



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*“Respuesta de monocitos humanos a la
exposición in vitro de colágena tipo IV”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

LUCERO TERESA MARTÍNEZ SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **PROFESOR: RODOLFO PASTELIN PALACIOS**
VOCAL: **PROFESOR: SATURNINO DE LEÓN CHAPA**
SECRETARIO: **PROFESOR: LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO**
1er. SUPLENTE: **PROFESOR: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ**
2º SUPLENTE: **PROFESOR: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA (UIMIQ) DEL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO
XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS)**

ASESOR DEL TEMA: DRA. LOURDES ANDREA ARRIAGA PIZANO

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: cDR. ISMAEL MANCILLA HERRERA

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: LUCERO TERESA MARTÍNEZ SÁNCHEZ

(Nombre y firma)

ABREVIATURAS

7-AAD	7- Amino Actinomicina D
Akt	Proteína cinasa serina/treonina también conocida como <i>Protein Kinase B</i> (PKB) ó Proteína Cinasa B.
BFA-A	Brefeldina A
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i> : Arreglos citométricos de perlas
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> : Patrones moleculares asociados a daño
DCs	<i>Dendritic cells</i> : Células dendríticas.
EBP	<i>Elastin Binding Protein</i> : Proteína de unión a elastina
FN	<i>Fibronectina</i>
GAG	Glicosaminoglicanos
HA	Hialuronato
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i> : Molécula de adhesión intercelular
IL	Interlucina
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecules</i> : Molécula de adhesión cruzada
LPS	Lipopolisacárido
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> : Proteína quimioatrayente de monocitos
MEC	Matriz extracelular
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i> : Proteína inflamatoria de macrófagos
MMPs	Metaloproteinasas
NLR	<i>NOD-Like Receptor</i> : Receptor tipo NOD
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i> : Factor nuclear κB
PAMPs	<i>Pathogen –Associated Molecular Patterns</i> : Patrones moleculares asociados a patógenos.
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> : Buffer salino de fosfatos
PE	<i>Phycoerythrin</i> : Ficoeritrina.
PepG	Peptidoglicana
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases: Fosfatidilinositol 3 cinasa
PIP	<i>Phosphatidylinositol phosphate</i> : Fosfatidilinositol fosfato
PKD	<i>Protein kinaase D</i> : Proteína cinasa D
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> : Receptor de reconocimiento de patrón

PTEN	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase:</i> fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
SLRPs	<i>Small- Leucin Rich Proteoglicans:</i> Proteoglicanos pequeños ricos en leucina.
TLR	<i>Toll Like Receptor:</i> Receptor tipo toll.
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule:</i> Molécula de adhesión celular vascular
VE	Vascular-endotelial

ÍNDICE

Resumen.	VI
Marco teórico.	8
Inflamación y monocitos.	8
Infiltración de leucocitos y matriz extracelular.	11
Composición y función de la matriz extracelular.	15
Objetivo general.	21
Objetivos particulares.	21
Material y Métodos.	22
Resultados.	27
Discusión.	31
Conclusión.	35
Referencias.	36

Resumen

La inflamación es la respuesta fisiológica que se presenta ante el daño causado por agentes físicos, químicos y/o biológicos. Diferentes tipos de células residentes del tejido dañado generan el microambiente necesario para el reclutamiento de leucocitos, que incluyen a neutrófilos, monocitos y diferentes subtipos de linfocitos desde la circulación. Los monocitos infiltrantes son los principales productores de TNF- α ante el reconocimiento de lipopolisacárido (LPS) vía TLR4, además de secretar otras citocinas proinflamatorias y agentes quimiotácticos. Al menos una porción de ellos, se diferencian a macrófagos y/o células dendríticas (DCs), que pueden vincular a la respuesta innata con la adaptativa y participar como agentes reguladores de la inflamación, lo que involucra la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β . Al ser convocados hacia los tejidos, los monocitos activados deben atravesar las paredes vasculares y entrar en contacto con el endotelio y la matriz extracelular (MEC), que remodelan para moverse en el tejido. En la lámina basal, que rodea las paredes vasculares, el 80% de los componentes proteicos de la MEC, corresponden a colágena tipo IV (Col IV). El reconocimiento de Col IV, íntegra y/o fragmentada, puede inducir la remodelación del citoesqueleto, expresión de metaloproteinasas (MMPs) y resistencia a la apoptosis en los leucocitos migrantes. Recientemente, al analizar el efecto que tiene el reconocimiento de Col IV en la respuesta inflamatoria de leucocitos humanos, observamos incrementos en la secreción de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) estimuladas con LPS, lo que sugiere que Col IV podría tener un papel modulador de la capacidad inflamatoria de estas células mononucleares, que incluyen a linfocitos, CD4, células *Natural Killer* (NK) y monocitos. Para este trabajo nos planteamos determinar el efecto de la incubación con Col IV, íntegra o fragmentada, en el fenotipo y la producción de IL-10 por monocitos humanos. Observamos incrementos significativos en la secreción (inducida por LPS) de IL-10 en CMSP expuestas a Col IV fragmentada, respecto a CMSP sin Col IV. En esta misma condición, tiende a disminuir la secreción de las citocinas inflamatorias TNF e IL-1 β . En nuestro modelo, identificamos a los monocitos como los productores de IL-10. Adicionalmente observamos que, en

presencia de Col IV, es menor la disminución espontánea de CD14 inducida por LPS, respecto a células control (sin Col IV). En conclusión, el reconocimiento de Col IV fragmentada modula y contiene la respuesta inflamatoria de monocitos humanos estimulados con LPS.

Marco teórico

Inflamación y Monocitos

La inflamación es la respuesta de tejidos vascularizados ante el daño producido por un agente de naturaleza biológica, química o física. Es orquestada espacial y temporalmente por diferentes tipos de células (residentes del tejido y leucocitos reclutados al sitio de lesión) así como mediadores inflamatorios (citocinas; IL-1 β , IL-6, TNF, quimiocinas; CCL2, CXCL8; y prostaglandinas), los cuales colaboran para neutralizar y eliminar él o los agentes inductores de daño y recuperar la homeostasis del tejido¹⁻⁴.

Entre las principales células infiltrantes en las respuestas agudas están los monocitos. Estas células, con características de tamaño y granularidad intermedias entre linfocitos y neutrófilos, corresponden del 2 al 12% (200 a 900 mil células/mL de sangre) de los leucocitos circulantes. Los monocitos maduros se caracterizan por expresar CD14 y se han clasificado en varios tipos, tanto en humano como en ratón, dependiendo de la expresión de otras moléculas de superficie como CD16 y LyC6, respectivamente⁵. La expresión de estas moléculas, permite clasificar a los monocitos como clásicos y no clásicos, lo que aparentemente se relaciona con mayor o menor capacidad de respuesta inflamatoria^{5, 6}. Como se muestra en la Tabla 1, esto repercute directamente en su capacidad fagocítica, secreción de citocinas, quimiocinas e incluso, en la regulación de la respuesta y reconstitución del tejido⁶⁻⁸.

La primera función reconocida de los monocitos infiltrantes es como macrófagos, aunque aparentemente también direccionan a los neutrófilos o microglías (leucocitos más abundantes en circulación -30 a 80%-), hacia el sitio de lesión, donde pueden eliminar eficientemente bacterias y otros microorganismos, ya que contienen gran cantidad de enzimas proteolíticas, productoras de especies reactivas del oxígeno, que se potencia con la formación de las trampas extracelulares de DNA o "NETs"⁹. Horas después de haber infiltrado en los tejidos, los monocitos se diferencian para dar lugar a macrófagos o bien a DCs derivadas de monocitos¹⁰. Estas células pueden participar tanto en la expansión como en la contención de la respuesta inflamatoria, así como, al ser

capaces de presentar antígeno a linfocitos, conectan la respuesta inmune innata con la llamada respuesta inmune adaptativa, al activar linfocitos T y B^{10, 11}.

Tabla 1. Clasificación de monocitos; su respuesta inflamatoria y capacidad fagocítica.

Monocitos	Fenotipo	Capacidad fagocítica y/o inflamatoria.
Clásicos	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	▲ Fagocitosis y poca producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1β).
Intermedios	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	Principales productores de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1β).
No clásicos	CD14 ⁺ CD16 ⁺	▼ Fagocitosis, producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1β) y mejores presentadoras de antígeno.

Basado en: Ziegler-Heitbrock, L. *et al*⁹, Skrzeczynska-Moncznik, J. *et al*⁶ y Frankenberger, M. *et al*⁷

La respuesta inflamatoria se da tanto en ausencia como presencia de infecciones bacterianas¹², y depende de la activación de los llamados receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) del sistema inmune innato; como receptores tipo *Toll* (TLRs)¹, receptores tipo NOD (NLRs)¹¹, receptores tipo RIG-I (RLRs) y los receptores de DNA¹³. Los receptores tipo *Toll* pueden sensar moléculas altamente conservadas de los microorganismos, lo que los hace capaces de reconocer una gran variedad de éstos¹⁴. De entre los TLRs que se conocen en el humano¹⁵ se encuentran: TLR-2 que reconoce lipoproteínas y lipopéptidos bacterianos, TLR-4 que reconoce lipopolisacárido (LPS) y TLR-5 que reconoce flagelina¹⁶⁻¹⁸. Este reconocimiento inicial es mediado por células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos, mastocitos y DCs residentes del tejido dañado¹⁹, que generan la activación de diversos factores de transcripción, entre ellos NF-κB, lo que lleva a la expresión de mediadores proinflamatorios como TNF-α, IL-1β, IL-6, y mediadores lipídicos²⁰. Estas moléculas permiten el reclutamiento de leucocitos (incluyendo neutrófilos²¹ y monocitos⁹) a través del endotelio vascular hacia el sitio de lesión o infección⁴. En monocitos, la activación eficiente de TLR4 al reconocer a LPS,

depende de la expresión de CD14, así como de la presencia de las diferentes moléculas de señalización como Myd88, TRAF y varios tipos de STAT, que activan el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) e inducen la expresión de citocinas inflamatorias, si las sub-unidades que lo forman a NF- κ B son p65 y p50²²⁻²⁴, o anti-inflamatorias cuando las sub-unidades son p50-p50²⁵.

La desregulación en el proceso de resolución de la inflamación puede progresar a estados de inflamación crónica, que conllevan la pérdida anatómica y/o funcional del tejido, y así contribuir a la patogénesis de diferentes enfermedades crónicas como: arteroesclerosis²⁶, esclerosis múltiple, artritis reumatoide²⁷, obesidad²⁸ y algunos tipos de cáncer²⁹, entre otras³⁰. Para evitar que la respuesta inflamatoria progrese a un estado crónico, se requiere eliminar el agente desencadenante y contener la respuesta inflamatoria, lo que puede ser mediado por la liberación de moléculas anti-inflamatorias como: lipoxinas, resolvinas, TGF- β , glucocorticoides e IL-10^{1, 30}. Estas últimas pueden ser el resultado de la señalización alterna de TLRs o bien, cuando los macrófagos ingieren cuerpos apoptóticos.

Se propone que existen dos fases de la respuesta inflamatoria: 1) la francamente inflamatoria y la anti-inflamatoria (o de resolución). La primera ocurre en las primeras 4-12 horas posteriores al reconocimiento del agente desencadenante, el cual puede corresponder a moléculas asociadas a patógenos (PAMPs) o a moléculas asociadas a daño (DAMPs) que se reconocen vía PRRs. Así la presencia de estímulos como LPS, que para ser reconocido eficientemente por los monocitos requieren tanto de TLR-4 como de CD14, y estos, mediante la liberación de TNF, IL-1 β e IL-6 activa a células endoteliales, lo mismo que a otras células mieloides que recluta al sitio lesionado^{31, 32}. La fase anti-inflamatoria aparentemente se puede iniciar por la presencia de moléculas pro-inflamatorias o incluso por el mismo estímulo desencadenante, pero con una cinética de respuesta que permite, de 8 a 24 horas después, la liberación de resolvinas y/o citocinas anti-inflamatorias, como IL-10. Se requiere que la activación de la fase pro y anti-inflamatoria no sean simultáneas, ya que debe de haber suficiente tiempo para que la fase inflamatoria detecte, contenga e, idealmente, elimine al agente desencadenante, antes que sea contenida por los agentes anti-

inflamatorios, que previenen el daño tisular y favorecen la reconstitución del tejido¹¹. La principal citocina anti-inflamatoria descrita, IL-10 puede ser producida por diferentes tipos de células; macrófagos, DCs, células B y varias poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+^{33, 34, 35}, y es capaz de inhibir la síntesis de diferentes citocinas y quimiocinas inflamatorias, entre ellas TNF, IL-1 β e IL-6^{31, 34}, lo que depende de la inhibición del NF- κ B³⁶.

Ligandos de TLRs, como peptidoglicano, DNA, CpG ó zymosan pueden inducir la expresión de IL-10 en DCs maduras³⁷. En macrófagos y monocitos humanos, IL-10 puede producirse en respuesta a LPS³⁸.

Infiltración de leucocitos y matriz extracelular

El reclutamiento de leucocitos hacia el tejido dañado es crucial para el desarrollo de respuestas inflamatorias efectivas. Para que esto suceda, los leucocitos deben migrar a través del endotelio vascular (diapedesis)¹². La migración de leucocitos es iniciada por la generación local de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas,³⁰ patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)³⁹, y los fragmentos C3a, C4a y C5a del sistema del complemento⁴⁰, entre otros. El reclutamiento de leucocitos involucra varios pasos, como el rodamiento mediado por selectinas y la adhesión firme mediada por integrinas²¹. La unión de E-selectina y P-selectina a sus respectivos ligandos (ácido siálico, por ejemplo) disminuye su velocidad en el flujo sanguíneo llevando a un movimiento de rodamiento ("rolling") sobre la pared vascular. Las integrinas de unión a leucocitos, como la molécula de adhesión intracelular endotelial (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1), median la adhesión firme de leucocitos con la membrana apical del endotelio. Otros receptores transmembranales como PCAM-1, CD99 y JAM, participan en los procesos subsecuentes necesarios para la movilización de leucocitos hacia el tejido⁴¹. PCAM-1 está implicada en el inicio de la diapedesis⁴², en procesos de señalización intracelular, en una interacción homofílica⁴³, en la activación de integrinas β 1, β 2 y β 3, así como en la movilización de integrinas de superficie como α 6 β 1^{41, 44}. La super familia de moléculas de unión y adhesión; JAM-A, JAM-B y JAM-C están involucradas en la

extravasación de monocitos y neutrófilos⁴⁵. Las integrinas $\beta 2$ (ligando de JAM-A) son útiles para la adhesión firme y trans migración⁴⁶. CD99 puede funcionar como molécula que activa vías de señalización intracelular para modular la adhesión, migración y contactos endoteliales⁴⁷. Además, se sabe que la caderina vascular endotelial (VE-caderina) es una molécula de adhesión esencial en la integridad y estabilidad en el contacto de células endoteliales⁴⁸.

Después de atravesar la barrera de células endoteliales, los leucocitos migran a través de la membrana basal perivascular⁴⁹. Así, durante la migración, los leucocitos atraviesan tanto la capa de células endoteliales como la membrana basal perivascular (compuesta por pericitos incrustados dentro de una red de proteínas de la matriz extracelular)⁵⁰(Figura 1).

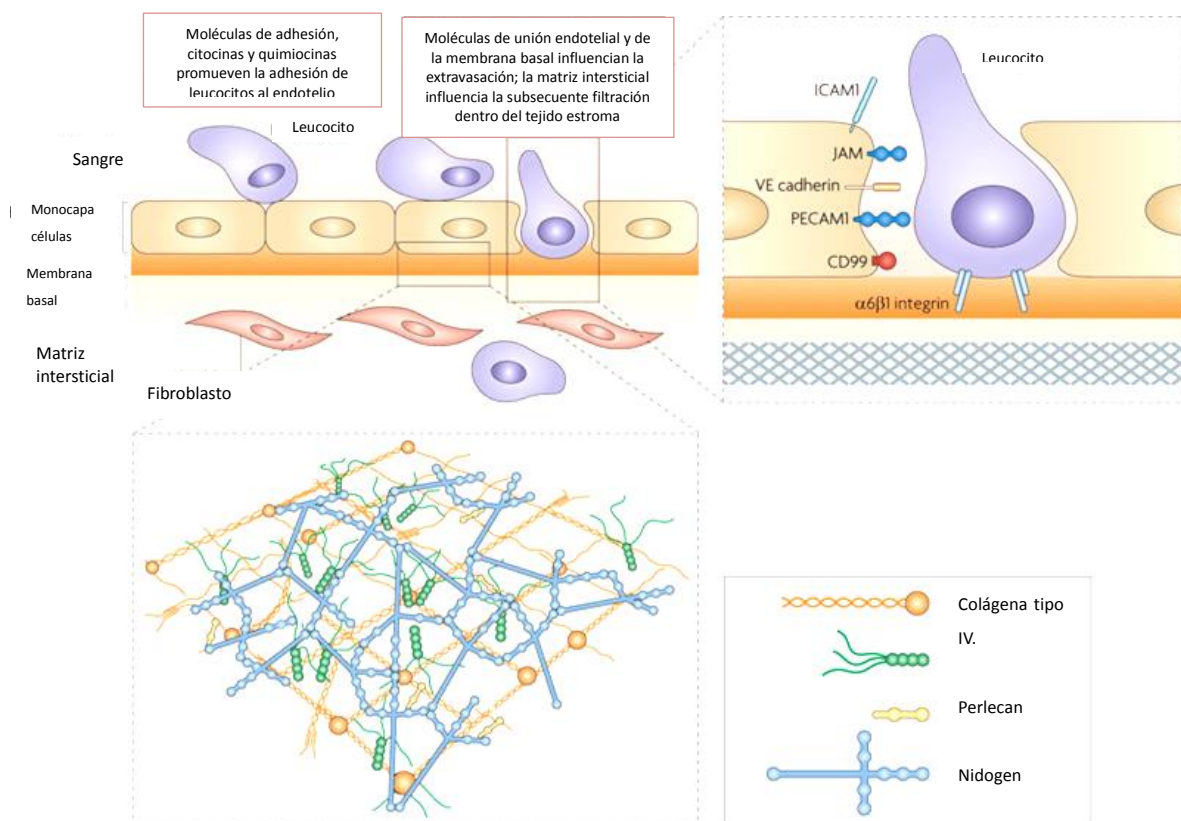


Figura 1. Esquema de la migración de leucocitos a través de células endoteliales y matriz extracelular. Se ilustran diferentes moléculas requeridas para la migración de leucocitos y algunos componentes de la matriz extracelular. Figura modificada de: Sorokin, Lydia, 2010⁵⁰.

La migración a través de la membrana basal perivascular toma de 20-30 minutos *in vivo*. Esta larga interacción entre leucocitos y la membrana basal perivascular así como el reconocimiento de mediadores solubles como las quimiocinas, induce cambios en el fenotipo de los leucocitos migrantes⁵¹, que les permiten la diapédesis y migración a través de los tejidos, e incluyen: remodelación de citoesqueleto, expresión diferencial de diversas moléculas de adhesión (incluidas integrinas), y expresión de MMPs, enzimas requeridas para la degradación de componentes de la MEC, con lo que los leucocitos se abren paso durante su movilización^{45, 49, 52}(Figura 2).

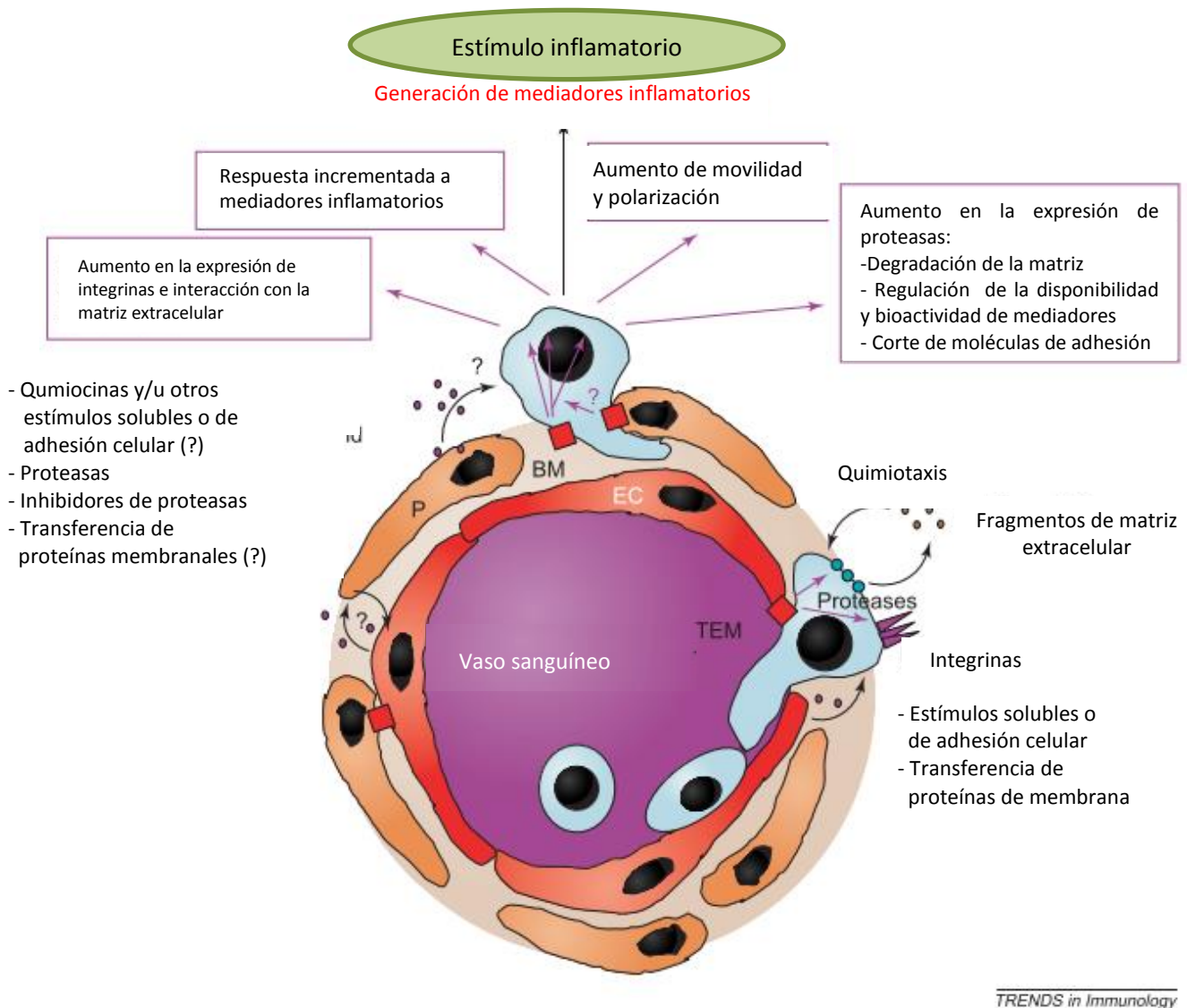


Figura 2. Cambios leucocitarios fenotípicos y funcionales relacionados con su migración a través del endotelio. Figura modificada a partir de: Marelli-Berg².⁵²

En estudios *in vivo* con neutrófilos de ratón se ha encontrado que, interacciones homofílicas con PECAM-1, favorecen la expresión de proteasas que podrían facilitar su paso a través de la membrana basal⁵³. En estudios con neutrófilos de humanos, se encontró que fragmentos de colágenas y elastina favorecen el reclutamiento de éstos al sitio de inflamación⁵⁴. Así mismo, la interacción de monocitos humanos con colágena tipo I induce la expresión de MMP9⁵⁵, esencial

para una respuesta inflamatoria eficaz^{45, 50}.

Composición y función de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es un componente no celular de todos los tejidos y órganos. Proporciona la base estructural para el soporte y mantenimiento de la arquitectura de los tejidos, así como señales bioquímicas y biomecánicas cruciales para la morfogénesis del tejido, diferenciación celular y la homeostasia tisular. Su amplia distribución en gran variedad de tejidos ilustra la importancia que tiene tanto en condiciones normales como patológicas⁵⁰.

La MEC es una estructura altamente dinámica que constantemente es remodelada por mecanismos dependientes o independientes de enzimas como las MMPs. La homeostasis de tejidos como el epitelio depende del mantenimiento de la organización de la estructura de la matriz extracelular y de la comunicación con el estroma circulante (fibroblastos no activados, adipocitos y leucocitos no estimulados)⁵⁶. La estructura a partir de la cual la MEC establece comunicación por contacto directo con los componentes celulares es mediante los hemidesmosomas, a través de los que se pueden sentir los cambios en la arquitectura de la MEC por las células circundantes, lo que activa vías de señalización que regulan la transcripción de genes⁵².

Se sabe que la MEC es capaz de proporcionar señales que afectan la adhesión, remodelación de citoesqueleto, migración, proliferación, supervivencia, y diferenciación celular. Los ejemplos clásicos de interacciones entre MEC y células son las que implican la familia de receptores de superficie celular de integrinas. Cuando la MEC es modificada, los fragmentos de MEC ó matricinas pueden interactuar con diferentes tipos de receptores^{57, 58}; como el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por *Epidermal growth factor receptor*), y la proteína de unión a elastina (EBP, por *elastin-binding protein*)⁵⁹.

La MEC está compuesta por proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos y polisacáridos con diferentes propiedades físicas y químicas^{60, 61}. Estos componentes constituyen tanto la membrana basal, producida por células epiteliales, endoteliales y estromales, así como la matriz intersticial, producida

principalmente por células del estroma. La membrana basal es un tipo de MEC especializada que es más compacta y menos porosa que la matriz intersticial. La membrana basal está compuesta principalmente por Col IV, lamininas, elastinas y fibronectina (FN). La matriz intersticial es rica en colágenas fibrilares, proteoglicanos y glicoproteínas como fibronectina⁶²

Los proteoglicanos ocupan la mayor parte del espacio intersticial extracelular en el tejido, formando un gel hidratado⁵⁰. Los proteoglicanos se componen por cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) unidos covalentemente a un núcleo de proteína específica. Los proteoglicanos se clasifican en función de sus proteínas centrales, localización y composición del GAG⁶³. Las tres familias principales son: proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs), proteoglicanos modulares y proteoglicanos en la superficie celular. Estas moléculas son extremadamente hidrófilas, tienen conformaciones muy largas y esenciales para la formación del hidrogel lo que permite a las matrices soportar altas fuerzas de compresión⁶⁴.

La colágena es la proteína fibrosa más abundante dentro de la MEC, constituye hasta el 80% de su composición; éstas proteínas ofrecen resistencia a la tracción, regulan la adhesión celular, la quimiotaxis de apoyo, así como la migración en la infiltración o desarrollo de los tejidos^{65, 66}. Las colágenas se asocian con la elastina, otra de las proteínas fibrosas principales de la matriz extracelular y, forman así estructuras resistentes y elásticas, con capacidad de recobrar su forma después de que han sido sometidas a estiramientos repetidos⁶³.

Las colágenas están compuestas por tres cadenas polipeptídicas. Cada cadena polipeptídica (cadena alfa) tiene una repetición del triplete Gly-XY, en las que los residuos de glicina ocupan cada tercera posición, la posición X puede ser prolina o lisina, Y puede ser hidroxiprolina o hidroxilisina. Las cadenas se mantienen unidas entre sí por puentes de hidrógeno⁶⁶. La estructura de las diferentes colágenas varía y con ello las formas en que se ensamblan; por ejemplo, la colágena tipo I, forma fibrillas y su función es dar estructura al tejido principalmente, mientras que las colágenas que presentan interrupciones en la triple hélice y no forman fibrillas, participan en la adhesión celular y señalización, como la colágena tipo IV que se encuentra formando redes^{67, 68}. La mayoría de las colágenas son homotriméricas,

aunque algunas, como la colágena tipo I, pueden ser heterotriméricas⁶⁹.

En los vertebrados se conocen al menos 28 tipos diferentes de colágenas (Tabla 2)⁶⁸. Las colágenas se clasifican según su función y homología en: 1) formadoras de fibrillas, 2) asociadas a fibrillas con interrupciones en la triple hélice (FACITs), 3) formadoras de redes, 4) transmembranales, 5) productoras de endostatina, 6) fibras de anclaje y 7) formadoras de filamentos de perlas. Éstas se distribuyen en todo el organismo y de forma diferente según el tejido en que se encuentren. (Tabla 2). De las más abundantes es la colágena tipo IV, su importancia radica en que forma parte de la mayoría de los tejidos, porque Col IV corresponde al principal componente proteico de la adventicia, la capa más externa que rodea a todos los vasos sanguíneos, que abundan en riñón, ojo (excepto córnea), pulmón, músculo esquelético, aorta, páncreas, bazo, piel y pleura⁷⁰.

Tabla 2. Clasificación y distribución de los diferentes tipos de colágenas.

Tipo de colágena	Clasificación	Distribución
I	Formadora de fibrillas	Piel, tendones, ligamentos, córnea, huesos
II	Formadora de fibrillas	Cartílago, humor vítreo
III	Formadora de fibrillas	Órganos tubulares, piel embrionaria, codistribuida con colágena tipo I
IV	Formadora de redes	Membrana basal
V	Formadora de fibrillas	Tejido embrionario, córnea, codistribuida con colágena tipo I
VI	Formadora de filamentos de perlas	Músculo
VII	Fibras de anclaje	Uniones dermis-epidermis
VIII	Formadora de redes	Membrana descemet
IX	FACIT	Cartílago, humor vítreo, codistribuida con colágena tipo I
X	Formadora de redes	Cartílago hipertrofiado
XI	Formadora de fibrillas	Codistribuida con colágena tipo II
XII	FACIT	Encontrada con colágena tipo I
XIII	Transmembranal	Ojo, músculo, vasos sanguíneos
XIV	FACIT	Encontrada con colágena tipo I
XV	Productora de endostatina	Ojo, músculo, vasos sanguíneos. Cerca de la membrana basal
XVI	FACIT	Codistribuida con colágenas formadora de fibrillas
XVII	Transmembranal	Epitelio
XVIII	Productora de endostatina	Asociada a membrana basal
XIX	FACIT	Membrana basal
XX	FACIT	Mayoría de los tejidos
XXI	FACIT	Mayoría de los tejidos
XXII	FACIT	Uniones tisulares
XXIII	Transmembranal	Rara
XXIV	Formadora de fibrillas	Hueso
XXV	Transmembranal	Patológica
XXVI	Formadora de filamentos de perlas	Desconocido
XXVII	Formadora de fibrillas	Tejido embrionario
XXVIII	Formadora de filamentos de perlas	Membrana basal de tejido nervioso
Ectodisplisina	Transmembranal	Ectodermo
Gliomedina	Transmembranal	Tejido nervioso

Tomado de Kadler EK,71

Como se mencionó previamente, existe toda una gama de moléculas en la superficie celular que reconocen a los diferentes componentes de la matriz extracelular, entre ellas, las integrinas, una familia de proteínas transmembranales⁷¹ que forman un dímero con una subunidad α y una β . En el humano se conocen 8 tipos de subunidades β y 18 tipos de subunidades α ⁷². Se sabe que las integrinas; $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ y $\alpha11\beta1$, son receptores para colágenas. Los dominios intracelulares de las integrinas podrían conectarse con tirosin-cinasas y proteínas adaptadoras que activan o inhiben vías de señalización intracelular⁷³. Las integrinas, receptores de colágenas, son estructuralmente diferentes a otras integrinas de unión a MEC, poseen un dominio específico I insertado como parte de la subunidad α ; éste dominio es responsable del reconocimiento de la colágena. La unión de colágena al dominio $\alpha1$ de las integrinas es dependiente de la presencia de magnesio (Mg^{2+})⁷⁴.

Las integrinas poseen diferentes patrones de expresión en los diferentes tipos celulares; la integrina $\alpha1\beta1$ se expresa en linfocitos y monocitos⁷⁵, la integrina $\alpha1\beta1$ posee mayor afinidad por la Col IV íntegra⁷⁶, se ha visto que la integrina $\alpha1\beta1$ participa en la proliferación celular⁷⁷. Además, se ha encontrado que algunas integrinas pueden activar vías de señalización para inducir apoptosis⁷².

Se sabe que el contacto con componentes o fragmentos de la MEC puede inducir la expresión de diferentes citocinas. El contacto de macrófagos de ratón con fibronectina puede potenciar su capacidad de secreción de TNF ante LPS⁷⁸, en monocitos humanos el contacto sólo con fibronectina induce la secreción de TNF⁷⁹, el contacto de macrófagos humanos con fragmentos de hialuronato (HA) induce la expresión de genes de IL-1 β y MCP-1 ante LPS⁸⁰.

En un trabajo previo realizado en el laboratorio, se encontró que la exposición *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de humano a colágena tipo IV, pero no a colágena tipo I, puede inducir la secreción de IL-10 ante el estímulo de LPS de *Escherichia coli*⁸¹⁻⁸³. Dado que estos resultados se obtuvieron utilizando tiempos prolongados de incubación (12h de incubación con Col IV, posteriormente se estimularon con LPS durante 4h más) es factible que la respuesta observada se debiera al reconocimiento de Col IV íntegra o bien de

colágena fragmentada, por las metaloproteinasas (MMPs) que se inducen ante su reconocimiento⁸⁴. Por otro lado, el grupo de células mononucleares de sangre periférica incluyen monocitos, linfocitos (T, B y NK) así como algunos tipos de DCs, de los cuales se ha reportado que monocitos en respuesta a LPS y ligandos de TLR-2^{85, 86}, DCs en respuesta a *Micobacterium tuberculosis* y el antígeno LcrV de *Yersinia pestis*^{87, 88}, linfocitos T_{H1} ante una fuerte estimulación de TCR (alta dosis de antígeno)⁸⁹ y linfocitos T reguladores (T_{reg}) al reconocer hialuronato (componente de la MEC)⁹⁰, pueden producir IL-10. En el modelo citado de exposición *in vitro* a Col IV y LPS, aunque observamos incrementos en la secreción de IL-10, desconocemos el tipo de células que la producen. Por lo que el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la Col IV, íntegra y fragmentada, sobre la capacidad de secreción de IL-10 en monocitos humanos estimulados con LPS.

Planteamiento del problema

Para que los leucocitos de circulación sanguínea puedan llegar al sitio de daño, durante el proceso inflamatorio, deben migrar a través del endotelio vascular y la MEC. Se ha descrito que diversos componentes de la MEC presentan motivos de unión a receptores tipo integrinas, presentes en leucocitos, estos receptores están involucrados en diferentes procesos de señalización intracelular, inhibición de apoptosis, activación de factores de transcripción para la expresión de citocinas como IL-10, entre otros. Fragmentos de proteínas de la MEC pueden ser reconocidos por PRRs e inducir respuestas pro o anti-inflamatorias. Evidencias recientes nos mostraron que colágena IV, proteína muy abundante en la membrana basal que recubre los vasos sanguíneos, induce la secreción de IL-10 por células mononucleares humanas. Queda por esclarecer que tipo de células, monocitos o linfocitos, son los que responden produciendo IL-10 y frente a qué conformación inicial de la colágena IV, íntegra o fragmentada.

Justificación

Recientemente, observamos que la exposición de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a colágena tipo IV, pero no a colágena tipo I, potencia la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 por el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli*. Este resultado sugiere que el contacto con la colágena IV podría disminuir la capacidad inflamatoria de los leucocitos infiltrantes en los tejidos como una forma de control de la respuesta innata a nivel local, ya que los principales leucocitos candidatos para la producción de esta citocina en las CMSP son los monocitos.

Hipótesis

El contacto de colágena tipo IV incrementa la producción de IL-10 de monocitos de células mononucleares de sangre periférica.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a colágena IV, íntegra y fragmentada, sobre la capacidad de secreción de IL-10 y el fenotipo de monocitos humanos estimulados con LPS.

Objetivos particulares

- Cuantificar IL-10, IL-1 β , IL-6 y TNF en sobrenadantes de CMSP estimuladas con LPS en presencia o no de colágena IV, íntegra o fragmentada.
- Determinar IL-10 intracelular en monocitos humanos estimulados con LPS en presencia o no de colágena IV, íntegra o fragmentada.
- Determinar el fenotipo inflamatorio de monocitos estimulados con LPS en presencia o no de colágena IV, íntegra o fragmentada.
- Determinar el grado de muerte celular de monocitos estimulados con LPS en presencia o no de colágena IV, íntegra o fragmentada

Material y Métodos

Recubrimiento de placas con colágena tipo IV

Placas de poliestireno de 24 pozos (Corning[®] Incorporated, NY) fueron recubiertas con 300 µL/pozo de solución de colágena tipo IV (BD, CatNo.354233, 0.1% w/v). Las placas se incubaron durante 30 min a 37°C con 5% CO₂ y el exceso de la solución fue retirada.

Fragmentación de colágena tipo IV

Colágena tipo IV fue expuesta a colagenasa IV (Life Technologies[®], CatNo. 17104, U/mL) en proporción 1:3. Las placas fueron recubiertas con esta solución de la misma manera que en el apartado anterior.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Por venopunción humeral, previa asepsia y antisepsia, se obtuvieron muestras de sangre periférica de 9 voluntarios varones de entre 20-30 años de edad aparentemente sanos. La sangre fue colectada en tubos con sistema Vacutainer con heparina de litio como anticoagulante (BD Biosciences[®], San José, CA, USA). En condiciones de esterilidad, se realizó la separación de células mononucleares de sangre periférica realizando un gradiente de densidad con una solución comercial que contiene 9.1% de diatrizoato de sodio y 5.7% de polisacáridos, dicha solución posee una densidad de 1.077± 0.001 g/mL (Lymphoprep[®], LYS 3773 Axis-Shield[®]).

Se realizó una dilución 1:1 de sangre periférica con solución amortiguadora de fosfatos, (PBS, cuya composición es: NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 1.16 g/L, KH₂PO₄ 0.2 g/L, KCl 0.2 g/L) estéril en un tubo para centrifuga de poliestireno estéril de 15 mL (BD Falcon[™][®] Biosciences, San José, CA, USA). En otro tubo para centrifuga de poliestireno estéril de 45 mL (BD Falco[™][®] Biosciences, San José, CA, USA) se colocó un volumen de Lymphoprep igual a 1/2 del volumen de la sangre diluida con PBS estéril, con una pipeta de transferencia estéril se colocó la sangre diluida con PBS sobre la solución de Lymphoprep sin que se mezclaran. Se centrifugó a 600 xG durante 30 min sin freno de aceleración y desaceleración. Se colectaron

las células mononucleares, correspondiente al anillo de células mononucleares (24), con una pipeta de transferencia estéril, y se transfirieron a otro tubo de poliestireno de 15 mL para resuspenderlas, se adicionó PBS estéril hasta la marca de 15 mL. Se centrifugo a 400 xG durante 5 minutos, este paso se realizó dos veces. Posteriormente se realizó el conteo de células viables con ayuda de un contador automatizado (Countess, automated cell counter. Invitrogen™®). Este conteo siempre reveló viabilidad celular superior al 85% de las CMSP así enriquecidas.

Estimulación de CMSP

De las CMSP obtenidas, se colocaron 100,000 células mononucleares en cada pozo de las placas de cultivo de poliestireno recubiertas con colágena, colágena fragmentada, sin colágena y colagenasa y después se les adicionó 50 ng de (LPS) de *E. coli* O26:B6 (5 ng/μL) y se incubaron durante 19 horas a 37°C con 5% CO₂. Transcurrida la incubación, las placas de cultivo fueron centrifugadas (600xG/5 min), y el sobrenadante fue almacenado a -20°C para la posterior determinación de citocinas.

Determinación de IL-10, IL-6, IL-1β y TNF en sobrenadante

Las concentraciones de IL-10, IL-6, IL-1β y TNF en sobrenadante se obtuvieron utilizando un kit de arreglos citométricos en perlas (CBAs, por sus siglas en inglés: *Cytometri-Bead-Arrays*). La técnica de CBAs es un método que permite determinar uno o varios analitos suspendidos en una sola muestra. El principio es muy parecido al de los ensayos de ELISA, solo que el anticuerpo de captura en vez de estar fijo a una placa, está unido a una perla sintética (o esfera, o *bead*). Las perlas se pueden diferenciar por la intensidad que tienen ante una fluorescencia determinada (F1). Al variar la especificidad del anticuerpo de captura de acuerdo a esta intensidad diferencial, se pueden colocar en un mismo tubo de reacción varios tipos de perlas que identifiquen cada cual diferentes analitos. Una vez que se incuban con la muestra, al analito específico quedará unido a la perla, y al utilizar un segundo anticuerpo, el de detección acoplado a ficoeritrina (PE) se

forma un complejo de “sándwich” de cada citocina. A partir de una curva patrón o de referencia en el que se utilizan el analito de control(en este caso citocinas) en diluciones seriadas, se establece la equivalencia de la intensidad de fluorescencia para la fluorescencia de PE y la concentración de cada citocina, que se diferencian entre sí por la diferencia de fluorescencia de F1. En estos ensayos se utilizó un kit comercial que contiene las diferentes perlas, anticuerpos de captura y reactivos para incubación, así como las citocinas para la curva de referencia. El kit utilizado fue “CBA Human Inflammatory Cytokines Kit” (BD[®] Biosciences, San José, CA, USA). El límite de detección del kit para IL-10, IL-6, IL-1 β y TNF fue de 3.3 pg/mL, 2.5 pg/mL, 7.2pg/mL y 3.7pg/mL respectivamente. Se utilizaron 5 μ L/muestra del CBA recubierto con anticuerpos dirigidos a IL-10, IL-6, IL-1 β y TNF, posteriormente se agregó el reactivo de detección del kit (25 μ L/muestra), siendo anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-10, IL-6, IL-1 β y TNF, acoplados PE. Las muestras se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 300 μ L de amortiguador de lavado del kit por muestra, posteriormente las muestras se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y posteriormente las muestras se adquirieron con un citómetro de flujo FACSAria (BD[®] Biosciences, San José, CA, USA) que cuenta con el software FACSDiva versión 6.0 para Windows. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Infinicyt[®] de Cytognos.

Determinación de IL-10 intracelular

Después de la estimulación o no con LPS, a las CMSP se les agregó los inhibidores de transporte de proteínas (2 μ L de cada uno), Brefeldina (BFA-A 1 μ g/millón de células) y Monensina (1 μ g/cada uno) BD GolgiStop[™] (BD[™] Biosciences, San José, CA, USA). Se incubaron durante 4 horas más a 37°C con 5% CO₂, transcurridas las 4 horas se realizó tinción intracelular, primero se agregaron anticuerpos monoclonales; anti CD-14 PE Cy7 (Biolegend[®], San Diego, CA, USA, clona M5E2) como marcador de identificación, y usando un kit de permeabilización celular FIX & PERM[®] (Invitrogen[®] Corporation, CA, USA) el cual

cuenta con dos reactivos, uno que es el medio de fijación y otro el reactivo de permeabilización de la membrana, para permitir la entrada de los anticuerpos monoclonales anti IL-10 PE (BD[®] Biosciences, San José, CA, USA, clona JES3-19F1) para determinación de IL-10 intracelular en monocitos.

La determinación de IL-10 en monocitos se hizo utilizando la siguiente estrategia de análisis que se estandarizó durante la realización del presente trabajo: a partir de gráficas de puntos del parámetro de tamaño en señal pico (o “Height”, FSC-H) contra señal área (FSC-A), se seleccionaron los eventos sencillos (células no agregadas que fueron evaluada una por el citómetro) (Figura 3a). Los eventos sencillos seleccionados debían de estar en la región correspondiente a células mononucleares en una gráfica de tamaño (FSC-A) vs granularidad o complejidad (SSC-A)(Figura 3b); a partir de allí, se seleccionaron los eventos positivos a CD14 como correspondientes a monocitos. La producción de IL-10 (intracelular) se determinó por la intensidad media de fluorescencia (IMF) del detector de PE, fluorocromo con el que estaba conjugado el anticuerpo anti-IL-10. (Figura 3c).

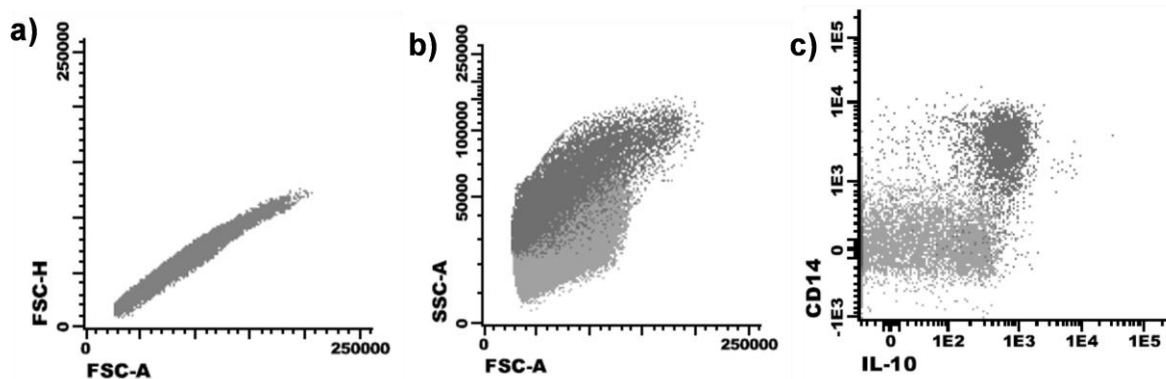


Figura 3. Estrategia de análisis para la identificación de monocitos productores de IL-10. CMSP expuestos a diferentes estímulos fueron teñidos para CD14 e IL-10 intracelular. Selección de eventos sencillos (a), Selección de área correspondiente a CMSP por tamaño y complejidad (b), y determinación de producción de IL-10 por monocitos positivos para CD14 (c).

Determinación de apoptosis

Después de 19 horas de estimulación o no con LPS y, en presencia o no de colágena IV íntegra o fragmentada, se realizó el marcaje de las células para la determinación de muerte por apoptosis, utilizando el kit para la detección de apoptosis, PacificBlue Annexin V Apoptosis Detection Kit I, (BD[®] Biosciences, San José, CA, USA). En células apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina es translocado desde la cara intracelulara hacia la extracelular de la membrana plasmática, lo que ocurre antes de la fragmentación de la membrana plasmática y otros organelos. Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca²⁺ que tiene alta afinidad por fosfatidilserina. En células con membranas íntegras (no permeabilizadas artificialmente o con grados mejores de daño en la membrana plasmática) la unión de anexina V indica que la célula está en apoptosis, ya que se translocó fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana de éstas. Al agregar el marcador vital como 7-amino-actinomicina (7-ADD), se puede diferenciar a las células en apoptosis temprana (Anexina V+ 7-ADD-).

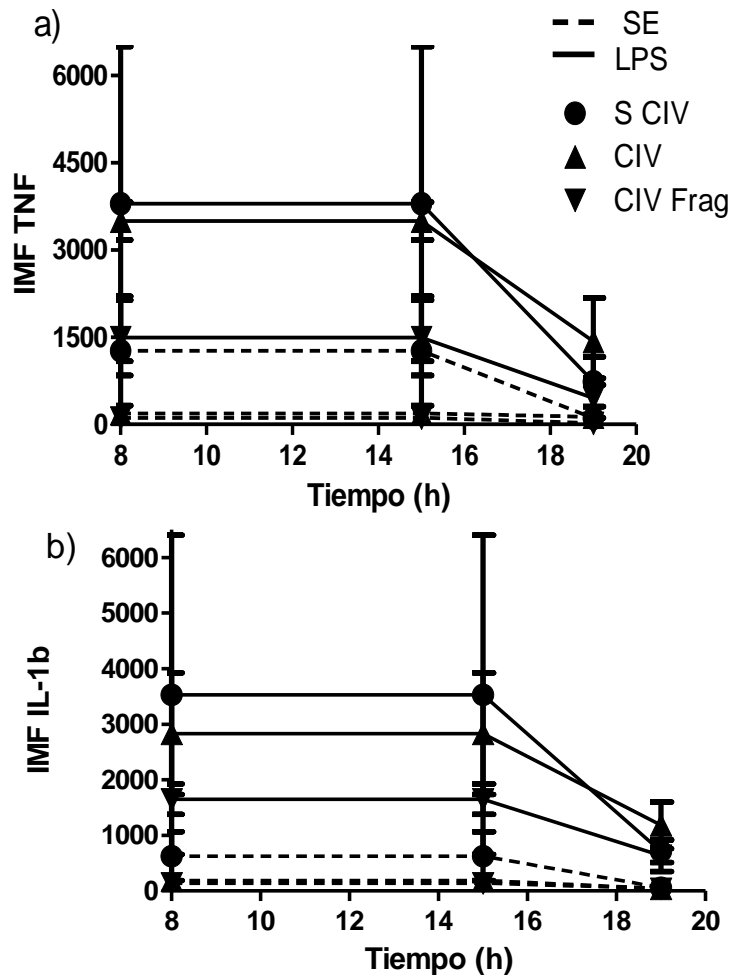
Las células en cultivo fueron lavadas dos veces con PBS frío y resuspendidas en amortiguador de unión (1X) y se transfirieron 100 µL a un tubo de tinción y se agregó 5 µL de anexina V acoplado a PE y 5 µL de 7-Amino-Actinomicina (7-AAD). Se agitaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después del tiempo de incubación se agregaron 400 µL de amortiguador de unión a cada tubo y se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria (BD[®] Biosciences, San José, CA, USA) que cuenta con el software FACSDiva versión 6.0 para Windows. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Infinicyt[®] de Cytognos.

Análisis estadístico

Todos los valores obtenidos, se sometieron a la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, con prueba de Dunn a posterior; $p < 0.05$. Utilizando GraphPad Prism[®] versión 5.0 para Windows[®] (GraphPad Software Inc).

Resultados

Como se puede observar en la figura 4, Col IV disminuye la secreción de las citocinas inflamatorias TNF e IL-1 β (Figura 4a y 4b). Para IL-6 no observamos diferencias significativas (aunque sí tendencia a mayor producción en las expuestas a Col IV) entre las diferentes condiciones analizadas. Además, como se puede observar en la figura 5 Col IV fragmentada aumenta la secreción de IL-10 de CMSP estimuladas con LPS desde las 8 horas, con aumento significativo observado a las 19 horas respecto a la condición sólo con estímulo de LPS.



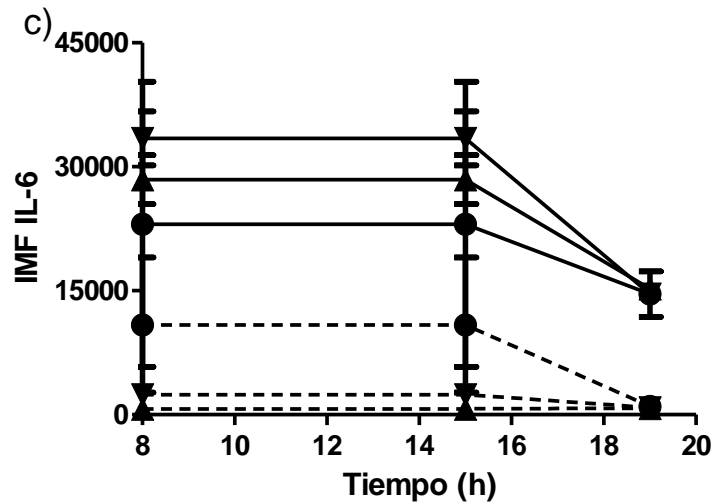


Figura 4. Colágena IV fragmentada disminuye la secreción de citocinas inflamatorias. CMSP fueron incubadas o no (●) en presencia de recubrimiento de Col IV, íntegra (▲) o fragmentada con colagenasa (▼), y estimulada o no (---) con LPS(—). Posterior a 8, 15 y 19 horas de incubación al sobrenadante obtenido se determinó la concentración de TNF(a), IL-β(b) y TNF(c), a través del sistema CBA. La concentración de las citocinas se representa como la intensidad media de fluorescencia (IMF). n=3

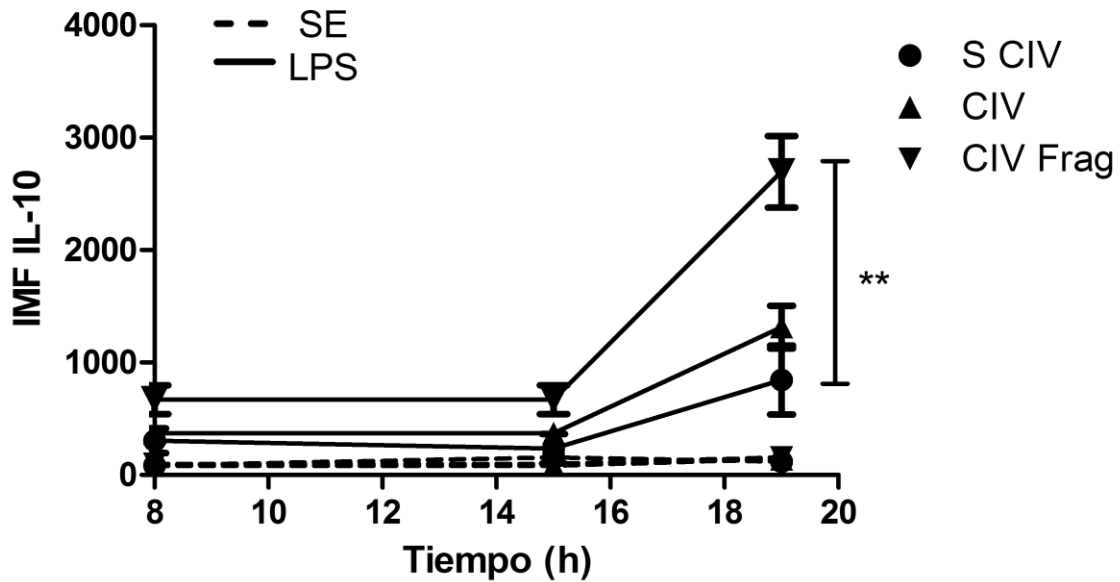


Figura 5. Colágena IV incrementa significativamente la secreción de IL-10 en CMSP estimuladas con LPS. CMSP fueron incubadas o no (●) en presencia de recubrimiento de Col IV, íntegra (▲) o fragmentada con colagenasa (▼), y estimulada o no (---) con LPS(—). Posterior a 8, 15 y 19 horas de incubación al sobrenadante obtenido se determinó la concentración de IL-10 a través del sistema CBA. La concentración de IL-10 se representa como la intensidad media de fluorescencia (IMF). n=3

Para determinar si los monocitos son los productores de IL-10 y los responsables de las diferencias observadas en la secreción de IL-10, se realizó la determinación intracelular de la misma mediante citometría de flujo. Como se puede observar en las gráficas de puntos de la figura 6a, el contacto con colágena IV fragmentada, tiende a aumentar de cantidad de IL-10 detectada en monocitos de CMSP estimuladas con LPS (IMF; CIV Frag+LPS = 497.03 ± 10.18 , CIV+LPS = 308.00 ± 8.81 , LPS = 384.85 ± 19.18) (Figura 6a y 6b).

Además, de manera interesante, observamos que el contacto de colágena IV fragmentada previenen la disminución espontánea de CD14 que en la superficie de los monocitos (IMF; CIV Frag+LPS = 1119.04 ± 163.44 , CIV+LPS = 855.82 ± 189.04 , LPS = 898.54 ± 226.62) (Figura 6a y 6c).

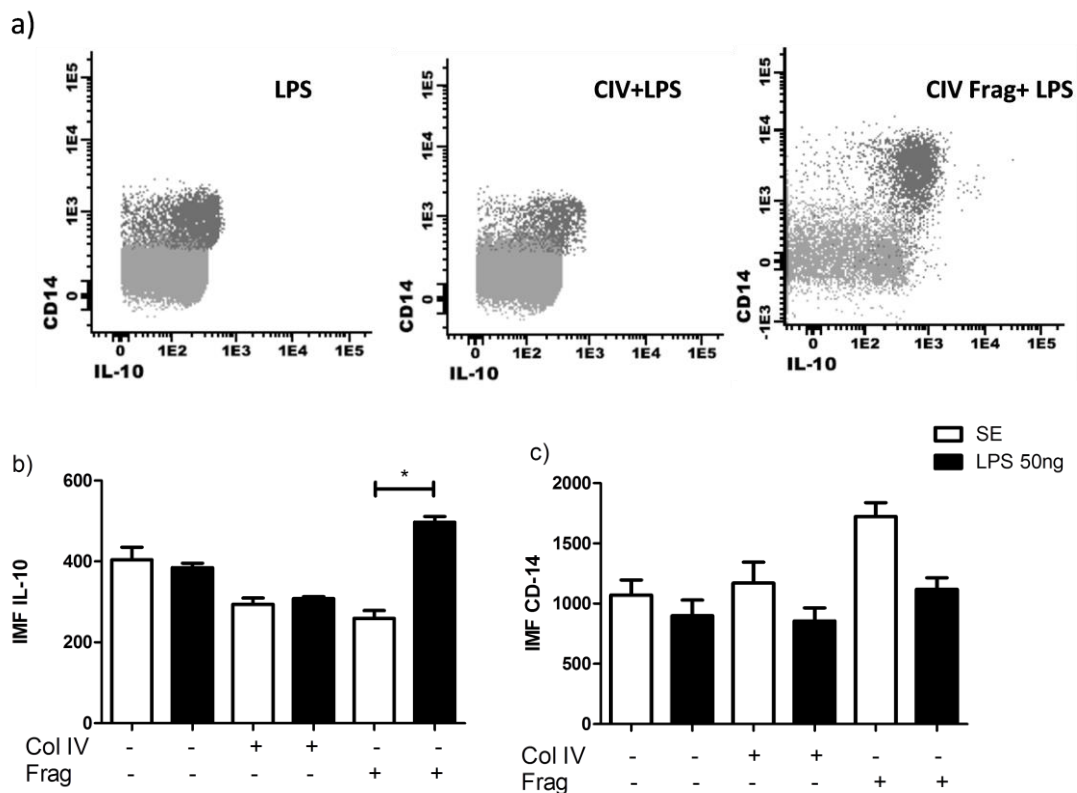


Figura 6. Colágena IV fragmentada, aumenta la capacidad de síntesis de IL-10 y evita la disminución espontánea de CD14 en monocitos de CMSP estimuladas con LPS. CMSP fueron incubadas o no en presencia de recubrimiento de Col IV, íntegra o fragmentada con colagenasa, y estimuladas o no con LPS. Posterior a 19 horas de incubación las CMSP fueron expuestas a brefeldina A y monensina durante 4 horas y se determinó la síntesis de IL-10 (a) en monocitos mediante la expresión positiva de CD14 (b) en la superficie. n=3

Por otro lado, considerando que IL-10 puede ser inducido por células apoptóticas⁹¹, y de acuerdo a reportes previos que indican que el reconocimiento de colágenas por monocitos requiere de moléculas de adhesión, como las integrinas que pueden activar señales de estimulación de ciclo celular e inhibición de apoptosis⁵⁷, evaluamos la inducción de apoptosis por la colágena IV íntegra o fragmentada. Como se puede observar; el porcentaje de CMSP en estado apoptótico no se modifica por las diferentes condiciones de estimulación (Figura 7a). Se encontraron las siguientes proporciones: SE = $9.85 \pm 2.00\%$, LPS = $15.90 \pm 4.68\%$, CIV= $10.78 \pm 2.73\%$, CIV+LPS= $13.12 \pm 2.74\%$, CIV Frag= $13.59 \pm 3.34\%$, CIV+LPS= $8.17 \pm 5.10\%$. El mismo comportamiento se observa en monocitos en estado apoptótico (Figura 7b). Se encontraron las siguientes proporciones: SE = $51.79 \pm 25.55\%$, LPS = $66.11 \pm 16.93\%$, CIV= $63.47 \pm 28.36\%$, CIV+LPS= $61.92 \pm 4.41\%$, CIV Frag= $74.17 \pm 2.18\%$, CIV+LPS= $43.09 \pm 30.13\%$.

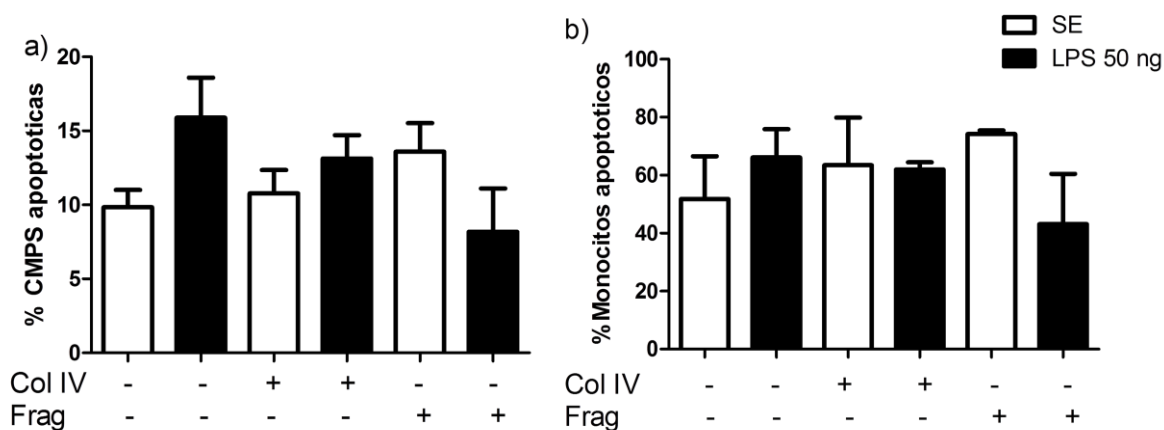


Figura 7. Col IV, íntegra o fragmentada no modifica el porcentaje de muerte por apoptosis en CMSP (a), ni en monocitos de CMSP (b), estimuladas con LPS. CMSP fueron incubados o no en presencia de recubrimiento de Col IV, íntegra o fragmentada con colagenasa, y estimulada o no con LPS. Posterior 19 horas de incubación se realizó una tinción para la determinación de muerte celular por apoptosis en CMSP y monocitos utilizando un kit para la detección de apoptosis, PE Annexina V Apoptosis Detection Kit I. Los resultados positivos para apoptosis se muestran en porcentaje. n=3.

Discusión

La inflamación es un proceso inducido por la lesión o la presencia de agentes biológicos en algún tejido vascularizado¹. Se propone que las cascadas de eventos resultantes tienen como principal objetivo resolver la infección, así como contener y reparar el daño para restablecer el estado de homeostasia¹². Dicho proceso involucra la activación y reclutamiento de leucocitos desde la circulación, donde tienen que atravesar la barrera endotelial, así como los elementos que conforman la arquitectura del tejido como la MEC⁶⁶. La MEC es una compleja red de glicoproteínas cuya composición varía entre los tejidos y depende del tipo y distribución de sus componentes. Colágena tipo IV constituye el 80% de las proteínas que componen a la lámina basal que rodea la pared de los vasos sanguíneos⁹². Dado que los leucocitos migrantes deben atravesar esta pared de los vasos sanguíneos, entran entonces en contacto con Col IV. Se ha reportado que el reconocimiento de proteínas de MEC (como fibrina y elastina) induce en leucocitos tanto de humanos como de ratón, la expresión de moléculas de adhesión, activación de integrinas y expresión de MMPs^{50, 93}. También se ha reportado que el contacto con MEC genera resistencia a la apoptosis en leucocitos infiltrantes a tejido⁹⁴. En algunos sistemas, como en macrófagos y monocitos de ratón se ha reportado que la activación de las integrinas modifica la capacidad de respuesta ante estímulos inflamatorios⁹⁵⁻⁹⁷. En trabajos recientes en el laboratorio⁸¹, observamos que el contacto con Col IV favorece la secreción de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica humana. Aunque no quedaba claro cuál de estas CMSP; monocitos, linfocitos o incluso NKs, eran las principales responsables de la producción de esta citocina, así como sí el efecto era a través del reconocimiento de la Col IV, íntegra o fragmentada, ya que el sistema utilizado consistía en tiempos de incubación prolongados, suficientes para poder activar los sistemas de degradación de matriz por leucocitos.

Para este trabajo cuantificamos diferentes citocinas secretadas por CMSP expuestas a Col IV, íntegra y fragmentada con colagenasa IV. A fin de establecer si la secreción de IL-10 se relacionaba con un patrón de citocinas pro o anti-inflamatorio, además cuantificamos las concentraciones de IL-1 β , TNF e IL-6.

Como se observa en la figura 4, el contacto con Col IV, íntegra y fragmentada, con estímulo de LPS, tiende a disminuir los niveles de IL-1 β y TNF detectados en el sobrenadante de CMSP, lo cual se da al mismo tiempo que incrementos significativos de IL-10 cuando CMSP están en contacto con Col IV fragmentada con estímulo de LPS (figura 5), esto sugiere que, efectivamente, el reconocimiento de Col IV fragmentada favorece una respuesta de inflamación contenida, más asociada con los estados de contención de la inflamación indispensables en la reconstitución de tejidos⁹⁸. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las integrinas, pueden modificar las vías de señalización que estimulan la producción de citocinas inflamatorias a través de ligandos de PRRs^{95, 99, 100}. Además las células pueden inhibir la producción de las mismas a través de factores solubles de manera parácrina³¹. Por otro lado, se sabe que la inhibición de la síntesis de TNF e IL-1 β en diferentes líneas celulares como macrófagos y DCs, depende de la inhibición de la transcripción del factor nuclear κ B (NF- κ B)³⁶, por lo que es factible que Col IV fragmentada inhiba la producción de citocinas por un mecanismo dependiente de NF- κ B^{41, 44}.

En nuestro modelo se encontró un aumento significativo en la producción de IL-10 de CMSP en contacto con Col IV fragmentada, no así en contacto con Col IV íntegra (figura 5). Estas diferencias entre la producción de IL-10 con Col IV íntegra o fragmentada, pueden deberse al reconocimiento de los fragmentos de Col IV por moléculas como la EBP, presente en varios tipos celulares, incluyendo leucocitos. Este receptor reconoce motivos de X-Gly-X-X-Pro.Gly (XGXXPG), presentes en varios componentes de la MEC¹⁰¹⁻¹⁰³. Se sabe que péptidos derivados de elastina disminuyen la respuesta de monocitos estimulados con LPS, posiblemente por efectos en la señalización de sus receptores, como CD14 y TLR-4¹⁰⁴. Por otro lado, este resultado puede también estar relacionado con el hecho de que péptidos altamente flexibles, es decir, pobres en aminoácidos como prolina, disminuyen la secreción de citocinas inflamatorias¹⁰⁵. Es factible que los péptidos que se generan por la acción de la colagenasa IV en nuestro sistema sean de este tipo. Con nuestras evidencias no podemos descartar los mecanismos parácrinos o de señalización para la disminución de las citocinas inflamatorias, lo cual

requeriría de futuros estudios.

Comprobamos que las células que en nuestro sistema producen la IL-10 detectada en los sobrenadantes son los monocitos, o sea, CMSP CD14+ son los eventos positivos a IL-10 (Figura 6a y b). Concordantemente a lo observado a la determinación de esta citocina en sobrenadante, su producción en monocitos es mayor cuando las células se coincuban con la Col IV fragmentada, remarcando así a los monocitos como células capaces de controlar la respuesta inflamatoria aguda¹⁰⁶.

Aunado a las modificaciones en la migración, y la respuesta inflamatoria, la MEC puede modificar el fenotipo de los leucocitos, e inducir, por ejemplo, la expresión de PRRs, receptores de complemento o receptores Fc para anticuerpos⁹⁶. En este trabajo, mostramos que la disminución espontánea de CD14 que se ha reportado ocurre en la superficie de monocitos activados¹⁰⁷, es “prevenida” por la exposición a fragmentos de Col IV (Figura 6c). Con estos resultados no podemos descartar que CD14 no se escinda de la superficie de las células, o que el resultado que observamos corresponda a menor síntesis *de novo*; sin embargo, existen reportes de que IL-10 puede incrementar la expresión de éste marcador¹⁰⁸, que pueden ayudar a tratar de explicar el por qué se mantiene la expresión de CD14 sin cambio respecto al estímulo. Las implicaciones en el incremento de PRRs fagocíticos como CD14 y los receptores de complemento anteriormente mencionados, pueden estar encaminadas a incrementar la capacidad de fagocitosis, junto a la producción de IL-10, que, nuevamente, es factible que se relacione con eventos de contención de la respuesta inflamatoria a favor de la restauración de los tejidos⁹⁸.

El incremento en la secreción de IL-10 puede ser consecuencia del estado de viabilidad de las células. En estudios de cultivos de CMSP, se ha reportado que la presencia de células apoptóticas induce la producción de IL-10 en monocitos al coestimularse con LPS¹⁰⁹. Para descartar que el aumento de la producción de IL-10 se relacionara con menor cantidad de células viables, exploramos la viabilidad celular, así como el mecanismo de muerte celular programada en las células de nuestro sistema experimental. Como se muestra en la figura 7a y 7b, no

encontramos diferencias en la proporción de células viables y/o apoptóticas en las diferentes condiciones que utilizamos. Interesantemente, se ha reportado que los monocitos pueden presentar apoptosis espontánea, y que esto se ha correlacionado directamente con la producción de transcritos de IL-10 e inversamente con los de IL-1 β y TNF- α ¹⁰⁹. En nuestro sistema este no es el caso, lo cual probablemente se relaciona con que en el trabajo citado, se utilizaron cultivos de monocitos humanos altamente enriquecidos y, en nuestro sistema utilizamos todas las CMSP humana, lo cual disminuye los procesos de manipulación de las células, previos al reto con LPS.

La activación de la respuesta inmune en los leucocitos que interaccionan con la MEC, no solo está dada por la secreción de citocinas^{78, 79} o modificación en el fenotipo de superficie^{55, 57}, en un futuro podrían explorarse aspectos como la generación de moléculas antimicrobianas, quimiotácticas, factores de coagulación, procesamiento y presentación de antígenos, interacción intercelular o diferenciación a otras células, por ejemplo, los monocitos modificados pueden diferenciarse a macrófagos o DCs, lo que podría tener implicaciones en la respuesta inmune adaptativa⁵.

Nuestros hallazgos sugieren que la Col IV, además de ayudar a la migración de leucocitos, puede regular la capacidad inflamatoria de los mismos de manera autócrina y/o parácrina. Estos resultados ayudan a entender el comportamiento de los leucocitos en condiciones normales, y profundizar en el tema permitiría esclarecer algunos de los mecanismos que desencadenan o perpetúan enfermedades crónicas donde se ha observado que existen alteraciones en los componentes de la MEC o las moléculas que la reconocen, como es el caso de la psoriasis, aterosclerosis, lupus o artritis reumatoide^{105, 110-112}.

Conclusión

El reconocimiento de colágena IV fragmentada, aumenta la producción de IL-10 de manera que modula y contiene la respuesta inflamatoria de monocitos humanos estimulados con LPS.

Referencias.

1. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **140**, 771-776 (2010).
2. Ana L. Alessandri a, L.P.S.b., c, Christopher D. Lucas a, Adriano G. Rossi a, Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutic* (2013).
3. Graeme B. Ryan, M., BS, PhD, and Guido Majno, MD Acute Inflammation. *American Journal of pathology* **86**, 183-276 (1977).
4. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435 (2008).
5. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74-80 (2010).
6. Skrzeczynska-Moncznik, J. *et al.* Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian journal of immunology* **67**, 152-159 (2008).
7. Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A. & Ziegler-Heitbrock, H.W. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* **87**, 373-377 (1996).
8. Weber, C. *et al.* Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* **67**, 699-704 (2000).
9. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology* **6**, 173-182 (2006).
10. Wiktor-Jedrzejczak, W. & Gordon, S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiological reviews* **76**, 927-947 (1996).
11. Barton, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation* **118**, 413-420 (2008).
12. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846-852 (2002).
13. Blasius, A.L. & Beutler, B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305-315 (2010).
14. Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. & Ezekowitz, R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318 (1999).
15. Blander, J.M. & Sander, L.E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature reviews. Immunology* **12**, 215-225 (2012).
16. Bianchi, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1-5 (2007).
17. Lee, C.C., Avalos, A.M. & Ploegh, H.L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature reviews. Immunology* **12**, 168-179 (2012).
18. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* **30**, 16-34 (2011).
19. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* **2**, 675-680 (2001).

20. Kawai, T. & Akira, S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *Journal of biochemistry* **141**, 137-145 (2007).
21. Pober, J.S. & Sessa, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews. Immunology* **7**, 803-815 (2007).
22. Potnis, P.A., Dutta, D.K. & Wood, S.C. Toll-like receptor 4 signaling pathway mediates proinflammatory immune response to cobalt-alloy particles. *Cellular immunology* **282**, 53-65 (2013).
23. Laird, M.H. *et al.* TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* **85**, 966-977 (2009).
24. Neurath, M.F. *et al.* Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* **859**, 149-159 (1998).
25. Cao, S., Zhang, X., Edwards, J.P. & Mosser, D.M. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry* **281**, 26041-26050 (2006).
26. Galkina, E. & Ley, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annual review of immunology* **27**, 165-197 (2009).
27. Hollingsworth, J.W., Siegel, E.R. & Creasey, W.A. Granulocyte survival in synovial exudate of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory joint diseases. *The Yale journal of biology and medicine* **39**, 289-296 (1967).
28. Nathan, C. Epidemic inflammation: pondering obesity. *Mol Med* **14**, 485-492 (2008).
29. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444 (2008).
30. Carl Nathan1, * and Aihao Ding1,2 Nonresolving Inflammation. *Cell* **140**, 871-882 (2010).
31. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G. & de Vries, J.E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine* **174**, 1209-1220 (1991).
32. DeForge, L.E. & Remick, D.G. Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochemical and biophysical research communications* **174**, 18-24 (1991).
33. Li, C., Corraliza, I. & Langhorne, J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice. *Infection and immunity* **67**, 4435-4442 (1999).
34. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* **19**, 683-765 (2001).
35. Kamanaka, M. *et al.* Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* **25**, 941-952 (2006).
36. Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B. & Baldwin, A.S., Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31868-31874 (1999).

37. Samarasinghe, R. *et al.* Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **26**, 893-900 (2006).
38. Pengal, R.A. *et al.* Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt. *Molecular Immunology* **43**, 1557-1564 (2006).
39. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
40. Gerard, C. Complement C5a in the sepsis syndrome--too much of a good thing? *The New England Journal of Medicine* **348**, 167-169 (2003).
41. Lynn Williams, G.J., † Alexandra Smith, † and Peter Finan † IL-10 expression profiling in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **72**, 800-809 (2002).
42. Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X. & Phillips, D.M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine* **178**, 449-460 (1993).
43. Liao, F. *et al.* Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *The Journal of Experimental Medicine* **182**, 1337-1343 (1995).
44. Kevin N. Couper, D.G.B., 1 and Eleanor M. Riley 2 IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology* **180**, 5771-5777 (2008).
45. Bixel, B.r.P.a.M.G. Molecular events during leukocyte diapedesis. *Molecular Biomedicine, Institute of Cell* **273** (2006).
46. Muller, W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* **24**, 327-334 (2003).
47. Newman, P.J.N.a.D.K. Signal Transduction Pathways Mediated by PECAM-1 : New Roles for an Old Molecule in Platelet and Vascular Cell Biology. *Journal of the American Heart Association*, 953-964 (2003).
48. Martin-Padura, I. *et al.* Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* **142**, 117-127 (1998).
49. Georg Ostermann, K.S.C.W., Alma Zerneck, Andreas Schröder, Christian Weber JAM-1 is a ligand of the β 2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature Immunology* **3**, 151-158 (2002).
50. Sorokin, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature reviews. Immunology* **10**, 712-723 (2010).
51. Alan R. Schenkel, Z.M., Xia Chen, Ronald M. Liebman and William A. Muller CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature Immunology* **3**, 143-150 (2002).
52. Marelli-Berg 2, S.N.a.F.M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *TRENDS in Immunology* **26**, 157-165 (2005).
53. Dangerfield, J., Larbi, K.Y., Huang, M.T., Dewar, A. & Nourshargh, S.

- PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *The Journal of experimental medicine* **196**, 1201-1211 (2002).
54. Gaggar, A. *et al.* A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. *J Immunol* **180**, 5662-5669 (2008).
 55. Poitevin, S., Garnotel, R., Antonicelli, F., Gillery, P. & Nguyen, P. Type I collagen induces tissue factor expression and matrix metalloproteinase 9 production in human primary monocytes through a redox-sensitive pathway. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **6**, 1586-1594 (2008).
 56. DeSimone, T.R.a.D.W. The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Dev Biol* **341**, 126-140 (2010).
 57. Adair-Kirk, T.L. & Senior, R.M. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1101-1110 (2008).
 58. Duca, L., Floquet, N., Alix, A.J., Haye, B. & Debelle, L. Elastin as a matrikine. *Critical reviews in oncology/hematology* **49**, 235-244 (2004).
 59. Tran, K.T., Griffith, L. & Wells, A. Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **12**, 262-268 (2004).
 60. Whittaker, C.A. *et al.* The echinoderm adhesome. *Dev Biol* **300**, 252-266 (2006).
 61. Ozbek, S., Balasubramanian, P.G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P. & Adams, J.C. The evolution of extracellular matrix. *Mol Biol Cell* **21**, 4300-4305 (2010).
 62. Egeblad, M., Rasch, M.G. & Weaver, V.M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current opinion in cell biology* **22**, 697-706 (2010).
 63. Schaefer, L.S.R.M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* **339**, 237-246 (2010).
 64. Jaehyuk Choi, D.R.E., Kian Peng Koh, Stephen L. Shiao, Jordan S. Pober T LYMPHOCYTE-ENDOTHELIALCELL INTERACTIONS. *Annu. Rev. Immunol* (2004).
 65. HANNU JA" RVELA" INEN, A.S., MARKKU KOULU, THOMAS N. WIGHT, AND RISTO PENTTINEN Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* **61**, 198-223 (2009).
 66. Christian Frantz¹, K.M.S.a.V.M.W., 2 The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* **123**, 4195-4200 (2010).
 67. Kilchherr, E., Hofmann, H., Steigemann, W. & Engel, J. Structural model of the collagen-like region of C1q comprising the kink region and the fibre-like packing of the six triple helices. *Journal of molecular biology* **186**, 403-415 (1985).
 68. Gordon, M.K. & Hahn, R.A. Collagens. *Cell Tissue Res* **339**, 247-257 (2010).

69. PERSIKOV, B.B.A.A.V. MOLECULAR STRUCTURE OF THE COLLAGEN TRIPLE HELIX. *ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY* **70** (2005).
70. Tropoelastin Steven G. Wise, Anthony S. Weiss*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 494-497 (2009).
71. Muller, W.E. Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Die Naturwissenschaften* **85**, 11-25 (1998).
72. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687 (2002).
73. Huhtala, P. *et al.* Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol* **129**, 867-879 (1995).
74. Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A. & Liddington, R. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**, 631-638 (1995).
75. Voigt, S. *et al.* Distribution and quantification of alpha 1-integrin subunit in rat organs. *The Histochemical journal* **27**, 123-132 (1995).
76. Kern, A., Eble, J., Golbik, R. & Kuhn, K. Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. *European journal of biochemistry / FEBS* **215**, 151-159 (1993).
77. Heino, J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **19**, 319-323 (2000).
78. Yoshida, H. *et al.* Fibronectin inhibits cytokine production induced by CpG DNA in macrophages without direct binding to DNA. *Cytokine* **60**, 162-170 (2012).
79. Beezhold, D.H. & Personius, C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. *J Leukoc Biol* **51**, 59-64 (1992).
80. McKee, C.M. *et al.* Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *The Journal of clinical investigation* **98**, 2403-2413 (1996).
81. JA, S.L. (Universidad La Salle, México, D.F.; 2008).
82. JR, M., Vol. Trabajo de investigación cuasiexperimental (Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F.; 2009).
83. Paulina, J.U.A. (Univesidad Autónoma de México, 2010).
84. Haas, T.L., Davis, S.J. & Madri, J.A. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **273**, 3604-3610 (1998).
85. Chang, E.Y., Guo, B., Doyle, S.E. & Cheng, G. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol* **178**, 6705-6709 (2007).
86. Byrne, A. & Reen, D.J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol* **168**, 1968-1977 (2002).
87. Jang, S., Uematsu, S., Akira, S. & Salgame, P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly

- dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol* **173**, 3392-3397 (2004).
88. Sing, A. *et al.* Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *The Journal of experimental medicine* **196**, 1017-1024 (2002).
 89. Gabrysova, L. *et al.* Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. *The Journal of experimental medicine* **206**, 1755-1767 (2009).
 90. Bollyky, P.L. *et al.* ECM components guide IL-10 producing regulatory T-cell (TR1) induction from effector memory T-cell precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 7938-7943 (2011).
 91. Ren, Y. *et al.* Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* **180**, 4978-4985 (2008).
 92. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **3**, 422-433 (2003).
 93. Ronziere, M.C. *et al.* Integrin alpha1beta1 mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. *Biochimica et biophysica acta* **1746**, 55-64 (2005).
 94. Streuli, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Current opinion in cell biology* **11**, 634-640 (1999).
 95. Yee, N.K. & Hamerman, J.A. beta(2) integrins inhibit TLR responses by regulating NF-kappaB pathway and p38 MAPK activation. *European journal of immunology* **43**, 779-792 (2013).
 96. Newman, S.L. & Tucci, M.A. Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. *The Journal of clinical investigation* **86**, 703-714 (1990).
 97. Flick, M.J. *et al.* Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *The Journal of clinical investigation* **113**, 1596-1606 (2004).
 98. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871-882 (2010).
 99. Means, T.K. & Luster, A.D. Integrins limit the Toll. *Nature immunology* **11**, 691-693 (2010).
 100. Han, C. *et al.* Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nature immunology* **11**, 734-742 (2010).
 101. Senior, R.M. *et al.* Neutrophils show chemotaxis to type IV collagen and its 7S domain and contain a 67 kD type IV collagen binding protein with lectin properties. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **1**, 479-487 (1989).
 102. Duca, L. *et al.* The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 subunit. *The Journal of biological chemistry* **282**, 12484-12491 (2007).
 103. Tatano, Y. *et al.* Elastogenesis in cultured dermal fibroblasts from patients with lysosomal beta-galactosidase, protective protein/cathepsin A and

- neuraminidase-1 deficiencies. *The journal of medical investigation : JMI* **53**, 103-112 (2006).
104. Baranek, T. *et al.* Elastin receptor (spliced galactosidase) occupancy by elastin peptides counteracts proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through NF-kappaB down-regulation. *J Immunol* **179**, 6184-6192 (2007).
 105. Thomas, A.H., Edelman, E.R. & Stultz, C.M. Collagen fragments modulate innate immunity. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 406-411 (2007).
 106. Grainger, J.R. *et al.* Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nature medicine* **19**, 713-721 (2013).
 107. Bosshart, H. & Heinzelmann, M. Spontaneous decrease of CD14 cell surface expression in human peripheral blood monocytes ex vivo. *J Immunol Methods* **368**, 80-83 (2011).
 108. Sandanger, O. *et al.* IL-10 enhances MD-2 and CD14 expression in monocytes and the proteins are increased and correlated in HIV-infected patients. *J Immunol* **182**, 588-595 (2009).
 109. Bzowska, M. *et al.* Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes. *European journal of immunology* **32**, 2011-2020 (2002).
 110. Henson, P.M. Dampening inflammation. *Nature immunology* **6**, 1179-1181 (2005).
 111. Koivukangas, V. *et al.* Increased collagen synthesis in psoriasis in vivo. *Archives of dermatological research* **287**, 171-175 (1995).
 112. MacPherson, M., Lek, H.S., Prescott, A. & Fagerholm, S.C. A systemic lupus erythematosus-associated R77H substitution in the CD11b chain of the Mac-1 integrin compromises leukocyte adhesion and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* **286**, 17303-17310 (2011).