 (Clona MEM10, BD Biosciences, San Jose, California, USA) y por otro lado, con anticuerpo anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), así como, en presencia de ambos anticuerpos. Posteriormente, se estimularon con 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli* serotipo O111:B4 (100 ng/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Por otro lado, los monocitos tratados con los anticuerpos anti-CD14 (Clona MEM10, BD Biosciences) y anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology) fueron incubados con 20 ng/ml de Pam3CSK4 (Alexis Biochemicals, Plymouth Meeting, PA, USA). En otro ensayo, los monocitos (2×10^5 /ml) se trataron con 10 μ g/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). Por otro lado, los monocitos se trataron con 10 μ g/ml de anticuerpo anti-TLR2 (Clona TL2.1, eBioscience Inc) por 1 hora a 37°C y se estimularon con 100 ng/ml de LPS (Sigma). Como control adicional, las células fueron tratadas con 10 μ g/ml de anticuerpo no relevante IgG (Clona MOPC-173 BD Biosciences) antes de la estimulación con los ligandos de TLR. Los sobrenadantes de los

cultivos fueron colectados después de 24 horas de incubación a 37°C y se conservaron a -70°C.

Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10.

La capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se evaluó en la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Los monocitos a una concentración de 2×10^5 /ml fueron preincubados por 1 hora a 37°C, con 10 μ g/ml de anticuerpo CD14 (Clona MEM10, BD Biosciences), con anticuerpo anti-TLR4 (Clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology), así como, en presencia de ambos anticuerpos. Posteriormente, se estimularon con 100 ng/ml de LPS (Sigma) de *Escherichia coli* serotipo O111:B4. En otro ensayo, los monocitos (2×10^5 /ml) se trataron con 10 μ g/ml de anticuerpo anti-TLR2 (Clona TL2.1, eBioscience Inc) por 1 hora a 37°C y se estimularon con 20 ng/ml de Pam3CSK4 (Alexis Biochemicals). Como control adicional, las células fueron tratadas con 10 μ g/ml de anticuerpo no relevante antes de la estimulación con los ligandos de TLR. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados después de 24 horas de incubación a 37°C y se conservaron a -70°C.

Bloqueo de CD14, TLR4 y TLR2 en presencia de la LDLmm.

El bloqueo de CD14, TLR4 y TLR2 en presencia de la LDLmm, se realizó de la siguiente manera. Los monocitos y macrófagos a una concentración de 2×10^5 /ml fueron tratados por separado con anticuerpos anti-CD14 (10 μ g/ml) (BD Biosciences) y anti-TLR4 (10 μ g/ml) (Santa Cruz Biotechnology). Así como, la combinación de ambos, durante 1 hora a 37°C. Simultáneamente, en otro ensayo los monocitos y macrófagos (2×10^5 /ml) fueron tratados

con 10 µg/ml del anticuerpo anti-TLR2 (eBioscience Inc), por 1 hora a 37°C. Posteriormente, los monocitos y macrófagos se lavaron 2 veces con PBS a un pH = 7.4 y un último lavado con RPMI 10%. Después, las células se resuspendieron en 100 µl de medio de cultivo y se incubaron con una concentración final de 50 µg/ml y 70 µg/ml de la LDLmm para monocitos y macrófagos; respectivamente, durante 24 horas a 37°C. Como control de anticuerpo, las células (2×10^5 /ml) fueron tratadas con anticuerpos no relacionados a una concentración de 10 µg/ml por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavaron e incubaron las células con la LDLmm como se indico anteriormente. Como testigo negativo, los monocitos y macrófagos fueron incubados sólo con medio de cultivo o con anticuerpos no relacionados en ausencia de 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 TNF- α .

Se determinaron las concentraciones de TNF- α por ELISA (eBioscience Inc) en sobrenadantes, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionaron 100 µl del anticuerpo de captura toda la noche a 4°C, posteriormente se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% (Sigma), después se adicionaron 200 µl de regulador de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó 5 veces la placa con PBS-Tween 0,05%, se adicionaron 100 µl de las muestras y estándares 1 hora a temperatura ambiente, se lavó 5 veces la placa con PBS-Tween 0,05% y se adicionaron 100 µl de avidina HRP 30 minutos a temperatura ambiente, después se adicionaron 100 µl de sustrato y se realizó la lectura a 450 nm.

Determinación de IL-1 β , IL-6 e IL-10 por CBA.

Las concentraciones de IL-1 β , IL-6 e IL-10 se determinaron de los sobrenadantes de los cultivos de monocitos y macrófagos por citometría de flujo usando el kit “Cytometric Bead Array” (CBA) de BD Biosciences. Brevemente, los estándares fueron diluidos (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 que están recubiertas con anticuerpos específicos de las citocinas 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).

Microscopía confocal.

Se cultivaron monocitos en medio libre de suero por 24 horas a 37°C, posteriormente se incubaron los monocitos (2×10^5 /ml) con LDLmm a una concentración de 50 μ g/ml durante 1 hora a 4°C. Por otro lado, en forma separada, se estimularon monocitos humanos con LPS 100 ng/ml (Sigma) y Pam3CSK4 20 ng/ml (Alexis Biochemicals) como testigos positivos; como testigo negativo los monocitos fueron cultivados solo con medio de cultivo. Finalizado el tiempo, las células fueron lavadas dos veces con PBS pH = 7.4 de incubación. Posteriormente, las células se tiñeron con los anticuerpos anti-CD14-PE (BD Biosciences), anti-TLR4-FITC (Santa Cruz Biotechnology). Por otro lado las células se tiñieron con anticuerpo anti-TLR2-FITC (Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS pH=7.4. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Carl Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Obekochen, Germany) y se analizaron con el programa LSM510.

Determinación de la expresión de TLR2 y TLR4.

Los monocitos y macrófagos a una concentración de 2×10^5 /ml fueron incubados con LDLn y LDLmm (6.0 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$ para monocitos y para los macrófagos de 9.0 $\mu\text{g/ml}$ a 70 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas a 37°C. Las células fueron teñidas con anticuerpo anti-CD14-FITC (eBioscience), anti-TLR2-PE (eBioscience), y anticuerpo anti-TLR4 conjugado a bitoina (eBioscience) seguido de avidina-PE-Cy5 (eBioscience) diluida 1:600 o con anticuerpos de control de isotipo durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS que contenía 1% BSA, 0.5mM de EDTA y 1% de azida de sodio (Sigma-Aldrich). Los niveles de TLR2 y TLR4 fueron medidos usando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los niveles de expresión de los TLR fueron cuantificados usando la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada muestra usando el software FlowJo (Tree Star, Inc).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba de U de Mann–Whitney. El análisis fue realizado utilizando el programa de cómputo SPSS 12.0 para WINDOWS.

Resultados

Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en la producción de TNF- α en respuesta a ligandos específicos.

Para determinar la capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 para las pruebas de inhibición de los receptores, los monocitos se preincubaron con los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 o ambos; posteriormente se estimularon con LPS como testigo positivo de la activación de CD14/TLR4. Encontramos que el LPS induce la secreción de TNF- α . En contraste, los anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4 inhiben la producción de TNF- α en los monocitos en respuesta a LPS (figura 6A). Por otro lado, los monocitos preincubados con anticuerpo anti-TLR2 y su posterior activación con LPS no provocó inhibición en la secreción de TNF- α (figura 6A). En otro ensayo, los monocitos al ser incubados con Pam3CSK4 fueron capaces de producir TNF- α . Sin embargo, el bloqueo de TLR2 en los monocitos y su posterior estimulación con Pam3CSK4 indujo una inhibición en la producción de TNF- α (figura 6B). En contraste, cuando los monocitos fueron previamente incubados con anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 o la combinación de ambos y posteriormente estimulados con Pam3CSK4 no se determinó un efecto inhibitorio en la síntesis TNF- α (figura 6B). Lo que se sugiere que los anticuerpos usados son capaces de inhibir la secreción de TNF- α a ligandos específicos de CD14, TLR4 y TLR2.

Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10.

En este trabajo también se evaluó la capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Los monocitos se preincubaron con los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 o ambos y posteriormente se

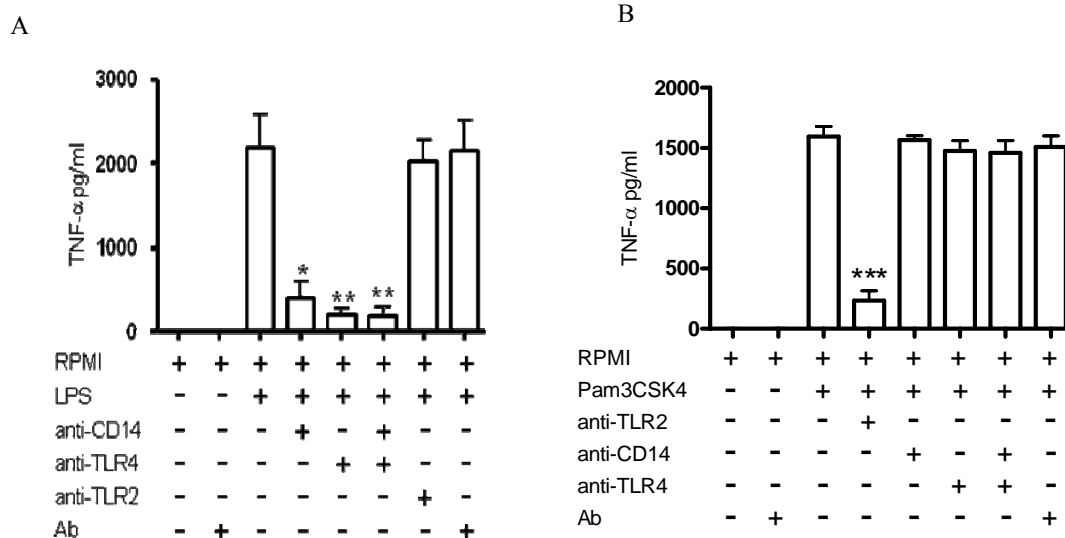


Figura 6. Capacidad de inhibición de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en la producción de TNF- α . (6A) Se incubaron monocitos en presencia de anticuerpo anti-CD14 (10 μ g/ml), anticuerpo anti-TLR4 (10 μ g/ml) y la combinación de ambos anticuerpos. Por otro lado, los monocitos se incubaron con anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml); posteriormente a todos los tratamientos se les adiciono LPS (100 ng/ml). (6B) En otro ensayo los monocitos se incubaron con anticuerpo anti-CD14 (10 μ g/ml), anticuerpo anti-TLR4 (10 μ g/ml) y la combinación de ambos anticuerpos. Por otro lado, los monocitos también se incubaron con anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml); después a todos los tratamientos se les adiciono Pam3CSK4 (20 ng/ml). Los monocitos se incubaron con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 μ g/m) como control de anticuerpo. Los monocitos se incubaron durante 24 horas y recuperaron los sobrenadantes para determinar TNF- α por ELISA. Datos representativos de al menos 8 experimentos independientes. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LPS o Pam3CSK4 (* p <0.05, ** p <0.002, *** p <0.0001).

estimularon con LPS. Encontramos que el LPS induce la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10. En contraste, el bloqueo previo de CD14, TLR4 o ambos, inhiben la producción de IL-1 β (figura 7A), IL-6 (figura 7B) e IL-10 (figura 7C) en respuesta a LPS. Por otro lado, los monocitos en presencia de Pam3CSK4 secretaron IL-1 β (figura 7A), IL-6 (figura 7B) e IL-10 (figura 7C). El bloqueo de TLR2 indujo una inhibición en la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Estos resultados demuestran la capacidad de los anticuerpos neutralizantes en inhibir la secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-10.

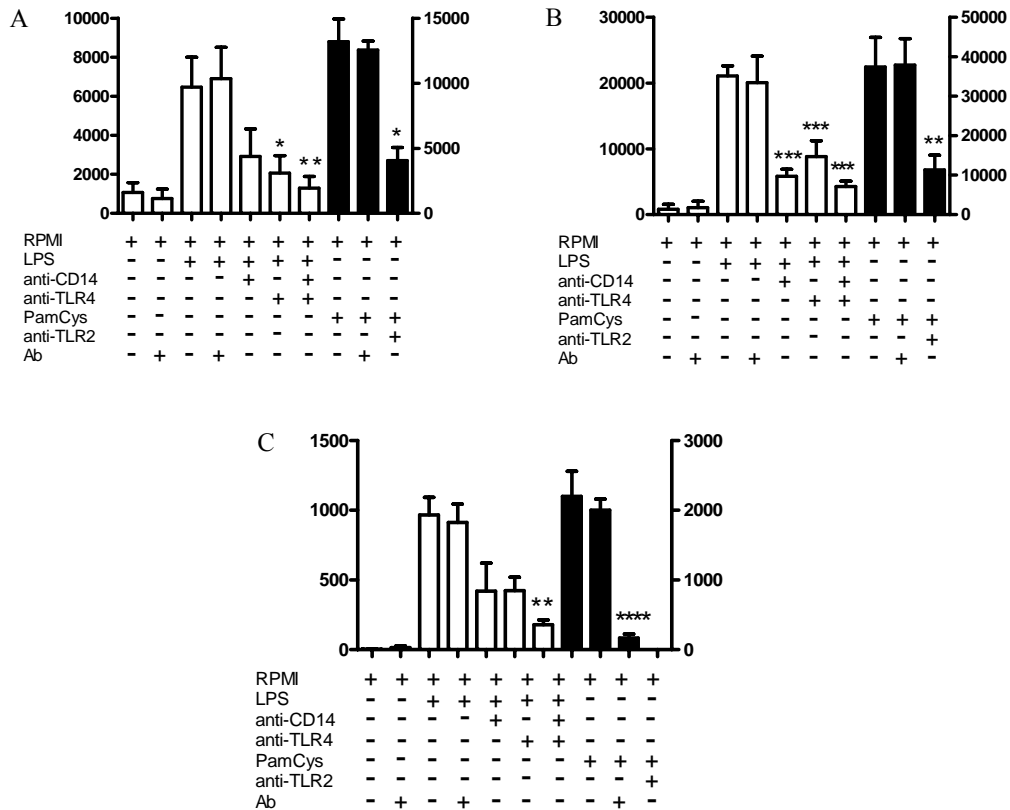


Figura 7. Capacidad de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 en inhibir la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-10. Se incubaron los monocitos con anticuerpo anti-CD14 (10 μ g/ml), anticuerpo anti-TLR4 (10 μ g/ml) o la combinación de los ambos, así como con anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml) antes de la incubación con LPS (100 ng/ml) o Pam3CSK4 (20 ng/ml) como se indican en la figuras. Los monocitos se incubaron con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 μ g/ml) como control de anticuerpo. Los monocitos se incubaron durante 24 horas y se recuperaron los sobrenadantes para determinar IL-1 β (7A), IL-6 (7B) e IL-10 (7C) por CBA. Datos representativos de al menos 8 experimentos independientes. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LPS o Pam3CSK4 (* p <0.05, ** p <0.02*** p <0.002, **** p <0.0001).

Concentración y grado de oxidación de la LDLmm.

La LDLn obtenida por ultracentrifugación, se le determinó la concentración de lipoproteína de alta densidad, la cual fue del 0%. Para la lipoproteína de muy baja densidad fue en promedio del 3% y para la LDL en promedio fue mayor al 97% (figura 8). Se encontró que el nivel de oxidación que presentó la LDLn en promedio fue de 0.71 nmol/ml de

malondealdehído y la LDLmm presentó en promedio 2.5 nmol/ml de malondealdehído (figura 9).

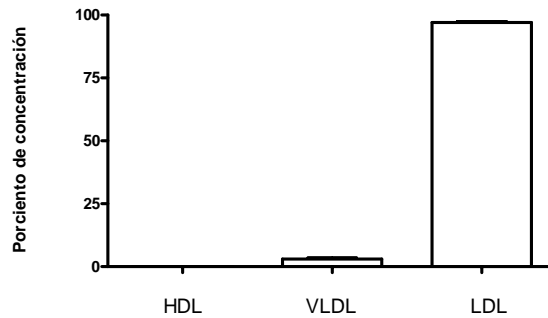


Figura 8. Caracterización de la lipoproteína de baja densidad obtenida por ultracentrifugación. Cuantificación de las moléculas de lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL). Datos representativos de al menos 15 experimentos independientes.

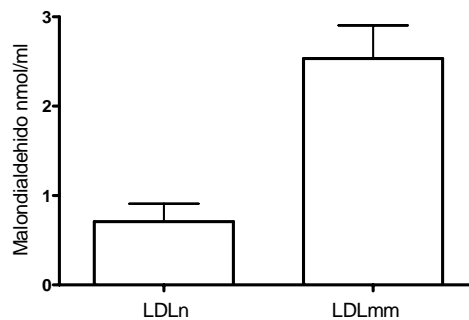


Figura 9. Grado de oxidación de la LDL nativa y de la LDL mínimamente modificada. El grado de oxidación se determinó de al menos 15 experimentos independientes de la LDLn y LDLmm, a través del método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Secreción de TNF- α por monocitos y macrófagos al estímulo de LDLn y LDLmm.

Una vez obtenida la LDLmm, se estandarizó la activación de monocitos y macrófagos con la lipoproteína. Se encontró que la LDLmm induce la secreción de TNF- α de manera dosis dependiente en monocitos y macrófagos. Con base en las curvas estándar obtenidas, se decidió utilizar una concentración de 50 μ g/ml de LDLmm para monocitos (figura 10A) y de 70 μ g/ml de LDLmm para macrófagos (figura 10B) en los posteriores experimentos. A

los cultivos celulares se les determinó la viabilidad celular por exclusión de azul tripano obteniendo siempre una viabilidad mayor al 90%.

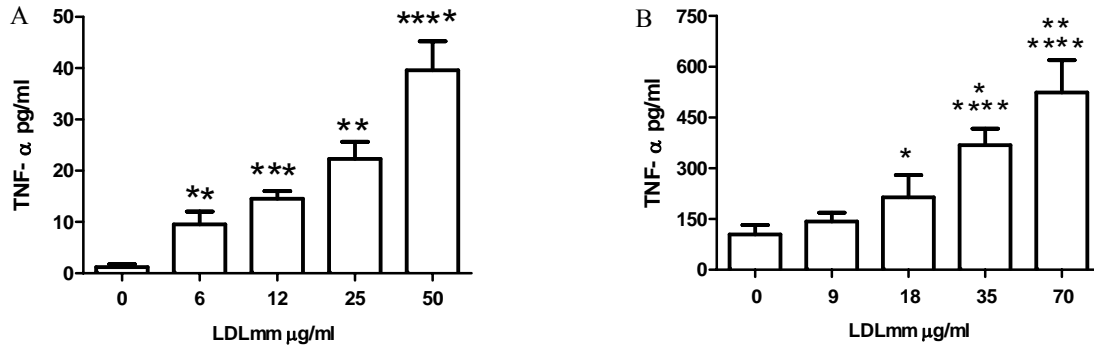


Figura 10. Efecto de la LDLmm en la secreción de TNF- α en monocitos y macrófagos. Se incubaron monocitos (10A) y macrófagos (10B) en presencia de LDLmm en concentraciones crecientes, por 24 horas a 37°C. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados después de 24 horas de incubación a 37°C y se les determinó TNF- α por ELISA (* p <0.05). Todas las concentraciones de la LDLmm se comparan contra las células en ausencia de LDLmm. Datos representativos de al menos 8 experimentos independientes. (* p <0.05, ** p <0.02, *** p <0.003, **** p <0.002, ***** p <0.001, ***** p <0.0008).

Detección de endotoxinas en la LDLn y de la LDLmm.

Antes de realizar los ensayos para determinar el efecto biológico de la LDLmm sobre los receptores CD14, TLR4 y TLR2, nosotros descartamos la probable contaminación de LPS, por lo que se realizó la prueba de detección de endotoxinas a las preparaciones de LDLn y LDLmm a través del ensayo de lisado de limulus y resultaron negativas. Además, se realizó una segunda prueba a la LDLmm; en la cual se utilizó polimixina B para neutralizar el probable efecto biológico del LPS contaminante y así se confirmó que el efecto biológico fue exclusivo de la LDLmm. El LPS como testigo positivo en presencia con polimixina B se provocó una inhibición en la secreción de TNF- α con respecto al estímulo del LPS sin polimixina B (figura 11A). En contraste, al mezclar LDLmm con polimixina B y estimular los monocitos durante 24 horas, no se presentó modificación alguna en la secreción de TNF- α al compararlo con la LDLmm sin polimixina B (figura 11B).

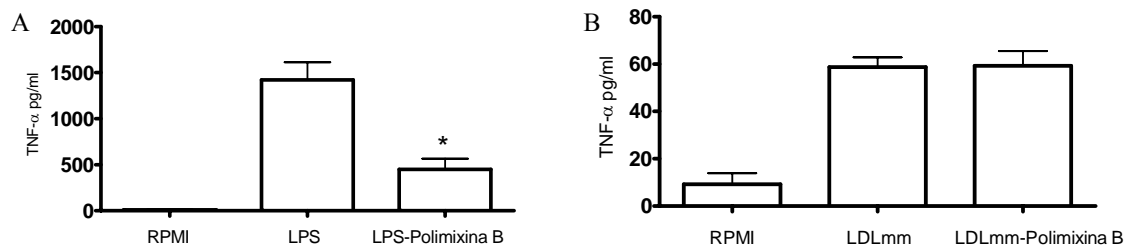


Figura 11. Efecto de la polimixina en la producción de TNF- α inducida por la LDLmm. (11A) Los monocitos humanos se incubaron con 100 ng/ml de LPS o la mezcla LPS-polimixina B (1 μ g/ml) durante 24 horas a 37°C. (11B) Los monocitos se incubaron con LDLmm (70 μ g/ml) o con la mezcla LDLmm-polimixina B (1 μ g/ml) durante 24 horas a 37°C. A partir de los sobrenadantes de cultivo se determinó TNF- α por el método de ELISA. El tratamiento LPS-Polimixina B se compara contra las células estimuladas con LPS. El tratamiento LDLmm-Polimixina B se compara contra las células estimuladas con LDLmm. Datos representativos de al menos 6 experimentos independientes (* $p < 0.03$).

Papel de CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a LDLmm en monocitos.

Para evaluar el papel de la LDL en la activación de CD14, TLR2 y TLR4, se estimularon monocitos con LDLmm (50 μ g/ml) lo que provocó un incremento en la síntesis de TNF- α de alrededor de 30 pg/ml con respecto a las células incubadas sólo con medio de cultivo. En contraste, cuando se bloqueó el receptor CD14 en los monocitos con anticuerpo anti-CD14 (10 μ g/ml) y posteriormente se estimuló con LDLmm, se indujo una disminución del 60% en la secreción de TNF- α . De forma similar se encontró una inhibición del 63% cuando se bloqueó el receptor TLR4 y en el mismo sentido se encontró una inhibición del 68% en la síntesis de TNF- α al bloquear ambos receptores (figura 12A). Cuando se bloqueó TLR2 en los monocitos con anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml) y posteriormente se estimuló con LDLmm, se indujo una disminución del 60% en la secreción de TNF- α (figura 12B). Estos resultados demuestran que la LDLmm activa a CD14, TLR4 y TLR2 induciendo la secreción de TNF- α .

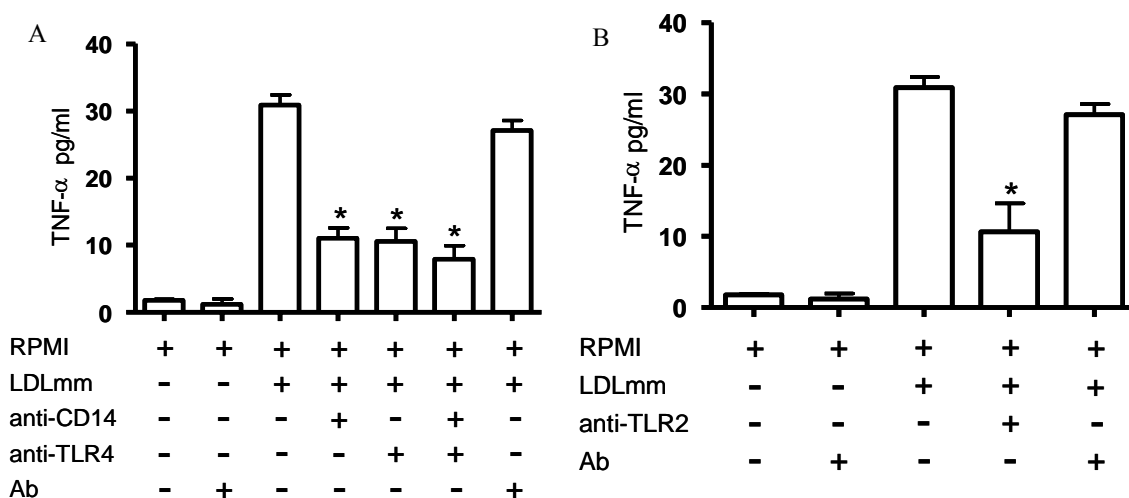


Figura 12. Papel de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a LDLmm en monocitos. (12A) Se incubaron los monocitos con anticuerpo anti-CD14 (10 $\mu\text{g/ml}$), anticuerpo anti-TLR4 (10 $\mu\text{g/ml}$) y la combinación de los anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4. (12B) Los monocitos se incubaron con anticuerpo anti-TLR2 (10 $\mu\text{g/ml}$), antes de la incubación con LDLmm (50 $\mu\text{g/ml}$). Los monocitos se incubaron durante 24 horas y a los sobrenadantes de los cultivos se les determinó TNF- α por ELISA. Los monocitos se incubaron con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 $\mu\text{g/m}$) como control de anticuerpo. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLmm. Datos representativos de al menos 8 experimentos independientes. (* $p < 0.0001$).

Papel de CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a LDLmm en macrófagos.

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos con los monocitos humanos, determinamos el papel de CD14, TLR4 y TLR2 al estímulo de LDLmm en macrófagos derivados de línea celular U937. Se estimularon macrófagos con LDLmm lo que provocó un incremento en la síntesis de TNF- α de alrededor de 400 pg/ml con respecto a las células incubadas sólo con medio de cultivo. En contraste, cuando se bloqueó el receptor CD14 en los macrófagos con anticuerpo anti-CD14 y posteriormente se estimuló con LDLmm, se indujo una disminución del 61% en la secreción de TNF- α ; de forma similar se encontró una inhibición del 63% cuando se bloqueó el receptor TLR4 y el bloqueo de ambos receptores afectó la secreción de TNF- α en un 69% (figura 13A). Posteriormente

evaluamos si TLR2 se requiere para la síntesis de TNF- α al estímulo de LDLmm. Los macrófagos al ser estimulados con LDLmm incrementaron la secreción de TNF- α . Sin embargo, el bloqueo de TLR2 inhibió la producción de TNF- α aproximadamente en un 66% (figura 13B). Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos con los monocitos humanos.

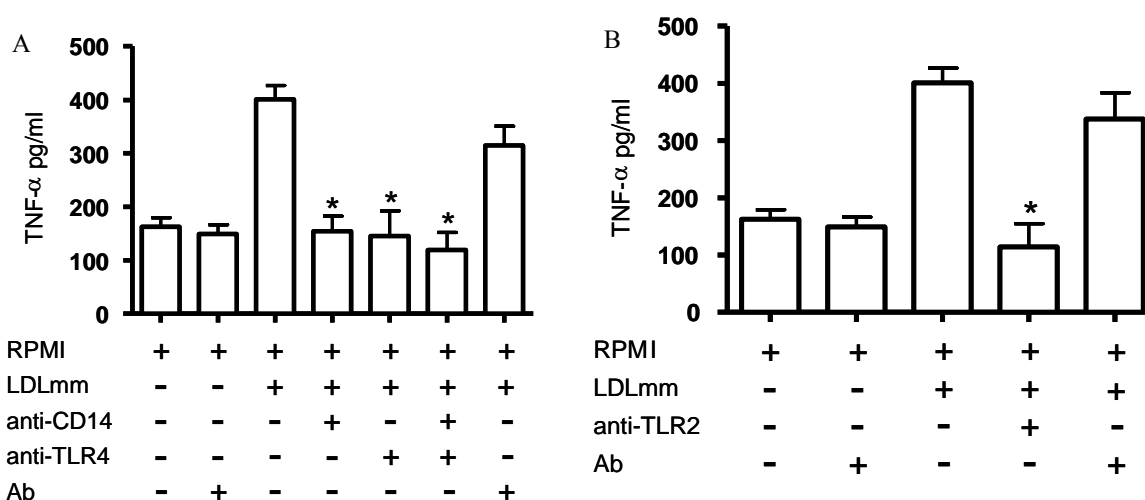


Figura 13. Papel de los receptores CD14, TLR4 y TLR2 en respuesta a LDLmm en macrófagos. (13A) Se incubaron macrófagos derivados de la línea celular U937 en presencia de anticuerpo anti-CD14 (10 μ g/ml), anticuerpo anti-TLR4 (10 μ g/ml) y la combinación de los anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4. (13B) Por otro lado, los macrófagos se incubaron con anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml), antes de la incubación con LDLmm (70 μ g/ml). Los macrófagos se incubaron con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 μ g/ml) como control de anticuerpo. Los macrófagos se incubaron durante 24 horas y a los sobrenadantes de los cultivos se les determinó TNF- α por ELISA. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLmm. Datos representativos de al menos 8 experimentos independientes. (* $p < 0.001$).

Inhibición en la síntesis de IL-1 β en monocitos y macrófagos por el bloqueo de CD14 y TLR4.

Después de haber demostrado que la LDLmm activa a CD14 y TLR4 induciendo la producción de TNF- α , se decidió analizar la participación de estos receptores en la secreción de IL-1 β . Al estimular monocitos (figura 14A) y macrófagos (figura 14B) con

LDLmm se indujo una producción considerable de IL-1 β . El bloqueo previo de CD14 en los monocitos y macrófagos antes del estímulo con LDLmm inhibió la producción de IL-1 β en un 72% y 59%, respectivamente. Mientras tanto, el bloqueo de TLR4 en monocitos y macrófagos inhibe la producción de IL-1 β en un 67% y 53%, respectivamente. Cuando se bloquearon CD14 y TLR4 en monocitos y macrófagos, se observó una disminución del 73% y 69%, respectivamente, en la secreción de IL-1 β .

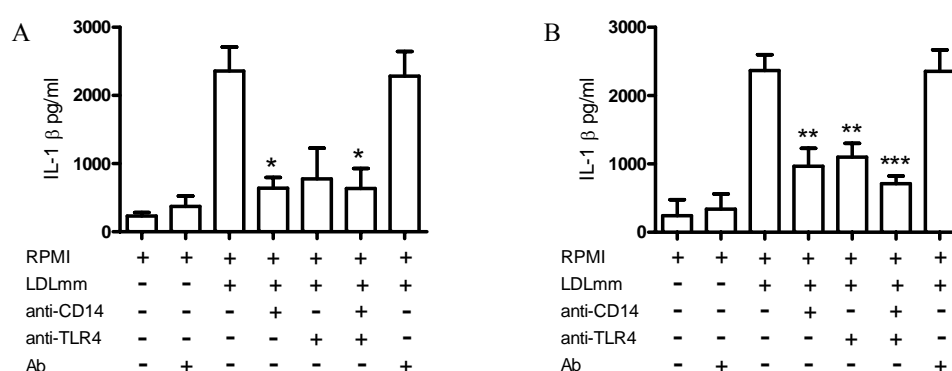


Figura 14. Papel de CD14 y TLR4 en la producción de IL-1 β en respuesta a LDLmm. Los monocitos (14A) y macrófagos (14B) fueron incubados con anticuerpos anti-CD14 (10 μ g/ml), anti-TLR4 (10 μ g/ml) y la combinación de anti-CD14 y anti-TLR4 durante 1 hora antes de la estimulación con LDLmm (50 μ g/ml). Por otro lado, los monocitos y macrófagos fueron incubados con anticuerpo anti-TLR2 (10 μ g/ml) durante 1 hora antes de la estimulación con LDLmm (50 μ g/ml para monocitos y 70 μ g/ml para macrófagos). Ambos tipos celulares se incubaron con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 μ g/ml) en presencia o ausencia de LDLmm. La concentración de IL-1 β en el sobrenadante de cultivo se determinó por CBA. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLmm. Datos representativos de al menos 7 experimentos independientes. (* $p < 0.0001$, ** $p < 0.007$, *** $p < 0.002$).

Inhibición en la producción de IL-6 en monocitos y macrófagos al bloquear CD14 y TLR4.

Los monocitos y macrófagos estimulados con la LDLmm provoca la secreción de IL-6. El bloqueo de CD14 en monocitos (figura 15A) y macrófagos (figura 15B) ocasionó una reducción en la producción de IL-6 de alrededor del 58% y 52%, respectivamente. Cuando se trataron con anti-TLR4 y posterior estimuló con la LDLmm se encontró una inhibición del

63% y del 63% respectivamente en la síntesis de IL-6. El bloqueo de CD14 y TLR4 provocó una inhibición de IL-6 del 69% y 67% después de 24 horas de cultivo con respecto a los monocitos y macrófagos estimulados solo con la LDLmm.

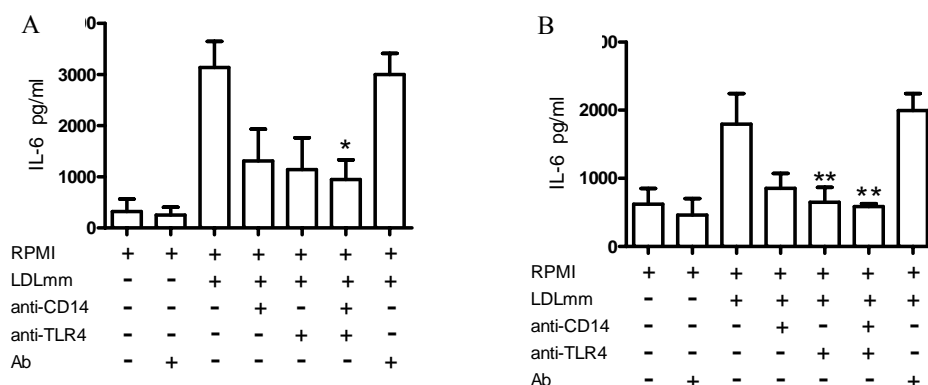


Figura 15. Papel de CD14 y TLR4 en la secreción de IL-6 en respuesta a LDLmm. Los monocitos (15A) y macrófagos (15B) fueron incubados con anticuerpos anti-CD14 (10 µg/ml), anti-TLR4 (10 µg/ml) y la combinación de anti-CD14 y anti-TLR4 durante 1 hora antes de la estimulación con LDLmm (50 µg/ml para monocitos y 70 µg/ml para macrófagos). Por otro lado, los monocitos y macrófagos fueron incubados con anticuerpo anti-TLR2 (10 µg/ml) durante 1 hora antes de la estimulación con LDLmm. Ambos tipos celulares se incubaron con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 µg/ml) en presencia o ausencia de LDLmm. La concentración de IL-6 en el sobrenadante de cultivo se determinó por CBA. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con la LDLmm. Datos representativos de al menos 7 experimentos independientes. (*p<0.009, **p<0.003).

EL bloqueo de TLR2 previene la síntesis de IL-1β e IL-6 en monocitos y macrófagos

El estímulo de la LDLmm indujo en monocitos y macrófagos un incremento en la secreción de IL-β e IL-6. El bloqueo previo de TLR2 con anti-TLR2, indujo una inhibición de IL-1β del 65% en monocitos (figura 16A) y del 57% en macrófagos (figura 16B), mientras que la producción de IL-6 al estímulo de la LDLmm se afectó en un 40% en monocitos (figura 16C) y 62% en macrófagos (figura 16D) respectivamente, cuando se bloqueo el TLR2.

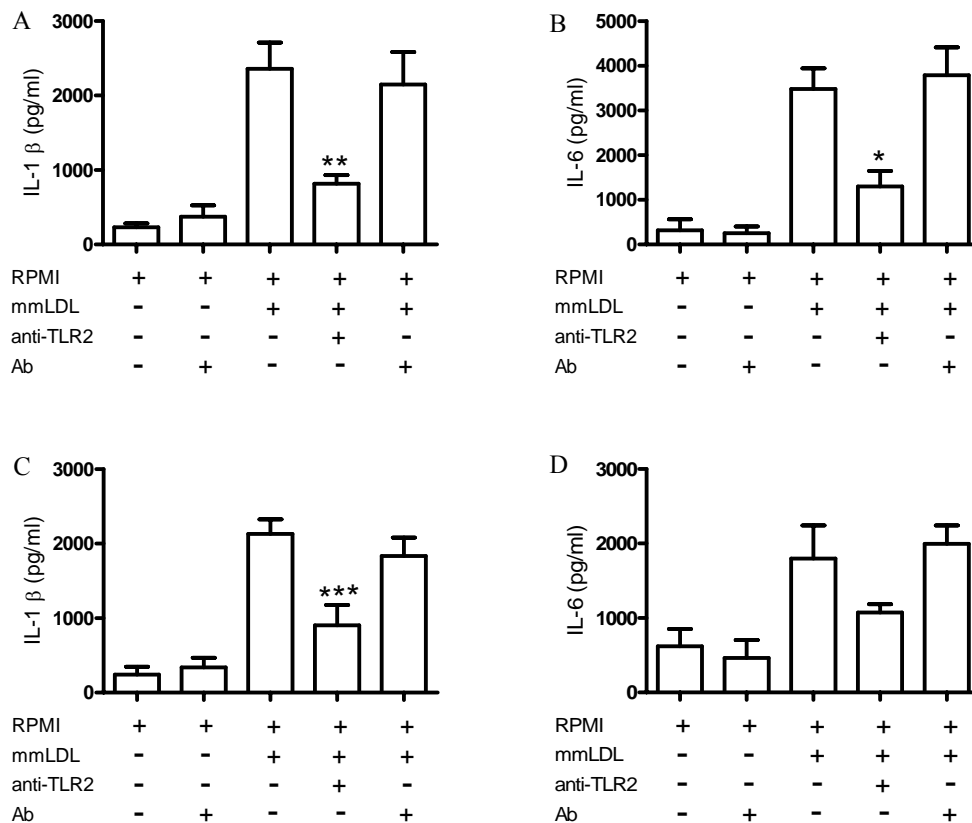


Figura 16. Papel de TLR2 en la secreción de IL-1 β e IL-6 en respuesta de la LDLmm. Los monocitos (16A y 16C) y macrófagos (16C y 16D) fueron tratados con anticuerpo anti-TLR2 (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora antes de la estimulación con LDLmm (50 $\mu\text{g/ml}$ para monocitos y 70 $\mu\text{g/ml}$ para macrófagos). Por otro lado, los monocitos y macrófagos fueron incubados con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 $\mu\text{g/ml}$) en presencia o ausencia de LDLmm. Las concentraciones de IL-1 β e IL-6 en el sobrenadante de cultivo se determino por CBA. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLmm. Datos representativos de al menos 7 experimentos independientes. (* $p < 0.003$, ** $p < 0.005$ *** $p < 0.008$).

El papel de CD14, TLR4 y TLR2 en la producción de IL-10 al estímulo de la LDLmm

Al estimular monocitos y macrófagos por 24 horas en presencia de la LDLmm se incrementó la síntesis de IL-10. Por otro lado, el bloqueo de CD14 provocó una inhibición del 63% en monocitos y 65% en macrófagos. La presencia de anticuerpo anti-TLR4 inhibió la síntesis de IL-10 en un 60% monocitos y 61% en macrófagos. El bloqueo de ambos receptores indujo una reducción del 63% en monocitos (figura 17A) y del 65% en

macrófagos (figura 17C). Por otro lado, el tratamiento con anticuerpo anti-TLR2 previo al estímulo con la LDLmm provocó una inhibición del 75% en monocitos (figura 17B) y 72% macrófagos (figura 14D) con respecto al estímulo sólo de la LDLmm en ambos tipos celulares.

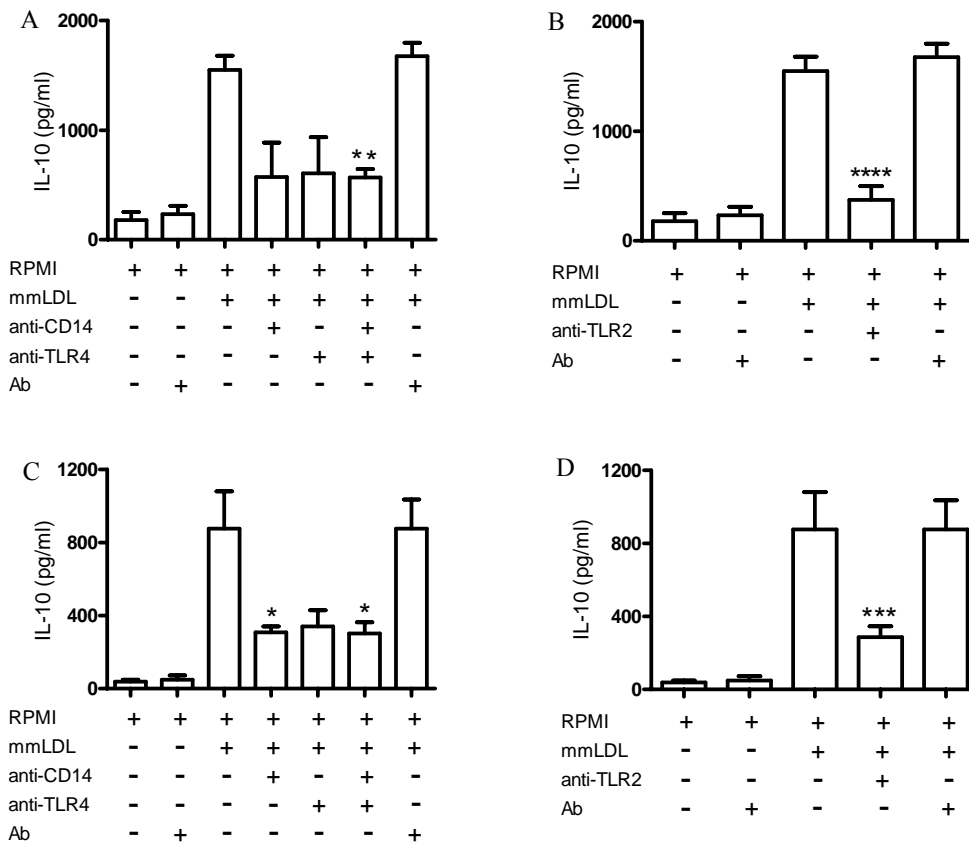


Figura 17. Papel de CD14, TLR4 y TLR2 en la secreción de IL-10 en respuesta a la LDLmm. (17A) Los monocitos y (17C) macrófagos fueron tratados con anticuerpos anti-CD14 (10 $\mu\text{g/ml}$), anti-TLR4 (10 $\mu\text{g/ml}$) y la combinación de anti-CD14 y anti-TLR4 durante 1 hora antes de la estimulación con 50 $\mu\text{g/ml}$ para monocitos y 70 $\mu\text{g/ml}$ para macrófagos. Por otro lado, (17B) los monocitos y (17D) macrófagos fueron incubados con el anticuerpo anti-TLR2 (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora antes de la estimulación con la LDLmm. Los monocitos y los macrófagos se incubaron con anticuerpo no relacionado (Ab) (10 $\mu\text{g/ml}$) en presencia o ausencia de LDLmm. La concentración de IL-10 en el sobrenadante de los cultivos fue determinado por CBA. El efecto de los anticuerpos anti-CD14, anti-TLR4 y anti-TLR2 se compara contra las células estimuladas solo con LDLmm. Datos representativos de al menos 7 experimentos independientes. (* $p < 0.04$, ** $p < 0.0003$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0006$).

Redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular.

Por otro lado, analizamos si la LDLmm era capaz de inducir la redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular de los monocitos. Los monocitos en ausencia de estímulo presentaron una distribución homogénea de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular (figura 18A, 18B y 18J). En contraste, cuando los monocitos fueron estimulados con LPS como control positivo de la vía CD14/TLR4 provocó una redistribución de CD14 y TLR4 (figura 18D y 18E) así como la co-localización de CD14/TLR4 (figura 18F) con respecto a los monocitos sin estímulo. La presencia de Pam3CSK4 como control positivo de TLR2, provocó la redistribución de TLR2 (figura 18K) en la superficie celular de monocitos al compararse con monocitos sin estímulo (figura 18J). Al probar el estímulo de la LDLmm sobre los monocitos encontramos una redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 (figura 18G, 18H y 18L) y la co-localización de CD14/TLR4 (figura 18I) en la superficie celular, con respecto a los monocitos sin estímulo.

Expresión de TLR2 y TLR4 en la superficie celular

Los niveles de expresión de TLR2 y TLR4 de los monocitos (figura 19A) y macrófagos (figura 19B), al estímulo con la LDLmm se incrementaron de manera dosis dependiente. También, determinamos que el tratamiento con la LDLmm en los monocitos y macrófagos provocó niveles más altos de TLR2 que de TLR4.

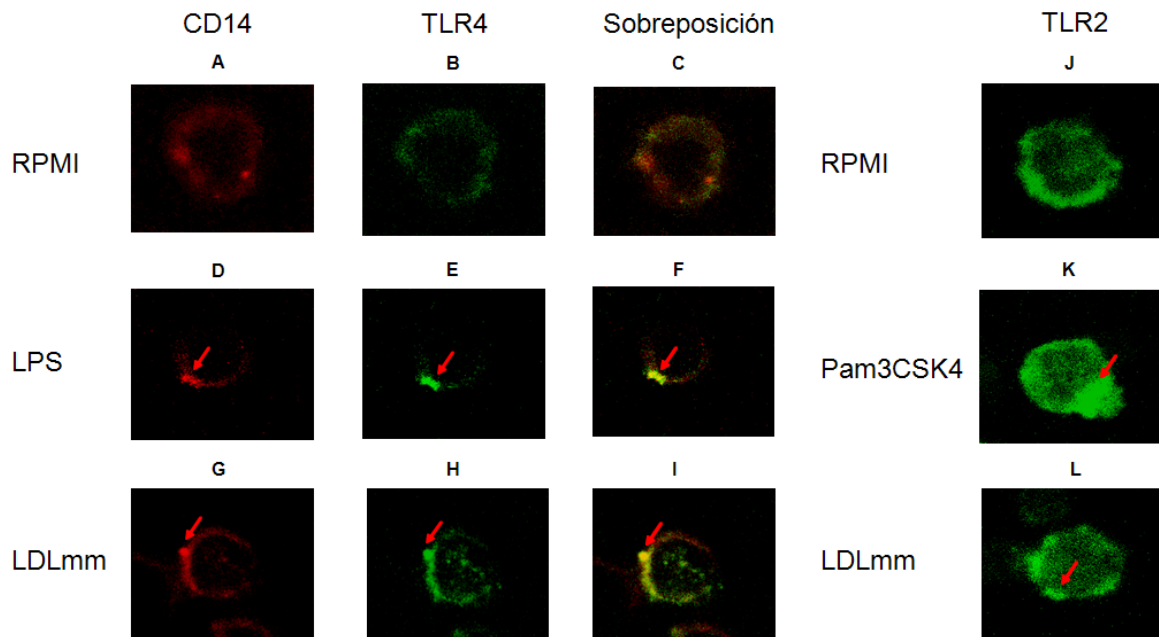


Figura 18. Redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular al estímulo de la LDLmm. Los monocitos fueron incubados sólo con medio de cultivo RPMI (18A-18C y 18J), con LPS 100 ng/ml (18D-18F), con Pam3CSK4 20 ng/ml (18K) y con la LDLmm a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora a 37°C (18G-18I y 18L). Los monocitos fueron teñidos con anti-CD14-PE (rojo), anti-TLR4-FITC (verde) y anti-TLR2-FITC (verde). La co-localización de los receptores en la superficie celular se muestra de color amarillo al sobreponer las imágenes (18F,18I). La flecha indica la redistribución de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular. Datos representativos de al menos 5 experimentos independientes.

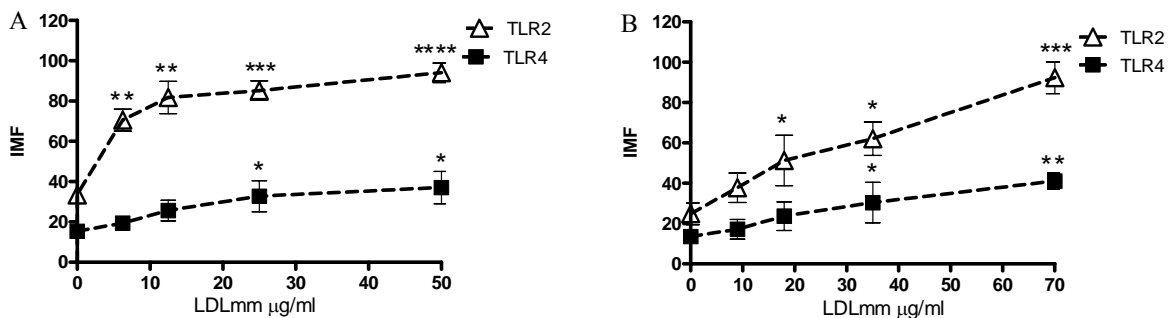


Figura 19. Incremento en la expresión de TLR2 y TLR4 al estímulo de la LDLmm. (19A) Los monocitos y (19B) macrófagos fueron incubados con diferentes concentraciones de LDLmm como se indica en la figura durante 24 horas y se analizó la expresión de TLR2 y TLR4 por citometría de flujo. El triángulo indica TLR2 y el cuadrado indica TLR4. Los niveles de expresión de los TLR se indican en intensidad media de fluorescencia (IMF). El efecto biológico de la LDLmm se compara contra las células en ausencia de la LDLmm. Datos representativos de al menos 7 experimentos independientes. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.008$).

Discusión

La aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria, en la cual están involucrados diversos factores de riesgo; uno de los más importantes son las altas concentraciones de LDL en plasma. Diversos estudios muestran que la modificación oxidativa de la LDL influye en el desarrollo de la lesión aterosclerosa, promoviendo la respuesta inflamatoria [7,8]. Estudios recientes han involucrado a receptores de la inmunidad innata con los eventos inflamatorios, especialmente CD14, TLR2 y TLR4 claves en la respuesta a patógenos. Se ha demostrado un incremento en la expresión de estos receptores en la placa aterosclerosa y se ha considerado la posibilidad que los receptores TLR2 y TLR4 se activen por microorganismos o antígenos endógenos como la lipoproteína de baja densidad modificada oxidativamente provocando o acelerando el fenómeno inflamatorio [44,45].

Inicialmente, fue establecida la capacidad de inhibición de los anticuerpos usados. Nosotros demostramos que los anticuerpos anti-CD14, y anti-TLR4 fueron capaces de inhibir la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en presencia de LPS; de forma similar el anticuerpo anti-TLR2 inhibió la secreción de TNF- α IL-1 β , IL-6 e IL-10 al estímulo de Pam3CSK4.

A diferencia de la mayoría de los reportes de la literatura [44,45] donde usan microorganismos o PAMPs para poner de manifiesto que la activación celular de las vías CD14/TLR4 y TLR2 involucradas en los procesos aterosclerosos, en nuestro modelo de estudio se trabajó con la LDLmm como un antígeno endógeno presente en la placa aterosclerosa para demostrar la activación de las vías CD14/TLR4 y TLR2.

En el modelo de estudio determinamos el efecto de la LDLmm en monocitos y macrófagos. Los resultados presentados en este trabajo muestran que la LDLmm induce un incremento en la síntesis de TNF- α en monocitos y macrófagos; dicho aumento concuerda con datos obtenidos en monocitos, los cuales expresan un aumento en la secreción de TNF- α bajo el estímulo con LDLox [61,62]. Más aún, la estimulación de macrófagos con lípidos modificados inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-8 y TNF- α , entre otras [20]. Los resultados obtenidos muestran que la LDLmm es una molécula proaterogénica debido a que induce la secreción de TNF- α en monocitos y macrófagos; los cuales son esenciales en la inflamación y en el desarrollo de la placa aterosclerosa [63].

Posteriormente decidimos investigar la participación de CD14 en la síntesis de TNF- α en respuesta a la LDLmm en monocitos y macrófagos. El correceptor CD14 es una glicoproteína anclada en la membrana celular y ha sido propuesto como el primer receptor de reconocimiento de patrón involucrado en el reconocimiento de componentes bacterianos [42]; el cual facilita la expresión de moléculas inflamatorias a través de la activación de los TLR [64]. Los resultados obtenidos muestran que al bloquear el receptor CD14 en monocitos y macrófagos se afectó la secreción de TNF- α en presencia de LDLmm, lo que demuestra que CD14 participa en la secreción de TNF- α en respuesta a LDLmm. Por lo que la activación de CD14 por la LDLmm implica que la respuesta celular se debe a la vía de activación de TLR4 porque CD14 es un correceptor que no tiene un dominio de señalización [65]. Diversos reportes han demostrado que cuando está presente el LPS, el CD14 se asocia al TLR4 y se dispara un proceso de señalización intracelular que incluye la activación de NF- κ B y se ha demostrado que la activación de NF- κ B regula la síntesis de TNF- α [49,66]. Resultados similares a los de este estudio obtenidos por Miller y col,

demuestran que la LDLmm induce la polimerización de f-actina y el “spreading” en macrófagos silvestres, a través de CD14. En contraste, el efecto de la LDLmm en macrófagos deficientes de TLR4 provoca una disminución en la polimerización de f-actina [16]. Más aún, estos resultados son apoyados por un reporte que demuestra que el bloqueo de CD14 con anticuerpo anti-CD14 en monocitos previo al estímulo con LDLox reduce significativamente la concentración de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β e IL-6 [61]. Por otro lado, también se ha demostrado que el bloqueo de CD14 *in vitro* inhibe considerablemente la secreción de TNF- α [67]. Los resultados obtenidos sugieren que monocitos y macrófagos pueden reconocer a la LDLmm a través de CD14 y a través de otros receptores como TLR2 o TLR4 activar a los monocitos o macrófagos induciendo secreción de TNF- α ; lo que puede tener una consecuencia proaterogénica.

La expresión de TLR4 se ha determinado en las lesiones ateroscleróticas humanas y de ratón; predominantemente en los macrófagos [54]. Por otro lado, estudios *in vivo* en ratones Apoe^{-/-}/TLR4^{-/-} han reportado una reducción del 24% de la placa aterosclerótica [45]. Estas evidencias sugieren la posible participación de TLR4 en las células de la respuesta inmune en la lesión. Por lo que se decidió, determinar el efecto de la LDLmm bloqueando TLR4 en monocitos. Los resultados encontrados muestran que el bloqueo de TLR4 induce un efecto inhibitorio en la secreción de TNF- α en el sobrenadante de monocitos. Esto probablemente indica que la LDLmm induce la producción de TNF- α activando a TLR4; debido a que este receptor tiene una región intracelular de señalización [68]. Se ha demostrado que la activación específica de macrófagos a través de TLR4 utilizando PAMPs induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α [68]. Los datos obtenidos en este trabajo son apoyados por un estudio realizado por Hodgkinson y col, quienes demostraron

que productos finales de glicosilación de LDL (AGE-LDL) provocaban la producción de IL-6 y TNF- α en macrófagos. Por otro lado, demuestran que la deficiencia TLR4 en macrófagos reduce la secreción estas citocinas pro-inflamatorias al estímulo de AGE-LDL. Además, determinan que el bloqueo de TLR4 con anti-cuerpo anti-TLR4 en macrófagos afectó la producción de TNF- α al estímulo de AGE-LDL [69]. Más aún se ha demostrado que TLR4 puede ser activado por antígenos endógenos [70].

En la aterosclerosis se ha demostrado que moléculas endógenas como LDLox participan en el desarrollo de la lesión [13]. Adicionalmente; un estudio *in vivo* apoya la posibilidad de que algunos ligandos endógenos señalicen a través de TLR4 en la aterosclerosis. En este estudio demostraron que la deficiencia genética de TLR4 se asocia con una reducción aproximadamente del 24% de la placa aterosclerosa en ratones propensos en desarrollar aterosclerosis a pesar de la hipercolesterolemia; también demuestran que la carencia de TLR4 reduce los niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 [45]. Por lo tanto, es muy posible que antígenos endógenos como la LDLmm estén participando en la activación del complejo CD14/TLR4. La interacción de CD14 y TLR4 con PAMPs se ha demostrado que juega un papel crítico en la activación de células inmunes; generando señales intracelulares que causan la translocación de NF- κ B induciendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , entre otras [71]. Al determinar la participación en su conjunto de CD14 y TLR4 en respuesta a la LDLmm, se encontró que el bloqueo simultáneo de ambos receptores inhibe la secreción de TNF- α por monocitos. Estos datos concuerdan con un estudio que exploró de forma individual la participación de CD14 al estímulo de LDLox; en este estudio los autores determinaron que los monocitos secretan TNF- α de manera dosis dependiente al estímulo de LDLox y en presencia de anticuerpo

anti-CD14 se reduce la secreción de TNF- α en respuesta a LDLox [61]. Otro estudio determina que el bloqueo de TLR4 en macrófagos afecta la producción de TNF- α al estímulo de AGE-LDL [69].

Otro TLR que se ha considerado que participa en la patogénesis de la aterosclerosis es TLR2. Un estudio *in vitro* ha demostrado que la activación de macrófagos a través TLR2 con *C. pneumoniae* induce la formación de células espumosas [72]. Por otro lado, se ha reportado que la estimulación de células mononucleares con *C. pneumoniae* induce la secreción de TNF- α e IL-1 β . En contraste, el bloqueo de TLR2 con anticuerpo neutralizante provocó una reducción en la producción de TNF- α e IL-1 β ; estos resultados fueron confirmados utilizando células deficientes de TLR2 [73]. También estudios *in vivo* han reportado que ratones ApoE^{-/-} al ser tratados con Pam3CSK4 y alimentados una dieta alta en grasas resulta en un incremento en la formación de la placa aterosclerosa en comparación con los ratones ApoE^{-/-} alimentados con una dieta alta en grasas y en ausencia del ligando específico de TLR2 [74]. Por otro lado, un estudio *in vivo* sugiere el papel potencial de TLR2 en respuesta a ligandos endógenos en la enfermedad aterosclerosa; al reportar que los ratones LDLR^{-/-} TLR2^{-/-}, al ser alimentados con una dieta alta en grasas mantenidos en condiciones libres de patógenos, presentaron una disminución de la aterosclerosis de más del 50% al compararlo con ratones testigos con un fondo genético LDLR^{-/-}, lo cual establece un papel claro de TLR2 en la aterosclerosis y sugiere la posibilidad de que antígenos endógenos activen a TLR2 [44]. En este contexto determinamos el papel de TLR2 en respuesta a LDLmm. Nuestros datos muestran que la LDLmm es capaz de activar a TLR2, debido a que cuando se bloqueó el TLR2, se encontró una respuesta inhibitoria en la secreción de TNF- α . Estos resultados son apoyados por

estudios previos donde se ha demostrado que ligandos endógenos activan a TLR2. Se ha demostrado que la proteína de choque térmico gp96 es un potente activador de macrófagos induciendo la producción de IL-6 y de TNF- α ; sin embargo, los macrófagos preincubados con anticuerpo anti-TLR2 antes del estímulo de gp96 disminuyeron la producción de IL-6 y de TNF- α . Sugiriendo que la producción de estas citocinas pro-inflamatorias es dependiente de TLR2 [75]. Otro estudio, reporta que la Hsp60 es capaz de estimular la producción de TNF- α en monocitos y la presencia de anticuerpo neutralizante para TLR2 inhibe la secreción de TNF- α [76].

Los resultados obtenidos en esta etapa de este estudio demuestran en su conjunto que la LDLmm es una molécula capaz de inducir la secreción de TNF- α en monocitos y macrófagos. Por otro lado, determinamos que la LDLmm es capaz de inducir la secreción de TNF- α en monocitos y macrófagos a través de CD14, TLR4 y TLR2.

Posteriormente decidimos analizar si la LDLmm era capaz de inducir la secreción de las citocinas pro-inflamatorias: IL-1 β e IL-6 y cómo el bloqueo de CD14, TLR4 afecta la secreción de IL-1 β e IL-6, en monocitos y macrófagos. Los resultados obtenidos demuestran que la LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6 tanto en monocitos y macrófagos. Resultados similares demuestran que la LDLox incrementa la secreción de de IL-1 β e IL-6 en monocitos [61].

Al analizar el papel de CD14 en la secreción de IL-1 β e IL-6; encontramos que el bloqueo de CD14 en monocitos y macrófagos afecta la secreción de IL-1 β e IL-6. Lo que sugiere que CD14 es un receptor de la LDLmm necesario para la secreción de citocinas pro-

inflamatorias. Estos resultados son consistentes con los resultados previos donde determinamos que el bloqueo de CD14 afecta la producción de TNF- α en ambos tipos celulares. Estos resultados son apoyados por un estudio que determina que el bloqueo de CD14 con anticuerpo anti-CD14 en monocitos afecta secreción de IL-1 β e IL-6 en respuesta a LDLox [61].

Posteriormente decidimos analizar como el bloqueo de TLR4 afecta la secreción de IL-1 β e IL-6. El bloqueo de TLR4 con anticuerpo neutralizante anti-TLR4 en monocitos y macrófagos afecto la secreción de IL-1 β e IL-6 en respuesta a LDLmm. Lo que sugiere que TLR4 es necesario para la secreción de IL-1 β e IL-6. Estos resultados son consistentes con los resultados previos donde determinamos que el bloqueo de CD14 afecta la producción de TNF- α en ambos tipos celulares. Ambos resultados son apoyados con el hecho de que el bloqueo de TLR4 afecta la producción de TNF- α en células estimuladas con AGE-LDL [69].

El papel de la vía CD14/TLR4 en la respuesta inmune a ligandos endógenos como la LDLmm no está bien entendido. En este trabajo analizamos si la activación de CD14/TLR4 induce la secreción de IL-1 β e IL-6 en monocitos y macrófagos estimulados con la LDLmm. Los resultados obtenidos demuestran que la LDLmm induce la secreción de IL-1 β e IL-6 en ambos tipos celulares y esta respuesta se inhibe la bloquear de manera simultánea a CD14 y TLR4 con anticuerpos neutralizantes. Estos resultados son apoyados por con los resultados previos donde determinamos que el bloqueo de CD14 o TLR4 inhibe la síntesis de TNF- α en monocitos y macrófagos al estímulo de LDLmm.

Por otro lado, de manera similar el bloqueo de TLR2 afectó la secreción de IL-1 β e IL-6 en monocitos y macrófagos al estímulo de LDLmm. Estos resultados son consistentes con los resultados previos donde determinamos que el bloqueo de TLR2 afecta la producción de TNF- α en ambos tipos celulares. Los resultados sugieren que TLR2 participa en la secreción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LDLmm. Esta función de TLR2 es similar en respuesta a la determinada a otros ligandos endógenos; como la proteína de choque térmico gp96 la cual induce la producción de TNF- α dependiente de TLR2 [75].

Los resultados obtenidos en esta etapa indican que la activación de CD14, TLR4 y TLR2 en monocitos y macrófagos por LDLmm induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias como: IL-1 β e IL-6, las cuales contribuyen o exacerban la respuesta inflamatoria durante la aterosclerosis.

La IL-1 β , así como, la IL-6 son capaces de activar a las células endoteliales e inicialmente inducen la expresión de la quimiocina IL-8 la cual recluta neutrófilos, estos eventos suceden en la inflamación aguda; si persiste la actividad de las citocinas pro-inflamatorias, la inflamación aguda se vuelve una inflamación crónica y se favorece reclutamiento de monocitos al sitio del daño, a través de la secreción de la quimiocina MCP-1; además la IL-1 β e IL-6 incrementan la expresión de las moléculas de adhesión, facilitando la adhesión de los leucocitos a el endotelio[77,78].

Por otro lado, estudios in vivo han demostrado el papel de IL-1 β e IL-6 en el desarrollo de la placa aterosclerosa. La administración exógena de IL-6 en el modelo de ratón apo E susceptible a desarrollar aterosclerosis alimentados con una dieta alta en grasas presentaron

un aumento dramático en la formación de la lesión, lo que sugiere un papel clave de la IL-6 en el desarrollo de placa aterosclerosa [79].

El papel de la IL-1 en el desarrollo de la aterosclerosis se estableció en un modelo de ratón el cual carece de apo E e IL-1. En este trabajo los autores describen que los animales con un fondo genético apo E^{-/-}/IL-1^{+/+} al ser alimentados con una dieta alta en grasas desarrollan lesiones aterosclerosas en el aorta. En contraste, los animales deficientes de apoE e IL-1 al ser tratados con la misma dieta que los animales apo E^{-/-}/IL-1^{+/+} presentaron una reducción que fue del 33% en la formación de la placa aterosclerosa y por otro lado estos animales también presentaron un porcentaje menor de lesiones aterosclerosas que los apo E^{-/-}/IL-1^{+/+} [80].

La activación de los TLR también sufre diversos mecanismos de regulación; uno de estos mecanismos es a través de la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 [81].

Por lo tanto, decidimos analizar si la LDLmm era capaz de inducir la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y cómo el bloqueo de CD14, TLR4 y TLR2 afecta su secreción. En este estudio determinamos que la LDLmm es capaz de inducir la síntesis de IL-10 en monocitos y macrófagos. Estos resultados son apoyados por un reporte que indica que macrófagos estimulados con LDLmm sintetizan el RNAm de IL-10 [82].

Por otro lado, determinamos que el bloqueo de CD14 o TLR4 de manera individual o simultánea afectó la secreción de IL-10 en monocitos y macrófagos en respuesta a la LDLmm. De manera similar el bloqueo de TLR2 también inhibió la secreción de la IL-10. La inhibición en la secreción de IL-10 fue más evidente al bloquear TLR2 con anticuerpo

neutralizante anti-TLR2 que el bloqueo de CD14 o TLR4 en monocitos o macrófagos. Estos datos sugieren que la LDLmm induce la producción de IL-10 para mantener un balance pro-inflamatorio y anti-inflamatorio [83,84].

Existe evidencia que macrófagos estimulados con LPS via TLR4 secretan IL-10 [83]. Adicionalmente, se ha demostrado que durante la fase inicial de activación, los macrófagos secretan citocinas pro-inflamatorias [84,85.]. Por consiguiente, la producción de reguladores negativos en la activación de los TLR, aseguran una adecuada regulación del balance pro-inflamatorio y anti-inflamatorio. [81.]

Otra forma de analizar la contribución de la LDLmm en la activación de CD14, TLR4 y TLR2; fue determinar si la LDLmm era capaz de inducir la redistribución de estos receptores en la superficie celular de monocitos. Los resultados obtenidos muestran que los monocitos en ausencia de estímulo presentan una distribución homogénea de CD14, TLR4 y TLR2 en la superficie celular. Lo que indica que CD14 y TLR4 no se encuentran pre-asociados en la membrana celular de los monocitos [86]. En contraste, el estímulo de la LDLmm en los monocitos provocó una redistribución de CD14 y TLR4 en la superficie celular de monocitos, así como la colocalización de CD14 y TLR4; sugiriendo que hay una asociación cercana entre estos dos receptores. Resultados similares han demostrado que en el proceso de activación celular vía CD14 y TLR4, se induce el complejo CD14/TLR4 el cual es crucial para la señalización inducida por LPS [79]. Además, otro estudio demuestra que células activadas a través de la vía CD14/TLR4 ocasiona la redistribución y colocalización de estos receptores [86]. Por otro lado, se determinó que los monocitos en ausencia de estímulo presentan una distribución homogénea de TLR2. En contraste, la

presencia de la LDLmm provocó la redistribución y formación de parches de TLR2 en la superficie celular. Lo que sugiere que la LDLmm también es capaz de inducir la redistribución de TLR2 en la superficie celular y también sugiere la participación de TLR2 en respuesta a la LDLmm. Se ha demostrado que la activación de TLR2 con ácido lipoteicoico induce la redistribución y formación de parches de TLR2 en la superficie celular [53].

Este trabajo también exploró el efecto de la LDLmm en la expresión de TLR2 y TLR4 en la superficie celular de monocitos y macrófagos. Los resultados obtenidos muestran que la LDLmm induce de forma dosis dependiente el incremento en la expresión de TLR2 y TLR4 en monocitos y macrófagos. También, la LDLmm incrementa la expresión de TLR2 predominantemente, más que, la expresión de TLR4 en ambos tipos celulares. Los resultados obtenidos sugieren que la LDLmm es capaz de incrementar la expresión de ambos TLR, induciendo posiblemente una comunicación cruzada entre las vías de activación de TLR2 y TLR4, resultando en la amplificación de la secreción de citocinas pro-inflamatorias [53]. Se ha demostrado que moléculas endógenas son ligandos de TLR [75] y algunas de estas moléculas, como el dominio extracelular A (EDA) de la fibronectina son capaces de inducir un incremento en la expresión de TLR2 y TLR4 en la superficie celular de monocitos [74]. Más aún, se ha determinado que el estímulo de la LDLox en monocitos humanos incrementa de manera dosis dependiente tanto el RNAm de TLR4, así como, la expresión de la proteína [61]. Otro estudio reporta que la LDLox al inducir la transformación de células espumosas, es capaz de incrementar el transcrito de TLR2 y TLR4 en macrófagos [87].

Conclusión

En su conjunto los resultados obtenidos en este trabajo por primera vez demuestran que la LDLmm es un ligando endógeno de TLR2 y TLR4, capaz de incrementar su expresión así como su activación y puede producir una respuesta inmune similar a lo reportado por otras moléculas endógenas al activar ambos TLR, resultando en un incremento en la expresión de TLR2 y TLR4; lo cual puede inducir una comunicación cruzada de las vías de señalización de TLR2 y TLR4 resultando en la amplificación de la secreción de citocinas pro-inflamatoria, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Adicionalmente, la activación de TLR2 y TLR4 por la LDLmm induce la producción de IL-10, tal vez como un mecanismo de regulación de la activación celular.

Perspectivas

Analizar si el estímulo de LDLmm en monocitos es capaz de inducir un fenotipo inflamatorio de los monocitos y determinar si este fenotipo de los monocitos induce una respuesta tipo TH1.

Bibliografía

1. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. 2002. Trends in mortality from and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the World. *Heart* 88:119-124.
2. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. 2007. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 28:2525-2538.
3. Overbaugh KJ. 2009. Acute coronary syndrome. *Am J Nurs* 109:42-52.
4. <http://inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2006/muertos06.pdf>
5. Ruesga Zamora EA. 2005. *Cardiología*. 1a Ed. El Manual Moderno. México. 535-540.
6. Nicoletti A, Caligiuri G, Hansson K. 2000. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med* 247:397-495.
7. Ross R. 1999. Mechanisms of disease. *New Engl J Med* 340:115-126.
8. Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874.
9. Segrest PJ, Jones MK, Hans De Loof, Dashti N. 2001. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* 42:1346-1367.
10. Jeon H, Blacklow SC. 2005. Structure and physiologic function of the low density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74:535-562.
11. Clark RA. 2008. Oxidative stress and "senescent" fibroblasts in non-healing wounds as potential therapeutic targets. *J Invest Dermatol* 128:2361-2364
12. Steinberg D. 1997. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95:1062-1071.
13. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84:1086-1095.
14. Glass CK, Witztum JL. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-516.
15. Carpenter KL, Challis IR, Arends MJ. 2003. Mildly oxidised LDL induces more macrophage death than moderately oxidised LDL: roles of peroxidation, lipoprotein-associated phospholipase A2 and PPARgamma. *FEBS Lett* 553:145-50.
16. Miller IY, Viriyakosol S, Binder JC, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL. 2003. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cell. *J Biol Chem* 278:1561-1568.
17. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:333-337.
18. Morgan J, Leake D. 1995. Oxidation of low density lipoprotein by iron or copper at acidic pH. *J Lipid Res* 36:2504-2512.
19. Damasceno NR, Sevanian A, Apolinario E, Oliveira JM, Fernandes I, Abdalla DS. 2006. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL(-)) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin Biochem* 39:28-38.
20. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified

- low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84:1086-1095.
21. Haberland ME, Fong D, Cheng L. 1988. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic. *Science* 241:215-218.
 22. Mehrabian M, Allayee H. 2003. 5-lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Op Lipid* 14:447-457.
 23. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ. 1993. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 171:223-229.
 24. Mazzone T. 2000. Scavenger receptors in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2506-2508.
 25. Buono C, Pang H, Uchida Y, Libby P, Sharpe AH, Lichtman AH. 2004. B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 109:2009-1205.
 26. Phipps RP. 2000. Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6930-6932.
 27. Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. 1985. Identification of amembrane-associated interleukin-1 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1024-1208.
 28. Kiri H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. 2003. Lack of Interleukin-1 beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:656-660.
 29. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
 30. 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. 2004. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 110:3493-3500.
 31. McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. 2009. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol* 6:410-417.
 32. Bradley JR. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214:149-160.
 33. Fernández PR y Kaski JC. 2002. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 55:738-750.
 34. Malla Z, Heymes C, Ohan J. 1999. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:611-616.
 35. Smith D, Irving S, Sheldon J. 2001. Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina. *Circulation* 104:746-749.
 36. Lucas A, Greaves RD. 2001. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med* 5:1-18.
 37. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. 1991. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88:1121-1127.
 38. Mahmoudi M, Curzen N, Gallagher PJ. 2007. Atherogenesis: the role of inflammation and infection. *Histopathology* 50:535-545.
 39. Schöbeck U, Libby P. 2001. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 89:1092-103.

40. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-548.
41. Dopheide JF, Sester U, Schlitt A, Horstick G, Rupprecht HJ, Münzel T, Blankenberg S. 2007. Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 *in vitro*. *Coron Artery Dis* 18:523-531.
42. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-45.
43. Trinchieri G, Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
44. Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. 2005. Modulation of atherosclerosis in mice by toll-like receptor 2. *J Clin Invest* 115:3149-3156.
45. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Ardit M. 2004. 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 USA* 101:10685-10690.
46. Anderson KV, Jurgens G, Nsslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsalventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role the *Toll* gene product. *Cell* 42:779-789.
47. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
48. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
49. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
50. Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-45.
51. Gay NJ, Gangloff M, Weber AN. 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 6:693-698.
52. Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 25:683-692.
53. Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafilou K. 2006. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 281:31002-31011.
54. Xu XH, Shad PK, Faure E, Equilis O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Ardit M. 2001. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 104:3103-3108.
55. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. 2002. Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions. A possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105:1158-1161.
56. Kenuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. 2006. CD14-deficient mice are protected

- against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 106:2608-2615.
57. Liu X, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Gibson FC 3rd, Genco CA. 2008. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis* 196:146-154.
 58. Kiechl S, Lorenz E, Reindel M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. 2002. Toll-like receptors 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347:185-192.
 59. Hubacek JA, Rothe G, Pit'ha J, Skodová Z, Stanek V, Poledne R, Schmitz G. 1999. C (-260)→T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 99:3218-3220.
 60. Giacconi R, Caruso C, Lio D, Muti E, Cipriano C, Costarelli L, Saba V, Gasparini N, Malavolta M, Mocchegiani E. 2007. CD14 C (-260)T polymorphism, atherosclerosis, elderly: role of cytokines and metallothioneins. *Int J Cardiol* 120:45-51.
 61. Pasini AF, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, Boccioletti V, Vassanelli C, Cominacini L. 2007. 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* 27:1991-1997.
 62. Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. 2005. Expansion of circulation toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 111:2654-2661.
 63. Osterud B, Bjorklid E. 2003. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 83:1069-1112.
 64. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 113:2324-2335.
 65. Shuto T, Kato K, Mori Y, Viriyakosol S, Oba M, Furuta T, Okiyonedo T, Arima H, Suico MA, Kai H. 2005. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1402-1490.
 66. Jiang Q, Akashi S, Miyake K. 2000. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 165:3541-3544.
 67. Muhvić D, El-Samalouti V, Flad HD, Radosević-Stasić B, Rukavina D. 2001. The involvement of CD14 in the activation of human monocytes by peptidoglycan monomers. *Mediators Inflamm* 10:155-162.
 68. Akira S. 2003. Toll like receptor signaling. *J Biol Chem* 278:38105-38108.
 69. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K, Ye S. 2008. Advanced glycation end product of low density lipoprotein activates the toll like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 28:2275-81.
 70. Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodzas S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR. 2006. Identification of small

- heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 176:7021-27.
71. Trinchieri G, Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
 72. Cao F, Castrillo A, Tontono P, Re F, Byrne GI. 2007 Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 75:753-739.
 73. Netea MG, Kullberg BJ, Jacobs LE, Verver-Jansen TJ, van der Ven-Jongekrijg J, Galama JM, Stalenhoef AF, Dinarello CA, Van der Meer JW. 2004. Chlamydia pneumoniae stimulates IFN-gamma synthesis through MyD88-dependent, TLR2- and TLR4-independent induction of IL-18 release. *J Immunol* 173:1477-1482.
 74. Schoneveld AH, Hoefler I, Sluijter JP, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. 2008. Atherosclerotic lesion development and toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis* 197:95-104.
 75. Huang QQ, Sobkoviak R, Jockheck-Clark AR, Shi B, Mandelin AM 2nd, Tak PP, Haines GK 3rd, Nicchitta CV, Pope RM. 2009. Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J Immunol* 182:4965-4973.
 76. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Makino H. 2004. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:1457-67.
 77. Sims JE, Smith DE. 2010. The IL-1 family regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 10:89-102.
 78. Gabay C. Interleukin 6 and chronic inflammation. 2006. *Arthritis Res Ther* 8 (suppl 2).
 79. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. 1999. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2364 – 2367.
 80. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. 2003. Lack of interleukin-1 beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:656-660.
 81. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5:446-458.
 82. Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI. 2009. 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* 104:210-218.
 83. Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, Flavell RA. 2006. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2274-2279.
 84. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55-72.
 85. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.

86. Flo TH, Ryan L, Latz E, Takeuchi O, Monks BG, Lien E, Halaas Ø, Akira S, Skjåk-Braek G, Golenbock DT, Espevik T. 2002. Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J Biol Chem* 277:35489-35495.
87. Holvoet P, Davey PC, De Keyzer D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhablès N, Marguerie G. 2006. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: Studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cell. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 26:1558-1565.

RESEARCH

Open Access

The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages

Luis Chávez-Sánchez¹, Karina Chávez-Rueda¹, Maria Victoria Legorreta-Haquet¹, Edgar Zenteno³, Yadira Ledesma-Soto¹, Eduardo Montoya-Díaz¹, Emiliano Tesoro-Cruz¹, Alejandra Madrid-Miller², Francisco Blanco-Favela^{1*}

Abstract

Atherosclerosis is considered a chronic inflammatory disease in which monocytes and macrophages are critical. These cells express CD14, toll-like receptor (TLR) 2, and TLR4 on their surfaces, are activated by minimally modified low-density lipoprotein (mmLDL) and are capable of secreting pro-inflammatory cytokines. The aim of this research was thus to demonstrate that the activation of CD14, TLR2, and TLR4 by mmLDL induces the secretion of cytokines.

Methods: Human monocytes and macrophages were incubated with monoclonal antibodies specific for CD14, TLR4, and TLR2 prior to stimulation with mmLDL. Cytokine secretion was then compared to that observed upon mmLDL stimulation in untreated cells.

Results: Stimulation with mmLDL induced the secretion of pro-inflammatory cytokines. Blocking CD14 in monocytes inhibited secretion of interleukin (IL)-1 β (72%), IL-6 (58%) and IL-10 (63%), and blocking TLR4 inhibited secretion of IL-1 β by 67%, IL-6 by 63% and IL-10 by 60%. Blocking both receptors inhibited secretion of IL-1 β by 73%, IL-6 by 69% and IL-10 by 63%. Furthermore, blocking TLR2 inhibited secretion of IL-1 β by 65%, IL-6 by 62% and IL-10 by 75%. In macrophages, we found similar results: blocking CD14 inhibited secretion of IL-1 β by 59%, IL-6 by 52% and IL-10 by 65%; blocking TLR4 inhibited secretion of IL-1 β by 53%, IL-6 by 63% and IL-10 by 61%; and blocking both receptors inhibited secretion of IL-1 β by 69%, IL-6 by 67% and IL-10 by 65%. Blocking TLR2 in macrophages inhibited secretion of IL-1 β by 57%, IL-6 by 40% and IL-10 by 72%.

Conclusion: Our study demonstrates that CD14, TLR4, and TLR2 participate in the immune response against mmLDL by inducing the production of pro-inflammatory cytokines in both monocytes and macrophages. These findings suggest that the activation of these receptors by mmLDL contributes to the inflammatory process of atherosclerosis.

Introduction

Several studies have shown that pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6, play an important role in the development of atherosclerosis [1]. Monocytes and macrophages are innate immune cells that are central to the inflammatory response in the atherosclerotic plaque. These cells are the main producers of pro-inflammatory

cytokines [2,3] during the response to exogenous antigens that are involved in atherosclerosis, such as *Chlamydia pneumoniae* [4], or to endogenous antigens such as oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), which has been shown to play a role in the development of atherosclerotic plaques [5,6]. Furthermore, oxLDL is considered a pro-atherogenic molecule [7] that is capable of inducing the secretion of TNF- α [8].

Monocytes and macrophages express CD14 and toll-like receptors (TLRs) on the cell surface [9]. CD14 and TLRs are pattern recognition receptors capable of activating multiple genes that encode pro-inflammatory

* Correspondence: fblanco1@terra.com.mx

¹Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D. F., México
Full list of author information is available at the end of the article

cytokines such as IL-1 β and IL-6, adhesion molecules such as cellular-1 vascular adhesion molecule and intracellular-1 adhesion molecule, and co-stimulatory molecules such as CD80 in response to pathogens or molecular patterns associated with pathogens [10]. Some studies have demonstrated the participation of the TLRs in the development of the atherosclerotic plaque [11,12], and previous evidence suggests a potential role for oxidized modified LDL as an endogenous antigen capable of triggering and maintaining the inflammatory process in the atherosclerotic plaque [5-7]. Previous studies have also demonstrated that minimally modified low-density lipoprotein (mmLDL) induces TLR4-dependent secretion of MIP-2 and TLR4-independent, MyD88-independent secretion of TNF- α in macrophages [13]. In contrast, we and other authors have reported that the synthesis of TNF- α is dependent on TLR4 [14,15]. Furthermore, we demonstrated that TLR2 also participates in the synthesis of TNF- α in response to mmLDL [14].

The regulation of the activation of TLRs includes several mechanisms such as the production of anti-inflammatory cytokines, mainly IL-10 [16]. Or well by the TLRs homologs such as RP105 protein, that interacts directly with the TLR4 signaling complex, resulting in the negative regulation of TLR4 [17]. The production of these negative regulators, assures proper regulation of the pro- and anti-inflammatory balance [16].

In this study, we aimed to analyze the participation of CD14, TLR4, and TLR2 in the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 and the anti-inflammatory cytokine IL-10 in response to mmLDL. We found that blocking these receptors inhibited the production of IL-1 β , IL-6, and IL-10. These results provide new perspectives on the role of oxidized modified LDL in the inflammation associated with atherosclerosis.

Materials and methods

Informed consent was obtained from seven healthy, normolipidemic 20- to 30-year-old male volunteers without cardiovascular risk factors or clinically apparent atherosclerotic disease. The study was approved by the Human Ethics and Medical Research Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social and conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

LDL isolation and modification

Native human LDL (nLDL) (density = 1.019-1.063 g/ml) was isolated from plasma by ultracentrifugation. The density of the plasma was adjusted to 1.2 g/ml by adding solid potassium bromide (KBr) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Density gradients were formed in 6-ml polycarbonate centrifuge tubes by overlaying 2 ml plasma solution with 3 ml 0.5 mM NaCl (endotoxin-

free), pH = 7.4, d = 1.006 g/ml. The tubes were ultracentrifuged in a Sorvall Discovery M150 SE ultracentrifuge equipped with an S80AT3 fixed angle rotor at 41,500 \times g for 4 hours at 4°C. After ultracentrifugation, very low-density lipoprotein was removed, 3.0 ml of the lower layer was transferred to another tube, 2 ml KBr-NaCl (d = 1.18 g/ml) was added and the samples were gently mixed. The tubes were ultracentrifuged at 41,500 \times g for 4 hours at 4°C, and the LDL fraction was removed. The LDL fraction was dialyzed against 0.5 mM NaCl, pH = 7.4, for 24 hours at 4°C to remove EDTA. LDL was oxidized using CuSO₄ (J.T. Baker). To produce mmLDL, 300 μ g/ml LDL was incubated with 10 μ mol/L CuSO₄ (J.T. Baker) for 1 hour at 37°C. The mmLDL was then extensively dialyzed against 0.5 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, pH = 7.4, for 24 hours at 4°C. Oxidative modification of LDL was assessed by measuring thiobarbituric acid-reactive substances as previously described [18]. This assay showed that samples contained between 0.8 and 2.8 nmol malondialdehyde per milligram of protein. The optimal concentrations of mmLDL for activation of human monocytes and macrophages were 50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively (data not shown). All nLDL and mmLDL preparations used in these experiments were tested for bacterial lipopolysaccharide (LPS) contamination using a Limulus Amoebocyte Lysate kit (BioWhittaker, Walkersville, MD) according to the manufacturer's instructions.

Monocyte isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from buffy coats by density centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway). The buffy coats were mixed with an equal volume of phosphate buffered saline (PBS), pH = 7.4, layered over 3 ml of Lymphoprep and centrifuged at 700 \times g for 30 minutes. The recovered PBMCs were washed three times with PBS, pH = 7.4. The monocytes were then isolated from PBMCs by negative selection. The PBMCs were incubated with a cocktail of biotin-conjugated antibodies against CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 and glycoporphin A and magnetic microbeads coupled to an anti-hapten monoclonal antibody and depleted using a magnetic column (Monocyte Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purified cells were stained for CD14, and the purity of monocytes was determined by flow cytometry to be >98%.

Differentiation of U937 cells to macrophages

To produce macrophages, U937 cells (ATCC) were adjusted to 2 \times 10⁶/ml in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% fetal calf serum and phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a final concentration of 2.5 ng/ml and

incubated for 24 hours at 37°C. The adherent cells were washed three times with PBS, pH = 7.4, to remove PMA and incubated in culture medium containing 10% fetal calf serum without PMA for an additional 24 hours at 37°C before being used in experiments. The maturation of U937 cells was evaluated by measuring their CD14 expression by flow cytometry.

Ability of anti-CD14, -TLR4, and -TLR2 antibodies to inhibit monocytes and macrophages activation

Monocytes and macrophages were cultured using RPMI 1640 medium in 96-well plates at a concentration of 2×10^5 /well. For blocking experiments, the monocytes and macrophages were preincubated for 1 hour at 37°C with 10 µg/ml anti-CD14 (clone MEM18, BD Biosciences, San Jose, CA), anti-TLR4 (clone HTA125, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or a combination of both antibodies for 1 hour at 37°C. After washing both cells three times with PBS, pH = 7.4, monocytes and macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (positive control) for 24 hours at 37°C. Alternatively, monocytes and macrophages were treated with 10 µg/ml anti-TLR2 (clone TL2.1, eBioscience, San Diego, CA) for 1 hour at 37°C and stimulated with 20 ng/ml PamCys (synthetic lipopeptide Pam3Cys-Ser-Lys4) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) (positive control). As an additional control, both cells were treated with 10 µg/ml irrelevant antibodies before stimulation with TLRs ligands. The culture supernatants were collected after 24 hours of incubation at 37°C. Secreted IL-1β, IL-6, and IL-10 levels were determined by Cytometric Bead Array (CBA) kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions (Additional files 1 and 2).

Blocking CD14, TLR4 and TLR2

Human monocytes (2×10^5 /ml) and U937 cells (2×10^5 /ml) were treated with 10 µg/ml human anti-CD14 antibody (clone MEM18, BD Biosciences), human anti-TLR4 antibody (clone HTA125, Santa Cruz Biotechnology), or a combination of both antibodies for 1 hour at 37°C. After washing the cells three times with PBS, pH = 7.4, monocytes were stimulated with 50 µg/ml mmLDL, and macrophages were stimulated with 70 µg/ml mmLDL for 24 hours at 37°C. Alternatively, human monocytes (2×10^5 /ml) and U937 cells (2×10^5 /ml) were incubated with 10 µg/ml anti-TLR2 (clone TL2.1, eBioscience) for 1 hour at 37°C, washed three times with PBS, pH = 7.4, and stimulated with 50 µg/ml mmLDL (monocytes) or 70 µg/ml mmLDL (macrophages) for 24 hours at 37°C. As a positive control for TLR4 and TLR2 activation, monocytes and macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) and 20 ng/ml PamCys (Alexis Biochemicals). As an

antibody control, cells were treated with irrelevant IgG isotype control antibodies before stimulation with TLRs ligands or mmLDL. As a negative control, monocytes and U937 cells were incubated only in culture medium or with control antibodies in the absence of TLRs agonist or mmLDL stimulation. All supernatants were frozen at -70°C prior to determination of cytokines secretion.

Cytokine analysis

Cytokines were measured in culture supernatants of monocytes or macrophages treated with 50 µg/ml or 70 µg/ml mmLDL, respectively, or in cells treated with only culture medium or with control antibodies (10 µg/ml) using a CBA kit (BD Biosciences) and flow cytometry analysis, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cytokine standards were diluted (5 to 5000 pg/ml). The standard dilutions and test samples were added to the appropriate sample tubes (50 µl) and mixed with 50 µl each of antibody-PE detector and antibody-bead reagent (50 µl). The mixture (150 µl) was incubated for 3 hours in the dark at room temperature and washed. The test samples were acquired using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences).

Statistical analysis

The Mann-Whitney test was used to evaluate the statistical significance of differences between experimental groups. Samples with $P < 0.05$ were considered significantly different. The data shown in all figures are expressed as the mean \pm SEM of values from independent experiments.

Results

Ability of anti-CD14, -TLR4, and -TLR2 antibodies to inhibit monocytes and macrophages activation in responses to LPS and Pamcys

As a positive control, we stimulated TLR4 with LPS and TLR2 with PamCys in monocytes and macrophages. We found that pre-treatment with anti-CD14, anti-TLR4, or a combination of both antibodies inhibited secretion of IL-1β (Additional file 1: Figure S1A and S1C), IL-6 (Additional file 1: Figure S1B and S1D) and IL-10 (Additional file 2: Figure S2A and S2B) in monocytes and macrophages, respectively, stimulated with LPS. Similarly, blocking TLR2 prior to PamCys stimulation inhibited secretion of IL-1β (Additional file 1: Figure S1A and S1C), IL-6 (Additional file 1: Figure S1B and S1D) and IL-10 (Additional file 2: Figure S2A and S2B) in monocytes and macrophages, respectively.

Inhibition of IL-1β production in monocytes and macrophages by blocking CD14 and TLR4

Stimulation with mmLDL also induced considerable production of IL-1β compared with the negative control

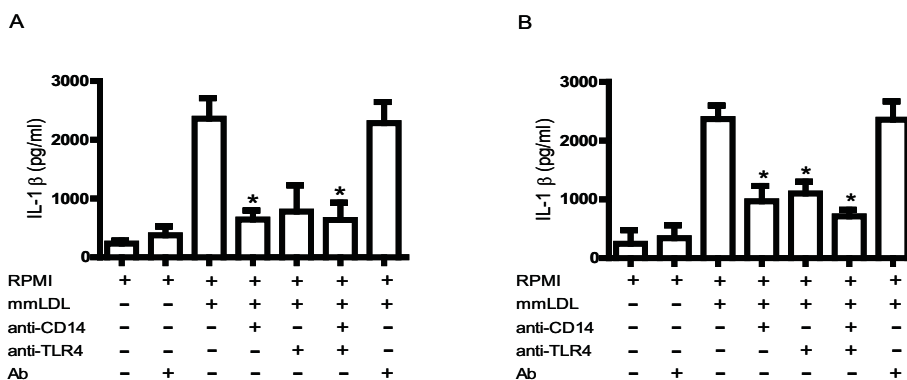


Figure 1 Role of CD14 and TLR4 in secretion of IL-1 β in response to mmLDL. Human monocytes (1A) and macrophages (1B) were treated with anti-CD14, anti-TLR4, or both antibodies (10 μ g/ml) for 1 hour before incubation with mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). Monocytes and macrophages were incubated with irrelevant antibody (10 μ g/ml) in the presence or absence of mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). The concentration of IL-1 β in culture supernatants was determined by CBA. * $p < 0.005$.

(cells treated only with culture medium). Blocking CD14 in monocytes (Figure 1A) and macrophages (Figure 1B) prior to mmLDL stimulus inhibited IL-1 β production by 72% and 59%, respectively. Meanwhile, blocking TLR4 in monocytes and macrophages inhibited IL-1 β production by 67% and 53%, respectively. When we blocked both receptors in monocytes and macrophages, we found a 73% and 69% reduction, respectively, in IL-1 β secretion.

Blocking CD14 and TLR4 inhibits IL-6 secretion in monocytes and macrophages

Stimulation of monocytes and macrophages with mmLDL caused an increase in the secretion of IL-6 at levels higher than those observed in cells cultured only with culture medium. Blocking CD14 in monocytes (Figure 2A) and macrophages (Figure 2B) caused a 58% and 52% reduction in IL-6 secretion, respectively. When

both cell types were treated with anti-TLR4 prior to stimulation with mmLDL, IL-6 secretion was inhibited by 63% and 63%, respectively. Blocking both receptors inhibited IL-6 secretion by 69% and 67%, respectively, after a 24-hour culture period.

Blocking TLR2 inhibits IL-1 β and IL-6 secretion in monocytes and macrophages

Stimulation with mmLDL induced increases in IL-1 β and IL-6 secretion in monocytes and macrophages when compared to cells cultured only with culture medium. Preincubation with anti-TLR2 induced a 65% and 57% reduction in IL-1 β secretion in monocytes (Figure 3A) and macrophages (Figure 3C), respectively. Similarly, the secretion of IL-6 in response to mmLDL was reduced by 62% and 40% in monocytes (Figure 3B) and macrophages (Figure 3D), respectively.

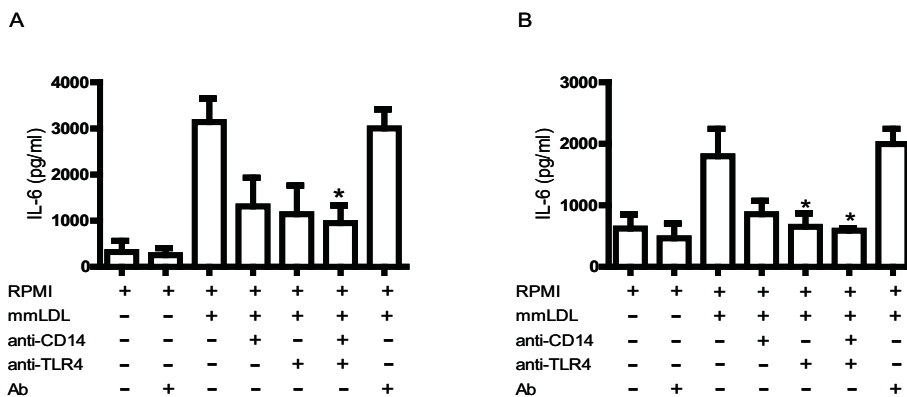


Figure 2 Role of CD14 and TLR4 in secretion of IL-6 in response to mmLDL. Human monocytes (2A) and macrophages (2B) were treated with anti-CD14, anti-TLR4, or both antibodies (10 μ g/ml) for 1 hour before incubation with mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). Monocytes and macrophages were incubated with irrelevant antibody (10 μ g/ml) in the presence or absence of mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). The concentration of IL-6 in culture supernatants was determined by CBA. * $p < 0.005$.

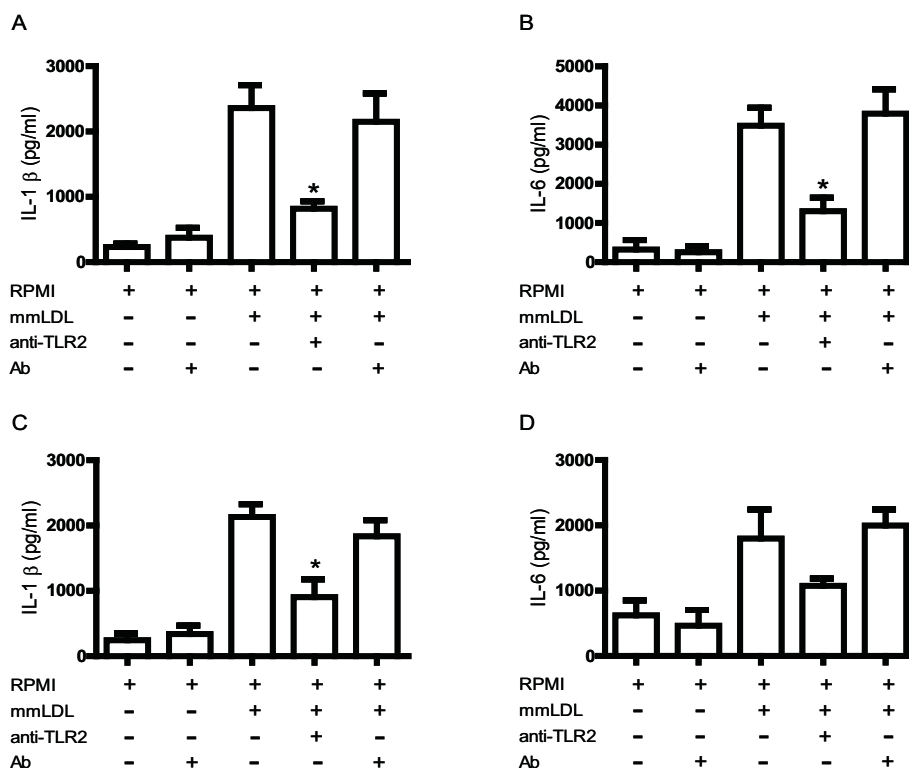


Figure 3 Role of TLR2 in secretion of IL-1 β and IL-6 in response to mmLDL. Human monocytes and macrophages were treated with anti-TLR2 (10 μ g/ml) for 1 hour before stimulation with mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). Monocytes and macrophages were incubated with irrelevant antibody (10 μ g/ml) in the presence or absence of mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). The concentrations of IL-1 β and IL-6 in culture supernatants of monocytes (3A and 3B) and macrophages (3C and 3D) were determined by CBA, respectively. * $p < 0.005$.

The roles of CD14, TLR4, and TLR2 in the production of IL-10 in response to mmLDL

Stimulation of monocytes and macrophages with mmLDL induced secretion of IL-10 at levels higher than those observed in cells cultured only with culture medium. Blocking CD14 in monocytes (Figure 4A) and macrophages (Figure 4C) inhibited IL-10 secretion by 63% and 65%, respectively, blocking TLR4 inhibited IL-10 secretion by 60% and 61%, respectively, and blocking both receptors inhibited IL-10 secretion by 63% and 65%, respectively. Similarly, preincubation of monocytes (Figure 4B) and macrophages (Figure 4D) with anti-TLR2 antibody inhibited mmLDL-mediated IL-10 secretion by 75% and 72%, respectively.

Discussion

Atherosclerosis is currently considered a chronic inflammatory disease in which monocytes and macrophages are critical [1-3]. The possible etiologies of this disease include infections with *Chlamydia pneumoniae* or responses to endogenous antigens such as LDL [5]. Several studies have shown that the oxidized modifications of LDL influence the development of atherosclerotic

lesions through the inflammatory response [5-7]. We previously demonstrated that mmLDL can activate CD14, TLR4, and TLR2, inducing TNF- α [14]. Here we clearly demonstrate that mmLDL elicits the production of IL-1 β , IL-6, and IL-10 through CD14, TLR4, and TLR2 in human monocytes and macrophages.

CD14 has been proposed as the first host pattern recognition receptor involved in the recognition of most bacterial components [19,20] and facilitates the expression of inflammatory molecules via activation of the TLRs [21]. Our results show that monocytes and macrophages are activated by a very early form of oxidized LDL via CD14, which is a necessary co-receptor for mmLDL-mediated secretion of IL-1 β and IL-6. These findings are consistent with our previous study, in which we showed that blocking CD14 in monocytes and macrophages stimulated with mmLDL resulted in significant inhibition of TNF- α production [14]. These results are supported by the finding that blocking CD14 in monocytes stimulated with extensively oxidized LDL resulted in significant inhibition of IL-6 and IL-1 β production [22], suggesting that activation through the CD14 pathway plays a role in inflammation in response to mmLDL.

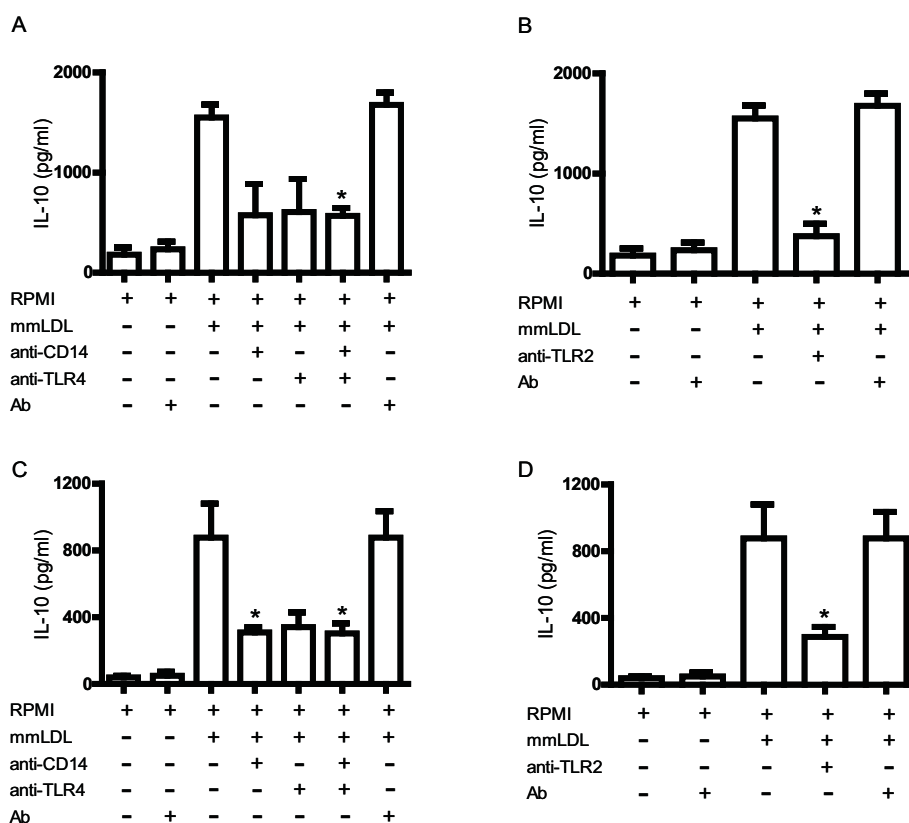


Figure 4 Role of CD14, TLR4, and TLR2 in secretion of IL-10 in response to mmLDL. Human monocytes (4A) and macrophages (4C) were treated with anti-CD14, anti-TLR4, or both antibodies (10 μ g/ml) for 1 hour before incubation with mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). Monocytes (4B) and macrophages (4D) were treated with anti-TLR2 (10 μ g/ml) for 1 hour before stimulation with mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). Monocytes and macrophages were incubated with irrelevant antibody (10 μ g/ml) in the presence or absence of mmLDL (50 μ g/ml and 70 μ g/ml, respectively). The concentration of IL-10 in culture supernatants was determined by CBA. * $p < 0.005$.

TLRs are an essential part of the innate immune system [9,10]. Several reports indicate that TLRs can recognize endogenous ligands such as heat shock protein (HSP) 60 and hyaluronic acid, thereby inducing the expression of TNF- α , IL-6, and other pro-inflammatory cytokines [10,23,24]. Our results show that mmLDL induced IL-1 β and IL-6 production through TLR4. This finding is supported by previous studies in which we demonstrated that mmLDL induced TNF- α through TLR4 [14]. Both of these results are supported by the fact that blocking TLR4 inhibits TNF- α production in cells stimulated with advanced glycation end-product of low-density-lipoprotein [15].

The role of the CD14/TLR4 pathway in the immune response to endogenous antigens such as mmLDL is not well understood. Here we examined whether the activation of CD14/TLR4 induced the secretion of IL-1 β and IL-6 in cells stimulated with mmLDL. Our results showed that mmLDL elicited the production of IL-1 β and IL-6 and that this response was inhibited when CD14 and TLR4 were blocked. These findings are

similar to previous reports that extensively oxidized LDL induces the secretion of IL-6 and IL-1 β in monocytes [22] and that blocking CD14 and TLR4 before stimulation with mmLDL affects the secretion of TNF- α [14], suggesting that the activation of the CD14/TLR4 pathway by mmLDL triggers an immune-mediated response driving synthesis of pro-inflammatory cytokines.

We have demonstrated that TLR2 induces TNF- α in response to mmLDL [14]. Here we show that the secretion of IL-6 and IL-1 β by monocytes and macrophages is TLR2-dependent, suggesting that TLR2 participates in the secretion of pro-inflammatory cytokines in response to mmLDL. This function is similar to the TLR2 response to other endogenous antigens, such as HSP60, which also induced the secretion of TNF- α [25].

Our results indicate that the activation of CD14, TLR4, and TLR2 on monocytes and macrophages by a very early form of oxidized LDL induces the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6, which may contribute to or exacerbate inflammatory

responses during atherosclerosis. Both of these cytokines activate endothelial cells, inducing the expression of chemokines such as monocyte chemoattractant protein-1, which recruits monocytes to the lesion area, and the upregulation of adhesion molecules, which facilitate adhesion of leukocytes to endothelial cells [26,27]. Moreover, the exogenous administration of IL-6 exacerbates the atherosclerotic lesion [28], and deficiency in IL-1 β reduces atherosclerotic lesion size [29].

Previous evidence demonstrates that stimulation with extensively oxidized LDL induces the secretion of IL-10 [30], and early forms of oxidized LDL induce an increase in IL-10 mRNA expression in macrophages [31]. Moreover, monocytes and macrophages secrete IL-10 upon activation through TLR2 or TLR4 [32]. In the present study, we found that mmLDL induced CD14-, TLR4-, and TLR2-dependent production of IL-10. Furthermore, we demonstrated that blocking TLR2 affected IL-10 secretion by monocytes and macrophages more than blocking CD14, TLR4, or both CD14 and TLR4, suggesting that mmLDL-mediated production of IL-10 may regulate cellular activation. During the initial activation phase, macrophages secrete pro-inflammatory cytokines [33], and the second phase of macrophage activation involves the delayed and gradual production of IL-10 [34].

Conclusions

Our results establish a potential pathogenic mechanism by which activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL initiates or exacerbate the pro-inflammatory state in atherosclerotic disease.

List of Abbreviations

TLR: toll-like receptor; mmLDL: minimally modified low-density lipoprotein; IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor; oxLDL: oxidized low-density lipoprotein; nLDL: native LDL; LPS: lipopolysaccharide; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; PMA: phorbol myristate acetate; PamCys: synthetic lipopeptide Pam3Cys-Ser-Lys4; CBA: cytometric bead array.

Additional material

Additional file 1: Inhibition of IL-1 β and IL-6 production in monocytes and macrophages by blocking CD14, TLR4, and TLR2.

Additional file 2: Inhibition of IL-10 production in monocytes and macrophages by blocking CD14, TLR4, and TLR2.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant no. 44171 and the Instituto Mexicano del Seguro Social projects of the Found Health Research no. 2007-785-034 (FIS/IMSS/PROT/C2007/006 and FIS/IMSS/PROT/MD09/734). Luis Chávez-Sánchez, a student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), was supported by a doctoral fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (reg. no. 105569).

Author details

¹Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D. F., México. ²Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D. F., México. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F., México.

Authors' contributions

CS and BF conceived the idea and designed the experiments. CS performed the experiments. CR, LH, and ZE participated in the experiments related to flow cytometer. LS and MD participated in the obtained of LDL. TC and MM contributed in the performed the statistical analysis. CS, BF, and ZE and drafted the manuscript and interpretation of the data. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no conflicts of interest.

Received: 25 August 2010 Accepted: 14 October 2010

Published: 14 October 2010

References

1. Hanson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C: **Inflammation and atherosclerosis.** *Annu Rev Pathol* 2006, **1**:297-329.
2. Woollard KJ, Geissmann F: **Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions.** *Nat Rev Cardiol* 2010, **7**:77-86.
3. Tabas I: **Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:36-46.
4. Netea MG, Kullberg BJ, Jacobs LE, Verver-Janseb TJ, van der Ven-Jongekrijg J, Galama JM, Stalenhoef AF, Dinarello CA, Van der Meer JW: ***Chlamydia pneumoniae* stimulates IFN-gamma synthesis through Myd88-dependent, TLR2 and TLR4 independent induction of IL-18 release.** *J Immunol* 2004, **15**:1477-1482.
5. Ross R: **The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.** *Nature* 1993, **362**:801-809.
6. Libby P: **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature* 2002, **420**:868-874.
7. Virella G, Atchley D, Koskinen S, Zheng D, Lopes-Virella MF: **Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL.** *Clin Immunol* 2002, **105**:81-92.
8. Jovinge S, Ares Mp, Kallin B, Nilsson J: **Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to oxLDL.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996, **16**:1573-1579.
9. Uematsu S, Akira S: **Toll-like receptors and innate immunity.** *J Mol Med* 2006, **9**:712-725.
10. Takeda , Akira S: **Toll-like receptors in innate immunity.** *Int Immunol* 2005, **17**:1-14.
11. Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK: **Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2.** *J Clin Invest* 2005, **115**:3149-3156.
12. 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 mice deficient in apolipoprotein E.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:10685-10690.
13. Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL: **Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:1213-1219.
14. Chávez-Sánchez L, Madrid-Miller A, Chávez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Tesoro-Cruz E, Blanco-Favela F: **The activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified LDL in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response.** *Human Immunol* 2010, **8**:737-744.
15. 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 Thromb Vasc Biol* 2008, **28**:2275-2281.
16. 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.
17. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y: **Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling.** *J Immunol* 2000, **165**:6682-6686.

18. Pentikainen MO, Lindsted KA, Kovanen PT: **Inhibition of the oxidative modification of LDL by nitecapone.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, **15**:740-747.
19. Dziarski R, Ulmer AJ, Gupta D: **Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria.** *Chem Immunol* 2000, **74**:83-107.
20. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glaese MP, Tobias PS, Ulevitch RJ: **CD14 is a pattern recognition receptor.** *Immunity* 1994, **1**:509-516.
21. Segura M, Vadeboncoeur N, Gottschalk M: **CD14-dependent and-independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2.** *Clin Exp Immunol* 2002, **127**:243-254.
22. Pasini AF, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, Boccioletti V, Vassanelli C, Cominacini L: **Enhance 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.
23. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA: **Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells.** *J Immunol* 2000, **164**:13-17.
24. Beg AA: **Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses.** *Trends Immunol* 2002, **23**:509-512.
25. 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 CD14+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:1457-1467.
26. Sims JE, Smith DE: **The IL-1 family regulators of immunity.** *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:89-102.
27. Gabay C: **Interleukin 6 and chronic inflammation.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**(suppl 2):S3.
28. Huber SA, Sakkien P, Conze D, Hardin N, Tracy R: **Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, **19**:2364-2367.
29. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M: **Lack of interleukin-1 beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23**:656-660.
30. Fei GZ, Huang YH, Swedendorg J, Frostegeård J: **Oxidised LDL modulates immune-activation by an IL-12 dependent mechanism.** *Atherosclerosis* 2003, **169**:77-85.
31. 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.
32. Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, Flavell RA: **Dynamic regulation of pro- and anti inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **104**:2274-2279.
33. Dong C, Davis RJ, Flavell RA: **MAP kinases in the immune response.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:55-72.
34. 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.

doi:10.1186/1476-511X-9-117

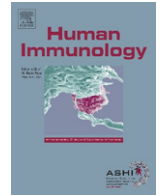
Cite this article as: Chávez-Sánchez *et al.*: The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. *Lipids in Health and Disease* 2010 **9**:117.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified low-density lipoprotein in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response

L. Chávez-Sánchez^{a,b}, A. Madrid-Miller^b, K. Chávez-Rueda^a, M. V. Legorreta-Haquet^a, E. Tesoro-Cruz^a, F. Blanco-Favela^{a,*}

^a Unidad de investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México, México

^b Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2009

Accepted 5 May 2010

Available online 13 May 2010

Keywords:

LDL

Toll-like receptors

Monocyte

Macrophage

TNF- α

ABSTRACT

Oxidized low-density lipoproteins and Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 are involved in the development of atherosclerosis. The TLR are important in the pro-inflammatory response. The aim of this research was to analyze the activation of CD14, TLR4, and TLR2 in response to minimally modified low-density lipoprotein (mmLDL). Human monocytes and macrophages secreted tumor necrosis factor (TNF)- α in response to mmLDL, and blocking CD14 or TLR4 resulted in a ~60% decrease in mmLDL-induced TNF- α secretion. We also observed similar inhibition of TNF- α synthesis in human monocytes (~65%) and macrophages (~70%) when both receptors were blocked simultaneously. When TLR2 was blocked, TNF- α synthesis was inhibited by ~70% in both cell types. Moreover mmLDL induced redistribution of CD14, TLR4, and TLR2 on the cell surface. This is the first evidence that TLR2 and TLR4 are upregulated in response to mmLDL. Our results suggest that mmLDL activates CD14, TLR4, and TLR2, inducing the production of TNF- α and increasing the expression of TLR2 and TLR4.

© 2010 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Atherosclerosis is considered a chronic inflammatory disease. Many studies have shown that different forms of oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) contribute to the development of the atherosclerotic lesion, causing an inflammatory response. This response is characterized by the presence of monocytes in the lesion; these monocytes are subsequently transformed into foam cells [1]. Monocytes and macrophages, which are considered the first line of defense against pathogens, can express Toll-like receptors (TLR) and CD14 on their cell surfaces [2]. As members of the pattern recognition receptor family, the function of these receptors is to detect and respond to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [3]. Upon interaction with ligand, TLR initiate intracellular signaling cascades by activating nuclear factors, such as mitogen-activated protein kinase or nuclear factor- κ B (NF- κ B), usually in response to pro-inflammatory cytokines (e.g., interleukin [IL-1 β , IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- α] [4].

Previous studies have demonstrated that endothelial cells and macrophages from atherosclerotic lesions in mice and humans display increased TLR2 and TLR4 expression [5,6]. Most studies have focused on determining the involvement of TLR in the inflam-

matory processes induced by microorganisms or specific TLR agonists. For example, it has been determined that infectious agents induce TLR2 and TLR4 mediated secretion of IL-6, IL-8, and MCP-1, as well as upregulation of IL-1 β and TNF- α mRNA in endothelial cells [7–9]. Although few studies have addressed the ability of endogenous antigens, including oxLDL, to activate monocytes and macrophages via TLR2 and TLR4 during inflammatory processes, it has been determined that oxLDL increases the expression of TLR4 but not TLR2 transcripts in peripheral blood monocytes from healthy subjects [6]. In contrast, Liu et al. demonstrated that stimulation with oxLDL results in upregulation of TLR2 mRNA expression in macrophages [10]. It has also been reported that minimally modified LDL (mmLDL) binds to CD14 and is capable of signaling through the TLR4/MD2 complex, facilitating macrophage spreading by inducing F-actin polymerization in J774 macrophages [11]. Studies in TLR4^{-/-} or MyD88^{-/-} macrophages have shown that mmLDL induces secretion of macrophage inflammatory protein (MIP)-2 in a TLR4-dependent manner and TNF- α in a TLR4-independent manner [12]. Despite these findings, the role of early forms of oxLDL as endogenous antigens in the activation of CD14, TLR4, and TLR2 remains unknown.

Accordingly, we analyzed the involvement of CD14, TLR4, and TLR2 in the mmLDL response in human monocytes and macrophages derived from the U937 cell line by assessing TNF- α production, and the modulation of TLR2 and TLR4 expression and redistribution in response to mmLDL.

* Corresponding author.

E-mail address: fblanco1@terra.com.mx (F. Blanco-Favela).

L. Chávez-Sánchez and F. Blanco-Favela contributed equally to this work.

2. Subjects and methods

2.1. Experimental protocol

Informed consent was obtained from eight healthy, normolipidemic 20- to 30-year-old male volunteers without cardiovascular risk factors or clinically apparent atherosclerotic disease.

The study was approved by the Human Ethics Committee and Medical Research of the Instituto Mexicano del Seguro Social and conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

2.2. LDL isolation and modification

Native human LDL (nLDL) (density, 1.019–1.063 g/ml) was isolated from plasma by ultracentrifugation. The density of plasma was adjusted to 1.2 g/ml by adding solid potassium bromide (KBr) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Density gradients were formed in 6-ml polycarbonate centrifuge tubes by overlaying 2 ml of plasma solution with 3 ml of 0.5 mmol/l NaCl (endotoxin-free), pH 7.4, $d = 1.006$ g/ml. The tubes were ultracentrifuged in a Sorvall discovery M150 SE (Thermo Scientific) ultracentrifuge equipped with an S80AT3 fixed angle rotor at 41,500 g for 4 hours at 4°C. After ultracentrifugation, very-low-density lipoprotein was removed, after which 3.0 ml of the lower layer was transferred to another tube, 2 ml KBr–NaCl ($d = 1.18$ g/ml) was added, and samples were mixed gently. The tubes were ultracentrifuged at 41,500 g for 4 hours at 4°C, and the LDL fraction was removed. The LDL fraction was dialyzed against 0.5 mM NaCl, pH 7.4, for 24 hours at 4°C to remove EDTA. LDL was oxidized using CuSO_4 (J.T. Baker). To produce mmLDL, 300 $\mu\text{g/ml}$ of LDL was incubated with 10 $\mu\text{mol/l}$ CuSO_4 (J.T. Baker) for 1 hour at 37°C. The mmLDL was then extensively dialyzed against 0.5 mmol/l NaCl, 0.5 mmol/l EDTA, pH 7.4, for 24 hours at 4°C. Oxidative modification of LDL was assessed by measuring thiobarbituric acid–reactive substances as previously described [13]. This assay showed that samples contained between 0.8 and 2.8 nmol malondialdehyde per milligram of protein. The optimal concentrations of mmLDL for activation of human monocytes and macrophages were 50 and 70 $\mu\text{g/ml}$, respectively (data not shown). All nLDL and mmLDL preparations used in these experiments were tested for bacterial lipopolysaccharide (LPS) contamination using a Limulus Amoebocyte Lysate kit (BioWhittaker, Walkersville, MD) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Monocyte isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from buffy coats by density centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway). The buffy coats were mixed with an equal volume of phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, layered over 3 ml of Lymphoprep and centrifuged at 700 g for 30 minutes. The recovered PBMCs were washed three times with PBS, pH 7.4. The monocytes were then isolated from PBMCs by negative selection. PBMCs were incubated with a cocktail of biotin-conjugated antibodies against CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, and glycoprotein A. Magnetic microbeads were coupled to an anti-hapten monoclonal antibody and depleted using a magnetic column (Monocyte Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Purified cells were stained for CD14, and the purity of monocytes was determined by flow cytometry to be >98%.

2.4. Differentiation of U937 cells to macrophages

To produce macrophages, U937 cells (ATCC) were adjusted to 2×10^6 ml in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% fetal calf serum and phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a final concentration of 2.5 ng/ml and incubated for 24 hours at 37°C. The adherent cells were washed three times with PBS, pH 7.4, to remove PMA and incubated in

culture medium containing 10% fetal calf serum without PMA for an additional 24 hours at 37°C before being used in experiments. The maturation of U937 cells was evaluated by measuring their CD14 expression by flow cytometry.

2.5. Specificity of CD14, TLR4, and TLR2 mAbs

Monocytes were cultured in RPMI 1640 medium in 96-well plates at a concentration of 2×5 /well. For blocking experiments, the monocytes were preincubated for 1 hour at 37°C with 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA) or anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antibodies and stimulated with 20 ng/ml Pam3CSK4 (Alexis Biochemicals) or 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) as positive control. Alternatively, monocytes were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-TLR2 (eBioscience, San Diego, CA) for 1 hour at 37°C and stimulated with 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) or 20 ng/ml Pam3CSK4 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) as positive control. As an additional control, the cells were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of irrelevant antibodies before stimulation with TLR ligands. The culture supernatants were collected after 24 hours of incubation at 37°C. Secreted TNF- α levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the instructions of the manufacturer (eBioscience, San Diego, CA).

2.6. Blocking CD14, TLR4, and TLR2

Human monocytes (2×10^5 /ml) and U937 cells (2×10^5 /ml) were treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ human anti-CD14 antibody (clone MEM18, BD Biosciences, San Jose, CA), human anti-TLR4 antibody (clone HTA125, Santa Cruz Biotechnology), or a combination of both antibodies for 1 hour at 37°C. After washing the cells three times with PBS, pH 7.4, monocytes were stimulated with 50 $\mu\text{g/ml}$ mmLDL, and macrophages were stimulated with 70 $\mu\text{g/ml}$ mmLDL for 24 hours at 37°C. Alternatively, human monocytes (2×10^5 /ml) and U937 cells (2×10^5 /ml) were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-TLR2 (clone TL 2.1, eBioscience) for 1 hour at 37°C, washed three times with PBS, pH 7.4, and stimulated with 50 $\mu\text{g/ml}$ mmLDL (monocytes) or 70 $\mu\text{g/ml}$ mmLDL (macrophages) for 24 hours at 37°C. As a positive control for TLR4 and TLR2 activation, monocytes and macrophages were stimulated with 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) and 20 ng/ml Pam3CSK4 (Alexis Biochemicals). As an antibody control, cells were treated with irrelevant IgG isotype control antibodies before stimulation with TLR ligands or mmLDL. As a negative control, monocytes and U937 cells were incubated only in culture medium or with control antibodies in the absence of TLR agonist or mmLDL stimulation. All supernatants were frozen at -70°C before determination of TNF- α secretion.

2.7. Flow cytometry

Monocytes and U937 cells were plated at a concentration of 2×10^5 /ml in RPMI 1640 medium (Invitrogen). The monocytes and macrophages were stimulated with nLDL and mmLDL (between 6.0 and 50 $\mu\text{g/ml}$ for monocytes and between 9.0 and 70 $\mu\text{g/ml}$ for macrophages) for 24 hours at 37°C. Cells were then stained with anti-CD14-FITC (eBioscience), anti-TLR2-PE (eBioscience), and biotin-conjugated anti-TLR4 (eBioscience), followed by avidin-PE-Cy5 (eBioscience) or with isotype control antibodies for 20 minutes in the dark at 4°C and washed twice with PBS containing 1% BSA and 1% sodium azide (Sigma-Aldrich). TLR2 and TLR4 levels were measured using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). TLR expression levels were quantified by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) of each sample using FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA).

2.8. ELISA

TNF- α levels were determined using a commercial ELISA kit (eBioscience) according to the manufacturer's instructions.

2.9. Confocal microscopy

Monocytes (2×10^5 /ml) were incubated with 50 μ g/ml mmLDL for 1 hour at 4°C. Cells were then washed two times with PBS, pH 7.4, and stained for surface receptors with anti-CD14-PE (BD Biosciences), anti-TLR4-FITC (Santa Cruz Biotechnology), and goat anti-TLR2 (1:100 dilution; Santa Cruz Biotechnology) followed by antigoat IgG-FITC (1:150 dilution; Santa Cruz Biotechnology.) for 20 minutes in the dark at 4°C. As a positive control, cells were treated with 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) and 20 ng/ml Pam3CSK4 (Alexis Biochemicals). As a negative control, cells were incubated with culture medium alone. Labeled cells were air-dried on poly-L-lysine-coated slides and mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were obtained using a Zeiss LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss, Obekochen, Germany).

2.10. Statistical analysis

The Mann-Whitney test was used to evaluate the statistical significance of differences between experimental groups. Samples with $p < 0.05$ were considered significantly different. The data shown in all figures are expressed as the mean \pm SEM of values from three independent experiments.

3. Results

3.1. Specificity of CD14, TLR4, and TLR2 mAbs

To validate the efficacy and specificity of our antibodies, we performed experiments using known TLR ligands. We found that anti-CD14, anti-TLR4 (Fig. 1A), and anti-TLR2 (Fig. 1B) antibodies inhibited the production of TNF- α in monocytes in response to LPS and Pam3CSK4 respectively. In contrast, blocking TLR4 or CD14 did not inhibit TNF- α secretion in Pam3CSK4-stimulated monocytes (Fig. 1A), and blocking TLR2 did not inhibit TNF- α secretion in LPS-stimulated cells (Fig. 1B), suggesting that blocking these receptors did not result in nonspecific inhibition of TNF- α secretion and that the observed effects depend on the activation of mmLDL with these surface receptors.

3.2. Inhibition of TNF- α production by human monocytes after blocking CD14 and TLR4

Stimulation of human monocytes with mmLDL resulted in a 17-fold increase in the production of TNF- α (30 pg/ml) over the level of TNF- α produced by unstimulated cells (1.7 pg/ml). Cells stimulated with LPS were used as a positive control. Stimulation

with LPS resulted in a dramatic increase in TNF- α secretion, and this increase in TNF- α secretion was inhibited when CD14, TLR4, or both CD14 and TLR4 were blocked. Blocking CD14 with the anti-CD14 antibody (10 μ g/ml) for 1 hour before stimulating cells with mmLDL resulted in a 60% decrease in the secretion of TNF- α after 24 hours of incubation. Similarly, blocking TLR4 resulted in a 63% decrease in TNF- α secretion. Blocking both receptors simultaneously did not significantly enhance the inhibition of TNF- α production; a 67% decrease in TNF- α secretion was observed in cells treated with both blocking antibodies (Fig. 2A). These results suggest that CD14 and TLR4 are involved in mmLDL-induced upregulation of TNF- α in monocytes.

3.3. Blocking TLR2 prevents secretion of TNF- α by human monocytes

Human monocytes incubated with mmLDL produced significantly more TNF- α than cells incubated in culture medium alone. Cells treated with Pam3CSK4 were used as a positive control. Pam3CSK4 treatment resulted in a dramatic increase in TNF- α secretion, and this increase in TNF- α secretion was inhibited when TLR2 was blocked. Similarly, we found that blocking TLR2 using a monoclonal antibody resulted in a 65% decrease in mmLDL-induced TNF- α secretion (Fig. 2B), suggesting that mmLDL activates TLR2 to induce the production of TNF- α in human monocytes.

3.4. Blocking TLR4 and CD14 inhibits TNF- α production in macrophages

To confirm these results, we used macrophages derived from the U937 cell line. Stimulating U937 macrophages with 70 μ g/ml mmLDL caused an increase in the secretion of TNF- α (400 pg/ml) over that observed in unstimulated cells (152 pg/ml), and blocking CD14 with the anti-CD14 antibody resulted in a 61% decrease in TNF- α secretion. Similarly, blocking TLR4 resulted in a 63% decrease in mmLDL-induced TNF- α secretion. Blocking both receptors enhanced these effects, resulting in a 69% decrease in TNF- α secretion (Fig. 3A). Consistent with the results obtained in human monocytes, these results suggest that mmLDL activates macrophages through a CD14/TLR4-mediated pathway.

3.5. Blocking TLR2 inhibits TNF- α synthesis in macrophages

We next investigated whether TLR2 was required for the synthesis of TNF- α following mmLDL stimulation in U937 macro-

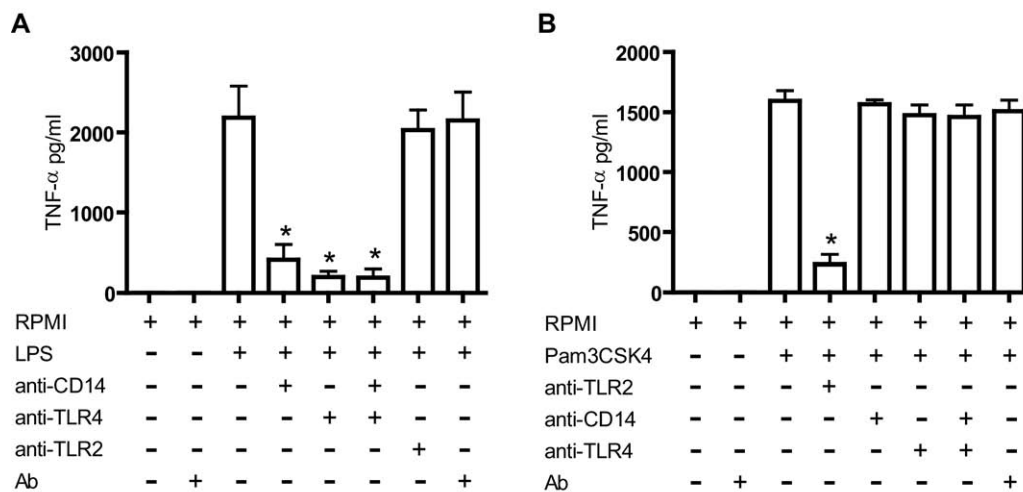


Fig. 1. Specificity of CD14, TLR4, and TLR2 mAbs. (A) Human monocytes were treated with anti-CD14, anti-TLR4, or anti-TLR2 (10 μ g/ml) for 1 hour before incubation with LPS (100 ng/ml). (B) Human monocytes were treated with anti-CD14, anti-TLR4, or anti-TLR2 (10 μ g/ml) for 1 hour before stimulation with Pam3CSK4 (20 ng/ml). Monocytes were incubated with irrelevant Ab (10 μ g/ml) in the presence or absence of TLR ligands. Culture supernatants were collected after 24 hours of incubation at 37°C. The concentration of TNF- α in culture supernatants was determined by ELISA. * $p < 0.005$.

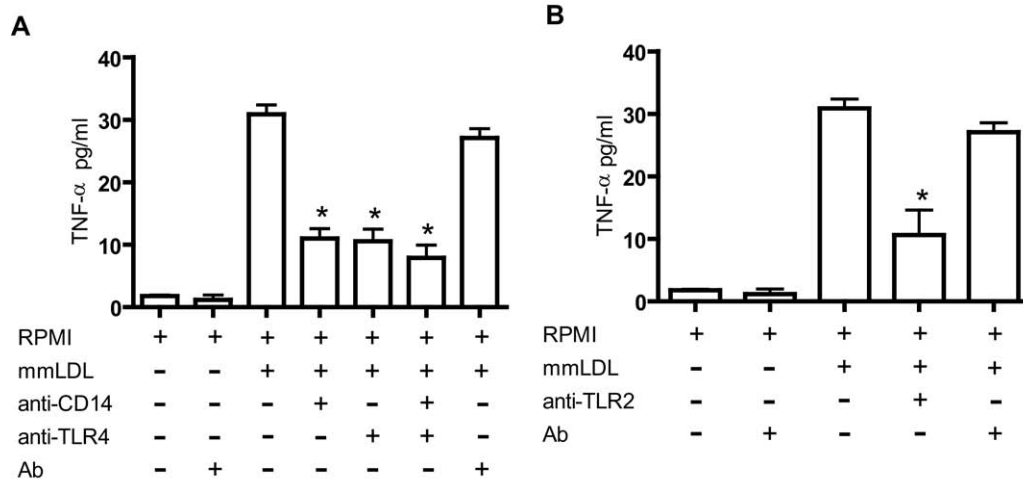


Fig. 2. Role of CD14, TLR4, and TLR2 in the response of monocytes to mmLDL. Human monocytes were obtained from peripheral blood, and the roles of CD14, TLR4, and TLR2 in the response to mmLDL were assessed. (A) Human monocytes were treated with anti-CD14, anti-TLR4, or both antibodies (10 μ g/ml) for 1 hour before incubation with mmLDL (50 μ g/ml). (B) Human monocytes were treated with anti-TLR2 (10 μ g/ml) for 1 hour before stimulation with mmLDL (50 μ g/ml). Monocytes were incubated with irrelevant Ab (10 μ g/ml) in the presence or absence of mmLDL (50 μ g/ml). The concentration of TNF- α in culture supernatants was determined by ELISA. * $p < 0.005$.

phages. Stimulation with 70 μ g/ml mmLDL for 24 hours resulted in an increase in the production of TNF- α . Treatment with an anti-TLR2 blocking antibody but not with an isotype control antibody inhibited the secretion of TNF- α by approximately 66% (Fig. 3B), demonstrating that mmLDL induced a TLR2-dependent pro-inflammatory response in macrophages.

3.6. mmLDL induces redistribution of TLR2, TLR4, and CD14 on cell surface

We analyzed the distribution of CD14, TLR4, and TLR2 on the cell surface by confocal microscopy. The monocytes were incubated with 50 μ g/ml mmLDL for 1 hour at 4°C and co-stained with either anti-CD14 and anti-TLR4 or anti-TLR2. Stimulation with mmLDL induced redistribution of CD14, TLR4, and TLR2 (Fig. 4G, H, and L) and co-localization of CD14 and TLR4 (Fig. 4I) at the cell surface. In contrast, these receptors were homogeneously distributed on the surface of unstimulated cells (Fig. 4A, B, and J). Cells stimulated with LPS and Pam3CSK4 were used as positive controls. These

results suggest that mmLDL induced the redistribution of CD14, TLR4, and TLR2 and co-localization of CD14 and TLR4 on the cell surface.

3.7. Surface expression of TLR2 and TLR4 on monocytes and macrophages

The surface expression levels of TLR2 and TLR4 on human monocytes or macrophages were not affected by the presence of different concentrations of nLDL (data not shown). In contrast, the expression levels of TLR2 and TLR4 on the surface of monocytes increased with increasing doses of mmLDL (Fig. 5A). Similarly, the expression of TLR2 and TLR4 on macrophages also increased with increasing doses of mmLDL (Fig. 5B). In contrast, unstimulated monocytes and macrophages expressed lower levels of TLR2 and TLR4. Stimulation with mmLDL induced higher expression of TLR2 than TLR4 in monocytes (Fig. 5C) and macrophages (Fig. 5D). Moreover, mmLDL but not nLDL increased the secretion of TNF- α by monocytes (Fig. 5E) and macrophages (Fig. 5F) in a dose-dependent manner.

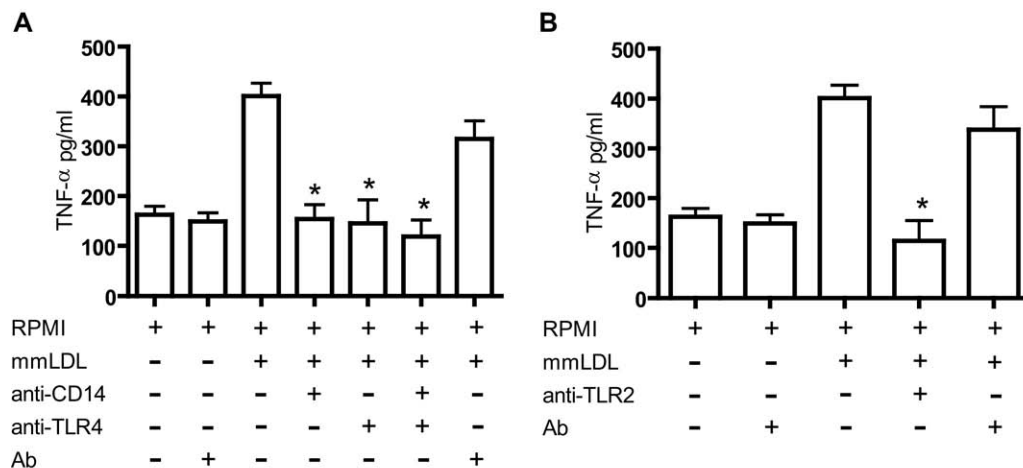


Fig. 3. Role of CD14, TLR4, and TLR2 in the response of macrophages to mmLDL. Macrophages were differentiated from the cell line U937. (A) Macrophages were treated with anti-CD14, anti-TLR4, or both antibodies (10 μ g/ml) for 1 hour before incubation with mmLDL (70 μ g/ml). (B) Macrophages were treated with anti-TLR2 (10 μ g/ml) for 1 hour before stimulation with mmLDL (70 μ g/ml). Macrophages were incubated with irrelevant Ab (10 μ g/ml) in the presence or absence of mmLDL (70 μ g/ml). The concentration of TNF- α in culture supernatants was determined by ELISA. * $p < 0.005$.

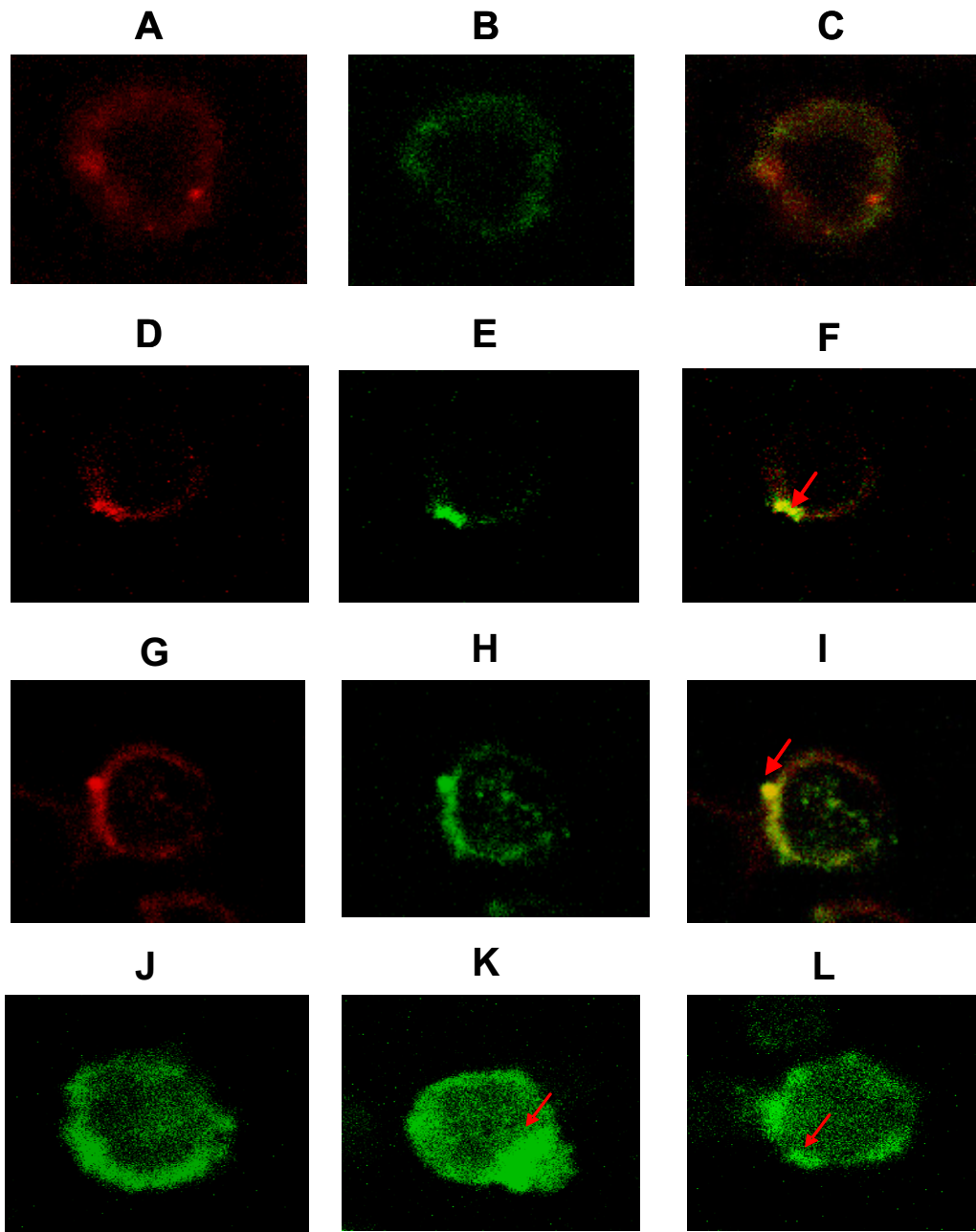


Fig. 4. CD14, TLR4, and TLR2 redistribution after stimulation with mmLDL in peripheral blood monocytes. (A–C, and J) Human monocytes were incubated in RPMI culture medium only. (G–I and L) Human monocytes were incubated with mmLDL. (D–F) Human monocytes were treated with LPS. (K) Human monocytes were stimulated with Pam3CSK4. (A, D, and G) Human monocytes were stained with anti-CD14-PE (red). (B, E, and H) Human monocytes were stained with anti-TLR4-FITC (green). (J–L) Human monocytes were stained with anti-TLR2-FITC (green). Arrows indicate the redistribution of CD14, TLR4, and TLR2 on the cell surface.

4. Discussion

Atherosclerosis is currently considered a chronic inflammatory disease [1]. The possible etiologies of this disease include infections with *Chlamydia pneumoniae* and high concentrations of LDL [1,9]. Several studies have shown that the oxidized modifications of LDL influence the development of atherosclerotic lesions, causing an inflammatory response [1]. In addition it has been demonstrated that TLR2 and TLR4 are involved in the development of atherosclerosis [14,15]. To date, however, there is little evidence that self-antigens, such as oxidized modified LDL are recognized by CD14, TLR4, and TLR2 and are capable of inducing an inflammatory response. Here we clearly demonstrate that mmLDL can contribute to the production of TNF- α through CD14, TLR4, and TLR2 in human monocytes and macrophages.

We investigated the participation of CD14 in the synthesis of TNF- α in response to mmLDL. The cell membrane-anchored glycoprotein co-receptor CD14 is an LPS receptor that participates in pro-inflammatory cytokine secretion [16]. The lack of CD14 results in a strong inhibition of TNF- α production *in vitro* and *in vivo* [17,18]. In a previous study, blocking CD14 in monocytes stimulated with extensively oxidized LDL resulted in a significant inhibition of IL-6 and IL-1 β production [19]. These results are similar to our finding that blocking CD14 resulted in a considerable reduction in mmLDL-induced TNF- α production in human monocytes and macrophages. Furthermore, our results indicate that monocytes and macrophages are activated not only by extensively oxidized LDL but also by a very early form of oxidized LDL via CD14, which is a necessary co-receptor for the synthesis of TNF- α . These findings

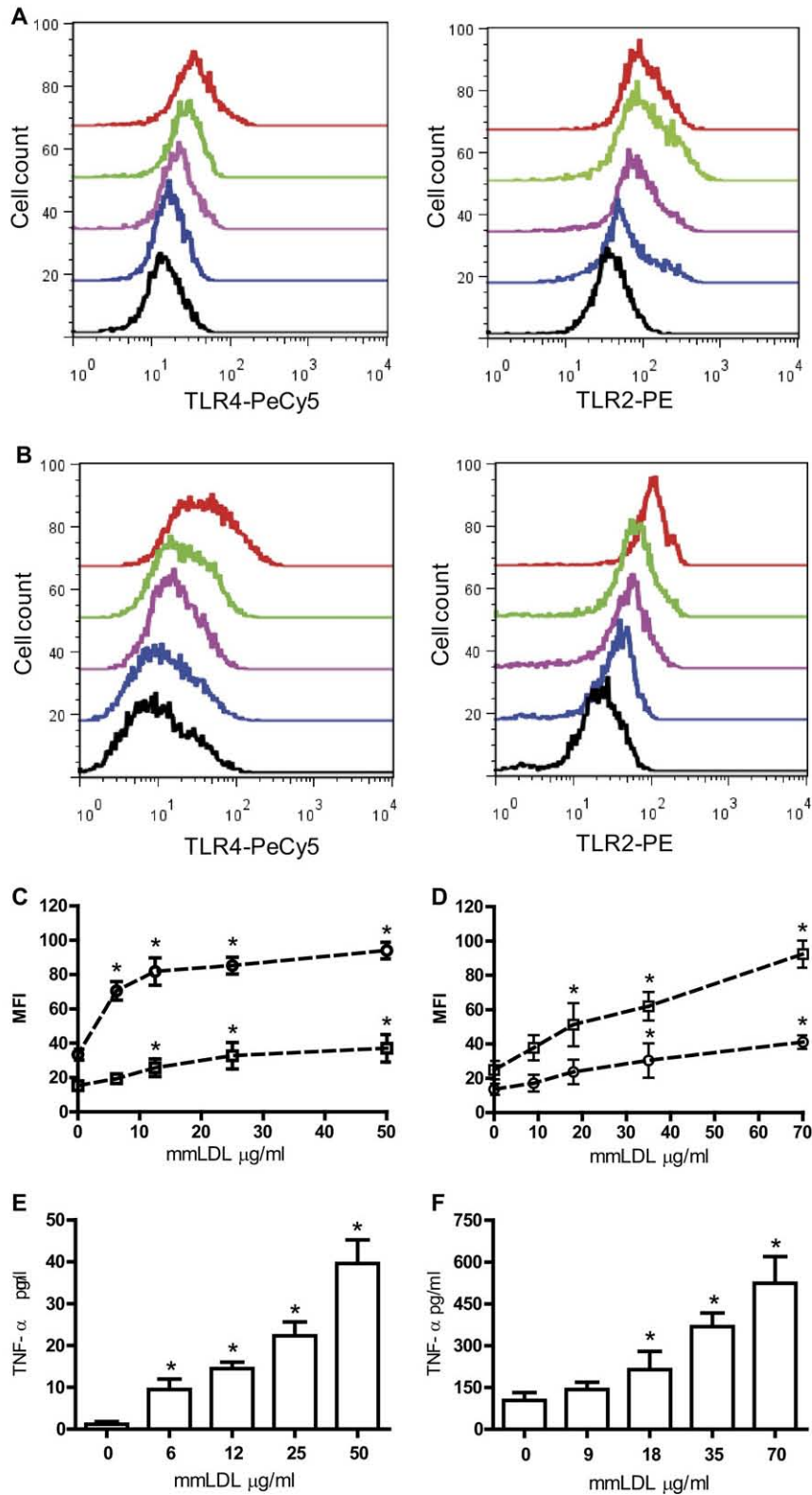


Fig. 5. Stimulation with mmLDL results in upregulation of TLR2 and TLR4 expression in monocytes and macrophages. Monocytes or macrophages were stained with anti-CD14-FITC, anti-TLR2-PE, and biotin-conjugated TLR4 followed by avidin-PE-Cy5 or with isotype control antibodies. All experiments were performed in triplicate. (A) Monocytes or (B) macrophages were incubated with various concentrations of mmLDL. Blue line indicates 6 or 9 $\mu\text{g/ml}$; pink line indicates 12 or 18 $\mu\text{g/ml}$; green line indicates 25 or 35 $\mu\text{g/ml}$; and red line indicates 50 or 70 $\mu\text{g/ml}$. Black line indicates unstimulated cells. Histograms are representative of three experiments. Stimulation with mmLDL resulted in dose-dependent upregulation of TLR2 and TLR4 in monocytes (C) and macrophages (D). (C) Circle indicates TLR2 and rectangle indicates TLR4. (D) Rectangle indicates TLR2 and circle indicates TLR4. Increasing concentrations of mmLDL induce increased secretion of TNF- α in monocytes (E) and macrophages (F). TLR expression levels are expressed as MFI. * $p < 0.005$.

are supported by those of Miller et al. who reported that mmLDL specifically binds to CD14 and induces F-actin polymerization and macrophage spreading [11].

The interaction of TLR4 with PAMPs is known to activate intracellular signals that cause NF- κ B translocation and induce expression of TNF- α , IL-1 β , and other pro-inflammatory cytokines [20,21]. Moreover, the presence of endogenous TLR ligands, such as heat shock proteins, can activate TLR4 [22]. Our results show that mmLDL-induced TNF- α production is dependent on TLR4. This finding is supported by studies by Hodgkinson et al. who demonstrated that the advanced glycation end-product of LDL (AGE-LDL) induced TNF- α production and that blocking TLR4 in macrophages affected the AGE-LDL-mediated production of TNF- α [23]; however the modified LDL used in this previous study was a different from that used in the current study. In contrast, Miller et al. showed that mmLDL induced TNF- α secretion independently of TLR4 [12]. These discrepancies could be due to the different types of mmLDL that were used in each study. The mmLDL used by Miller et al. was modified by fibroblasts that overexpressed 15-lipoxygenase. In the current study, LDL was modified with copper, which may have resulted in a different TLR4 response than that observed by Miller et al. Furthermore, the mmLDL used in the previous study may act through other receptors, such as TLR2, which was also shown to be activated by mmLDL in our study.

CD14 and TLR4 have been demonstrated to play critical roles in the LPS-mediated activation of antigen-presenting cells [16,24]. It has also been reported that CD14 and TLR4 can be individually stimulated by extensively oxidized LDL [19]. In the current study, we analyzed the combined participation of CD14 and TLR4 in the response to mmLDL. Our results showed that TNF- α synthesis was inhibited when CD14 and TLR4 were blocked in monocytes or macrophages, suggesting that both receptors are involved in mediating the pro-inflammatory effect in response to mmLDL and that the activation of the CD14/TLR4 pathway could have a pro-atherogenic effect.

Previous studies have demonstrated the role of TLR2 in the development of the atherosclerotic lesion and suggested that endogenous antigens, such as EDA and HSP60, can activate TLR2 [14,25]; however the role of TLR2 in the response to the endogenous antigen mmLDL is not known. Here we show that the response to mmLDL is also TLR2-dependent, demonstrating that endogenous antigens such as mmLDL activate TLR2 and induce or exacerbate an atherogenic inflammatory state. This finding is supported by the fact that other endogenous antigens activate TLR2, inducing the secretion of TNF- α [26].

It has been demonstrated that unstimulated monocytes and macrophages express CD14, TLR4, and TLR2 homogeneously on their cell surfaces [2,27]. Here we demonstrate for the first time that stimulation with mmLDL results in redistribution of CD14, TLR4, and TLR2 and co-localization of CD14 and TLR4 on the cell membrane similar to that observed when TLR2 and TLR4 are activated [28].

Several reports have demonstrated the participation of highly oxidized LDL in the modulation of TLR4 [19,25]; however the role of mmLDL in the regulation of TLR4 and TLR2 has not been explored. Our results show that stimulation with nLDL does not result in upregulation of TLR2 and TLR4 expression and does not induce TNF- α secretion in monocytes or macrophages, indicating that nLDL is an inactive molecule. Similarly, previous reports have shown that nLDL does not induce the secretion of pro-inflammatory cytokines [29]. In contrast, we observed that, similar to other endogenous antigens that are associated with a pro-inflammatory response [30,31], mmLDL induced upregulation of TLR2 and TLR4 and increased secretion of TNF- α in monocytes and macrophages.

We noted that TLR2 and TLR4 are activated and upregulated after mmLDL stimulation, suggesting that mmLDL is an endoge-

nous ligand of both TLRs and can produce an immune response similar to that reported upon binding of LPS to TLR4, in which signaling results in upregulation of both TLR2 and TLR4 expression, inducing crosstalk between the TLR2 and TLR4 signaling pathways and resulting in amplification of pro-inflammatory cytokine secretion [32].

In conclusion, our results suggest that CD14, TLR4, and TLR2 are activated by mmLDL, triggering an inflammatory response characterized by induction of TNF- α production and upregulation of TLR2 and TLR4 expression in human monocytes and macrophages. These results provide the basis for studies of mmLDL-induced activation of these receptors during sterile inflammation, such as in the atherogenic process.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant no. 44171 and the Instituto Mexicano del Seguro Social project of the Found Health Research project No. 2005/1/1/015. We also thank M.Sc Yadira Ledesma-Soto and M.Sc Eduardo Montoya-Díaz for their help with the assays. L. Chávez-Sánchez, a student in the Facultad de Medicina at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) in the Biomedical Sciences Doctoral Program, was supported by a doctoral fellowship from the National Council of Science and Technology (CONACyT).

References

- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–74.
- Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- κ B. *J Immunol* 2000;165:3541–4.
- Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med* 2006;9:712–25.
- Bannerman A, Gerondakis S. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol* 2007;85:420–4.
- 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;105:1158–61.
- Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, 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;104:3103–8.
- Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res* 2002;1:126–34.
- Yumoto H, Chou HH, Takahashi Y, Davey M, Gibson FC 3rd, Genco CA. Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion. *Infect Immun* 2005;73:8050–9.
- Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GL. *Chlamydia pneumoniae* induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2007;2:753–9.
- Liu X, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Giswami S, Gibson FC 3rd, et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis* 2008;196:146–54.
- 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;278:1561–8.
- Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1213–9.
- Pentikainen MO, Lindsted KA, Kovanen PT. Inhibition of the oxidative modification of LDL by nitecapone. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:740–7.
- Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest* 2005;115:3149–56.
- Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10685–90.
- Shuto T, Kato K, Mori Y, Viriyakosol S, Oba M, Furuta T, et al. Membrane-anchored CD14 is required for LPS-induced TLR4 endocytosis in TLR4/MD-2/CD14 overexpressing CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1402–9.
- Li X, Bradford BU, Dalldorf F, Goyert SM, Stimpson SA, Thurman RG, Makarov SS. CD14 mediates the innate immune responses to arthropathogenic peptidoglycan-polysaccharide complexes of Gram-positive bacterial cell walls. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R273–81.

- [18] Metkar S, Awasthi S, Denamur E, Kim KS, Gangloff SC, Teichberg S, et al. Role of CD14 in responses to clinical isolates of *Escherichia coli*: Effects of K1 capsule expression. *Infect Immun* 2007;11:5415–24.
- [19] Pasini AF, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, et al. Enhance 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;27:1991–7.
- [20] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197–16.
- [21] Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324–35.
- [22] Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodzas S, Geurts J, Wunderink LU, et al. Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006;176:7021–7.
- [23] 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 Thromb Vasc Biol* 2008;28:2275–81.
- [24] Kaisho T, Akira S. Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes Infect* 2004;15:1388–94.
- [25] Schoneveld AH, Hoefer 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.
- [26] Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16⁺ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1457–67.
- [27] Zmijewski JW, Lorne E, Zhao X, Tsuruta Y, Sha Y, Liu G, Abraham E. Antiinflammatory effects of hydrogen peroxide in neutrophil activation and acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:694.
- [28] Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonina TT, Kirkland JL, McDonnell ME, Apovian CM, et al. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity* 2008;16:932–7.
- [29] Netea MG, Kullberg BJ, Demacker PN, Jacobs LE, Verver-Jansen TJ, Hijmans A, et al. Native LDL potentiate TNF alpha and IL-8 production by human mononuclear cells. *J Lipid Res* 2002;43:1065–71.
- [30] Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H. Endocytosed HSP60s use Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001;276:31332–9.
- [31] Wolf G, Bohlender J, Bondeva T, Roger T, Thaiss F, Wenzel UO. Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 on mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1585–93.
- [32] Fan J, Li Y, Vodovotz Y, Billiar TR, Wilson MA. Hemorrhagic Shock-activated neutrophils augment TLR4 signaling-induced TLR2 upregulation in alveolar macrophages: Role in hemorrhage-primed lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L738–46.