



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DE NOD2 EN
MACRÓFAGOS TOLERIZADOS POR EXPOSICIÓN
PREVIA A LPS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IVONNE HERNÁNDEZ GIRÓN



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL
2014**



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.

Hoja de datos del Jurado

1.- Datos del alumno

Hernández
Girón
Ivonne
50 44 09 93
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307086006

2.- Datos del tutor.

Dra.
Esmeralda
Juárez
Carvajal

3.- Datos del Sinodal 1

Dra.
Martha
Torres
Rojas

4.- Datos del Sinodal 2

Dr.
Sigifredo
Pedraza
Sánchez

5.- Datos del Sinodal 3

Dra.
Silvia
Guzmán
Beltrán

6.- Datos del Sinodal 4

Dra.
Paula María del Carmen
Figueroa
Arredondo

7.- Datos del trabajo escrito

Papel de la activación de NOD2 en macrófagos tolerizados por exposición previa a LPS.
47 p
2014

AGRADECIMIENTOS

Mil gracias a mis padres y hermanas por su apoyo, cada quién a su manera.

Gracias infinitas a mi asesora la Dra. Esmeralda por su enseñanza, apoyo y paciencia en la elaboración de este trabajo.

Gracias a Sergio por tener siempre la disposición de ayudarme y por rescatar mi computadora múltiples veces!, y porque junto con Silvia me sobran los momentos inolvidables desde el CCH, aunque hayamos tomado caminos diferentes siempre serán mis mejores amigos.

A Eduardo por todo el apoyo, palabras de aliento y cariño que me das.

Gracias Ana (prima) porque a pesar de haberte conocido en una etapa final y ya no convivir mucho, estar contigo es de las cosas más agradables que me pueden pasar.

A mis amig@s Edith, Grisel, Laura y Antonio que han estado y sé que estarán siempre escuchándome, aconsejándome, pasando un buen rato y además porque de ustedes sigo aprendiendo muchísimas cosas, gracias!.

A mis amigos y colegas con los que trabajé en equipo dentro y fuera de los laboratorios, a quienes conocí fuera del salón de clase y a quienes terminé conociendo y haciendo una gran amistad en las prácticas de campo a todos ustedes muchas gracias por compartir momentos agradables conmigo.

Contenido

	Págs.
Lista de figuras	i
Lista de abreviaturas	ii
Resumen	iii
Antecedentes	I
1.- Respuesta inmune innata	I
2.- Inflamación	7
3.- Regulación de la activación del TLR4	10
4.- Propuesta de estudio	11
Hipótesis	14
Objetivos	14
Métodos	15
Obtención de monocitos de sangre periférica	15
Diferenciación celular de MDMs en M1, M2 y Tolerizados	15
Evaluación del fenotipo de MDMs por citometría de flujo	16
Determinación de TNF α por ELISA	17
Análisis Estadísticos	18
Resultados	19
Discusión	31
Conclusión	35
Anexo	36
Referencias	37

Lista de Abreviaturas

DC	Célula Dendrítica
NK	Natural killer
IFN γ	Interferón γ
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
RRP	Receptor de reconocimiento de patrones
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
TLR	Receptores tipo Toll
NLR	Receptores tipo NOD
NOD	Receptores con dominio de oligomerización
RIG-I	Receptor intracelular de reconocimiento I
SNP	Polimorfismos de nucleótidos simples
IRF	Factores de regulación de interferón
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MDP	Muramildipéptido
IRAK	Receptor de interleucina asociado a cinasas
LPS	Lipopolisacárido
MMP	Metaloproteína de la matriz
SR-A	Receptor scavenger de clase A
IL	Interleucina
miRNA	Micro RNA

Lista de figuras

Pág.

Figura 1	Células del sistema inmune innato	2
Figura 2	Vías de señalización de NOD2 y TLR4	6
Figura 3	Complejo estructural de LPS y TLR4	7
Figura 4	Producción de TNF α en macrófagos alveolares y monocitos	13
Figura 5	Inducción de tolerancia	19
Figura 6	Producción de TNF α en células sin diferenciar y células tolerizadas.	20
Figura 7	Expresión de marcadores en células tolerizadas.	23
Figura 8	Fenotipo M1 y M2.	25
Figura 9	Fenotipo de macrófagos tolerizadas.	26
Figura 10	Polarización del fenotipo en respuesta a una estimulación.	28
Figura 11	Cambio en IMF en macrófagos tolerizados.	29

RESUMEN

El sistema inmune innato proporciona una respuesta inmediata a la infección y la lesión y está mediada principalmente por células que incluyen macrófagos, células dendríticas (DCs) y neutrófilos. La detección de agentes microbianos está mediada por receptores de reconocimiento de patrones moleculares que inducen una respuesta inflamatoria posterior al reconocimiento.

La activación del proceso inflamatorio es crucial para la eliminación del agente infeccioso que la desencadenó, pero es un proceso que si se presenta en exceso es peligroso para el hospedero. Uno de los mecanismos de control del proceso inflamatorio es la insensibilización de los macrófagos que sigue a una exposición a lipopolisacárido (LPS), este fenómeno es mejor conocido como tolerancia y desempeña un papel importante en la protección del hospedero ante el daño causado por la inflamación excesiva. A pesar de esta ventaja, la insensibilización del macrófago representa un riesgo de incapacidad de responder a infecciones subsecuentes.

En el presente trabajo se estudió por ELISA la producción de TNF α en respuesta a la estimulación de NOD2 a través de su ligando muramildipéptido (MDP) en macrófagos tolerizados con LPS, al mismo tiempo por citometría de flujo se caracterizó con un perfil de marcadores de superficie si los macrófagos pertenecían a un fenotipo pro-inflamatorio (M1) o anti-inflamatorio (M2) después de la adición de MDP, LPS y conjuntamente LPS y MDP. Nuestros resultados muestran que los macrófagos tolerizados presentan un fenotipo pro-inflamatorio que se ve reflejado en la expresión de los marcadores de superficie CD14+, CD209- y DECTIN1- a pesar de la disminución significativa de TNF α . La adición de MDP (ligando de NOD2) no restableció en los macrófagos tolerizados la producción de TNF α y las modificaciones en la expresión de marcadores membranales no fueron significativas.

Serán necesarias futuras investigaciones para caracterizar las moléculas que contribuyen a los mecanismos de regulación positiva y negativa de funciones de los macrófagos que permitan contemplar nuevos enfoques para restaurar la respuesta protectora después de la tolerización y evitar las complicaciones causadas por infecciones secundarias.

ANTECEDENTES

I. Inmunidad innata

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa para los organismos que poseen un sistema inmune adaptativo (Gack, Baril et al. 2013), proporciona una respuesta inmediata a la infección y a la lesión, está mediada principalmente por poblaciones celulares como macrófagos, células dendríticas (CDs), células natural killer y células polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) (Pollard y Kono 2013), así como componentes solubles que incluyen péptidos antibacterianos (defensinas, catelicidinas), proteínas del complemento, TNF α , IL-1, IL-12, IL-8 e IL-6 (Peñate, 2001).

I.1 Células del sistema inmune innato

Los componentes celulares de la inmunidad innata comprenden en gran medida a las células mieloides (Figura 1). Las células mieloides incluyen fagocitos mononucleares y polimorfonucleares, los fagocitos mononucleares incluyen a los macrófagos derivados de monocitos, células dendríticas y monocitos (Beutler 2004). Gran parte de estas células del sistema inmune innato tienen cierta capacidad de ser autónomos, como los neutrófilos que pueden erradicar bacterias *in vitro* sin embargo han evolucionado para funcionar mejor en combinación con las células y proteínas del sistema inmune adaptativo (Beutler 2004).

Macrófagos

Los macrófagos no son una población uniforme de células, son morfológicamente diversos dependiendo del tejido del que forman parte, por ejemplo las células de Kupffer formando las paredes del sinusoides hepático y la célula de la microglía del sistema nervioso central son morfológicamente diferentes. Funcionalmente, los macrófagos presentan actividades de inicio y término de la respuesta innata asociadas a su fenotipo (Benoit, Desnues et al. 2008).

Células del Sistema Inmune Innato

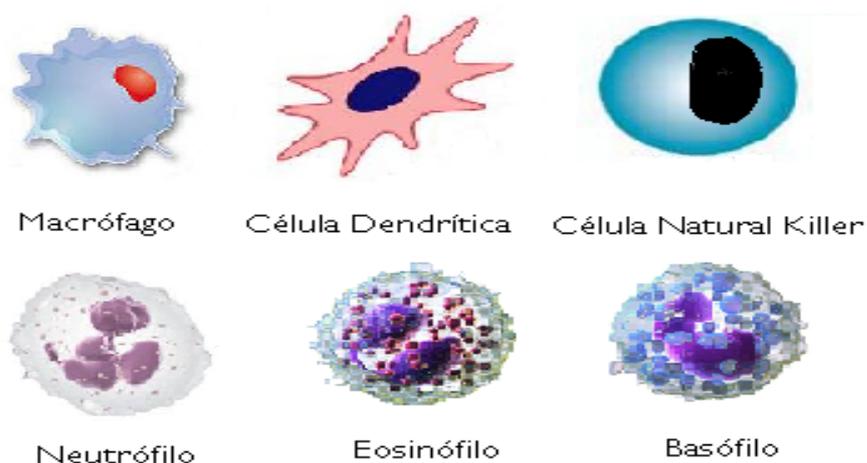


Figura 1. **Células del sistema inmune innato.** La inmunidad innata es un sistema de defensa conservado e inespecífico, son la primera línea de defensa ante microorganismos a algún agente extraño al cuerpo, su importancia está en que brindan una respuesta protectora inicial llegando a erradicar por completo patógenos y estimulando la inmunidad adaptativa.

Así, los macrófagos que tienen la función de fagocitar, erradicar microorganismos y supervisar a través de la producción de citocinas quimiotácticas, promoviendo el reclutamiento de otras células mieloides y la presentación de antígeno, se encuentran caracterizados por los marcadores membranales CD14, CD16, CCR7 y CD62L (Benoit, Desnues et al. 2008), estos macrófagos se denominan clásicamente activados o M1, y por otro lado aquellos macrófagos que realizan funciones para detener la respuesta inflamatoria, fagocitar los restos de la remodelación o daño tisular asociados a la inflamación y reparación de tejidos caracterizados por los marcadores membranales CD209, CD36, CD163, DECTINI y CCR2 se denominan alternativamente activados, o M2 (Rajaiah, Perkins et al. 2013).

Células Dendríticas

Las células dendríticas derivan de la médula ósea, tienen una variedad de formas desde las células de Langerhans o las células del bazo, su función principal es fagocitar y presentar antígeno, interactúan con otras células como natural killer (NK) y juegan un papel importante en la inmunidad humoral ya que interactúan directamente con células B para la expansión y diferenciación de células T cooperadoras CD4+ (Cui, Yang et al. 2013; Palucka y Banchereau 2012).

Polimorfonucleares

Los fagocitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) son de importancia para la contención de una infección, los neutrófilos son células de corta duración, sobreviven alrededor de 6h antes de someterse a apoptosis y hay alrededor de 5000 por cada mm^3 de sangre en condiciones basales pero este número puede elevarse de 5 a 10 veces en una infección severa. Los eosinófilos y basófilos producen mediadores inflamatorios y en comparación con los neutrófilos se encuentran en menor cantidad (Beutler 2004).

Células natural killer

Las células natural killer (NK), reconocen y matan a células dañinas rápidamente, producen citocinas como el interferón γ (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), las células NK son una población heterogénea que puede ser dividida en diferentes estadios que están caracterizados por la expresión de marcadores de superficie como CD34, CD117, CD94, CD56 y CD3 (Fu, Wang et al. 2011)

1.2 Receptores del sistema inmune innato

El sistema inmune innato es un mecanismo de defensa evolutivamente conservado desde plantas hasta el hombre. Este sistema reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). La erradicación de microorganismos patógenos por el hospedero es fundamental para la supervivencia de organismos multicelulares. La detección de agentes microbianos está dada por estructuras conservadas únicas del patógeno y por medio de distintas familias de receptores como por ejemplo los receptores tipo toll (Toll like receptors por sus siglas en inglés) y los tipo NOD (NOD- like receptors por sus siglas en inglés) (Kim, Park et al. 2008).

Los patrones moleculares presentes en los microorganismos patógenos presentan propiedades comunes: son característicos de los microorganismos y no se encuentran presentes en las células del huésped; estas características permiten al sistema inmune innato distinguir entre antígenos propios y extraños y son invariables, lo que permite que con un número limitado de PRR se detecte la presencia de cualquier patógeno (Moreno,

2003). Los PRR responden a PAMPs como ácidos nucleicos bacterianos y virales, lipoproteínas, hidratos de carbono y moléculas derivados del daño celular, principalmente durante la necrosis (Pollard y Kono 2013).

Los PRR de la respuesta inmune innata incluyen receptores como los tipo toll like receptors (TLRs), tipo NOD- like receptors (NLRs) o RIG-I-like receptor (RIG-I) (Pollard y Kono 2013). Los TLRs son los receptores transmembranales mejor conocidos y son los encargados de reconocer PAMPs de una gran variedad de microorganismos, en respuesta estos producen inflamación. Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 están en la superficie celular y reconocen estructuras únicas de bacterias, hongos y parásitos mientras que los TLRs intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) reconocen ácidos nucleicos virales y bacterianos (Yu, Ha et al. 2012).

Los NLRs (receptores intracelulares con dominio de oligomerización por nucleótidos, NOD) tienen un papel fundamental en la inmunidad innata. En humanos hay 22 NLR conocidos y asociados a mutaciones y a polimorfismos de nucleótidos simples (SNP), además de estar implicados en la inmunidad también tienen funciones en la reproducción y el desarrollo embrionario (Zhong, Kinio et al. 2013).

El reconocimiento por parte de los receptores PRR resulta en la activación de diferentes vías de señalización intracelular y la activación de factores de transcripción como NF- κ B y factores de regulación de IFN α (IRF) que inducen la expresión de citocinas y quimiocinas, lo que conduce al reclutamiento de células que promueven inflamación y la expresión de moléculas co-estimuladoras cruciales para la inducción de la inmunidad adaptativa (Pollard y Kono 2013; Gack, Baril et al. 2013).

1.3 NOD2

NOD2 es un miembro de la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR), cuyos miembros comparten una estructura que consiste en un péptido de reconocimiento que está en el extremo C terminal y tiene cadenas repetidas ricas en leucina (LRR), un dominio central NOD y un dominio en el extremo N terminal donde interactúan proteína-proteína y se encuentra codificado por el gen CARD15, contiene dos dominios CARD (dominio de reclutamiento asociado a caspasas). El dominio LRR es la región de reconocimiento de PAMPs (Strober y Watanabe 2011).

NOD2 es un receptor intracelular que puede reconocer y reaccionar a componentes del peptidoglicano como el muramil dipéptido (MDP) en bacterias gram negativas, esta unión con MDP es de alta afinidad. (Watanabe, Kitani et al. 2004; (Zhong, Kinio et al. 2013). La habilidad de NOD2 de actuar como un receptor intracelular de MDP sugiere que tiene la función de activar la respuesta inmune innata en respuesta a componentes bacterianos (Watanabe, Kitani et al. 2004).

1.4 TLR4

Los receptores tipo toll (TLRs) son los principales receptores en las células del sistema inmune y tienen un papel importante en la inmunidad innata, se conocen 13 tipos de TLRs en humanos y ratón, siendo el TLR4 uno de los más estudiados (Liu, Xu et al. 2013).

Las vías de señalización de los TLR se inicia por la dimerización de los receptores, estos pueden formar homodímeros como el TLR4 o heterodímeros como TLR1 y TLR2. Todos los TLR con excepción de TLR3, utilizan la proteína adaptadora MyD88 (Figura 2).

En la activación del receptor, MyD88 es reclutado a través de la interacción de su dominio TIR (receptor Toll/IL-1) y el TLR esto permite el reclutamiento y la activación de una familia de cinasas del tipo IRAKs (IL-1 receptor asociado a cinasas) 1, 2 y 4 (Liew, Xu et al. 2005).

IRAK4 es reclutado por el primer complejo (TLR-Myd88) que se activa y fosforila a IRAK1, estas cinasas interactúan con MyD88 en un dominio que tienen en común el llamado "dominio de muerte" que conduce a la activación de TRAF6 (receptor asociado con TNF). La interacción del complejo compuesto por NEMO (modulador esencial del NF- κ B), TAK1 (MAP cinasa) y dos proteínas TAB1 y TAB2 con TRAF6 es esencial para que pueda darse la señalización de NF- κ B. TAK1 también implica la activación de JNK, p38 y ERN para fosforilar a AP-1 e inducir la transcripción de genes pro inflamatorios (Liew, Xu et al. 2005).

La activación de otras cinasas, incluyendo el inhibidor NF- κ B (I κ B) y las cinasas I κ k α e I κ k β tiene como resultado la liberación de NF- κ B de p50 y p65 esto permite al NF- κ B translocarse al núcleo y e inducir la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias (Liu, Xu et al. 2013).

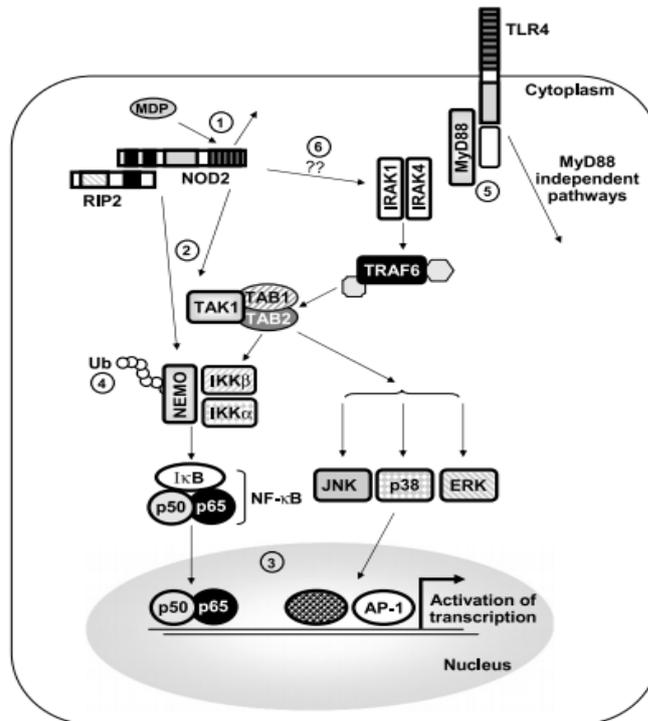


Figura 2. **Vías de señalización de NOD2 y TLR4.** NOD2 es activado por el reconocimiento del componente del peptidoglicano MDP (1); este reconocimiento desencadena una cascada de señalización que comienza con la molécula adaptadora Rip2 o TAK1 (2) y culmina con la translocación al núcleo del NF- κ B (3-4). TLR4 en respuesta al reconocimiento de su ligando (LPS) activa una cascada de señalización que inicia con la molécula adaptadora MyD88 (5) y también culmina con la translocación al núcleo del NF- κ B y otros factores nucleares como AP-1. En ambos casos la activación genera la transcripción de genes de la respuesta inmune innata. La relación entre ambas vías en señalización todavía no se esclarece (6) (Takao 2009).

Los receptores tipo toll (TLRs) son los principales receptores en las células del sistema inmune y tienen un papel importante en la inmunidad innata, se conocen 13 tipos de TLRs en humanos y ratón, siendo el TLR4 uno de los más estudiados (Liu, Xu et al. 2013).

El TLR4 es activado por lipopolisacárido (LPS), un constituyente de la membrana externa de las bacterias gram negativas (Dobrovolskaia y Vogel 2002), también está implicado en el reconocimiento de varias moléculas asociadas a patógenos como virus y bacterias (Figura 3) (Fujiharaa, Muroi et al. 2003).

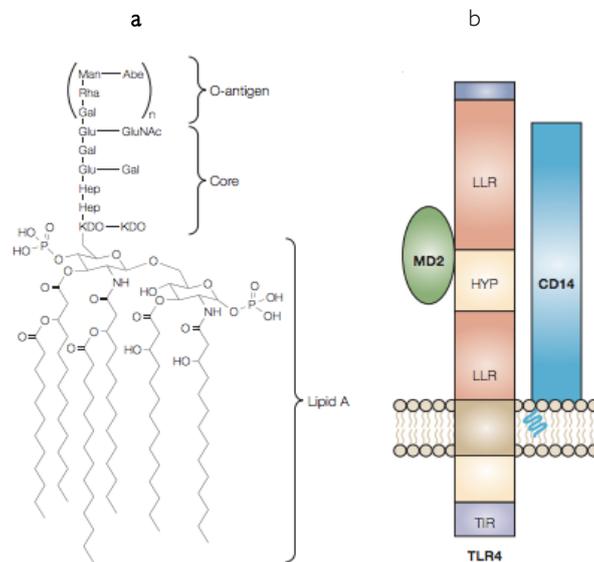


Figura 3. **Complejo estructural del LPS y TLR4.** (a) Estructura del LPS, formada de una región de antígeno O, un núcleo también conocido como core y el lípido A. (b) Componentes del complejo receptor TLR4–MD2–CD14, el TLR4 consta de un dominio TIR, repeticiones ricas en leucina (LLR) y una región hipervariable (HYP) (Miller, Ernst et al. 2005).

2. Inflamación

El sistema inmune se encarga de eliminar microorganismos patógenos o al tejido deteriorado cuando existe una infección o algún daño tisular. Las primeras células en llegar al sitio dañado son los neutrófilos y los macrófagos que desencadenan un proceso fisiológico denominado inflamación (Vodovotz 2011).

Las características de la inflamación se han definido desde la época de los griegos por: calor, dolor, rubor y tumor que son producidos por citocinas pro inflamatorias tales como $TNF\alpha$, IL-1 e IL-6 (Domínguez 2009).

Las citocinas son factores solubles producidos por células del sistema inmune innato y tienen la función de regular el crecimiento y maduración de los distintos tipos celulares que participan en el proceso inflamatorio, por otra parte las quimiocinas son reconocidas por receptores específicos que se encuentran en la membrana de los elementos reclutados. Citocinas y Quimiocinas inician el proceso inflamatorio promoviendo la dilatación e incremento de la permeabilidad en vasos sanguíneos y aumentando la expresión de moléculas de adhesión como las integrinas en las paredes provocando que los neutrófilos y monocitos puedan migrar al sitio dañado (Domínguez, 2009).

Una vez en el sitio dañado los monocitos se diferencian a macrófagos y estos últimos en conjunto con los neutrófilos inician la fagocitosis. El sistema inmune innato utiliza como estrategia el reconocimiento de receptores membranales de tipo Toll (TLRs) que forman parte del grupo denominado patrones moleculares asociados al daño (DAMP por sus siglas en inglés) integrado por PAMPs, así la estimulación de los TLRs por moléculas DAMPs estimula la producción de procesos pro inflamatorios. El proceso inflamatorio se puede desencadenar en condiciones estériles y no estériles. Cuando hay trauma, por ejemplo, las células dañadas liberan patrones moleculares asociados al daño tisular (DAMPs) que también son reconocidos por receptores de la inmunidad innata. Si el proceso es infeccioso, no estéril los componentes microbianos (PAMPs) son los iniciadores de la respuesta (Domínguez, 2009).

2.1 Respuesta al reconocimiento de LPS

El lipopolisacárido (LPS) también llamado endotoxina es un componente estructural de la membrana de las bacterias gram negativas y uno de los más potentes iniciadores microbianos de la inflamación. El efecto que tiene el LPS sobre macrófagos *in vivo* e *in vitro* depende del régimen de la exposición, por ejemplo la exposición con LPS tanto *in vivo* como *in vitro* puede desencadenar el proceso inflamatorio que es crucial para que todas las funciones de la respuesta inmune se inicien. Pero es un proceso que si se presenta en exceso es peligroso para el hospedero (Pena, Pistolic et al. 2011).

2.2 Inflamación inducida por TLR4

La inflamación es una respuesta biológica compleja a los estímulos nocivos, tales como una infección microbiana y lesión de tejidos. Este proceso es rápido e implica un consumo importante de energía metabólica y un riesgo paralelo de daño tisular, falla multiorgánica y muerte. Uno de los estímulos más potentes que inducen inflamación, es el LPS (Jing, Yang et. 2013).

El lípido A es la estructura conservada del LPS y es la base estructural para la activación celular (Schroamm, Lien et al. 2001). El LPS activa a monocitos y macrófagos por medio de TLR4 para producir citocinas como TNF α , IL-1, e IL-6, que a su vez sirven

como mediadores endógenos de la inflamación a través de interacciones mediadas por sus receptores con diferentes células diana. La producción de citocinas es importante para el control eficiente del crecimiento y la difusión de los patógenos invasores (Dobrovolskaia y Vogel 2002).

La respuesta inflamatoria es necesaria para la eliminación de patógenos, algunas de las consecuencias de la inflamación son: la producción de mediadores como citocinas, óxido nítrico, radicales libres y metaloproteínas de la matriz (MMP's) (Gonzalez-Rey, Chorny et al. 2007), además se producen quimiocinas que específicamente reclutan poblaciones celulares como neutrófilos, monocitos y eosinófilos al sitio de infección para potenciar la respuesta inmune (Parks, Wilson et al. 2004).

2.3 Tolerancia inducida por LPS

Uno de los mecanismos de control del proceso inflamatorio exacerbado es la desensibilización de los macrófagos que sigue a una exposición previa a componentes de patógenos como el LPS. A este fenómeno se denomina "tolerancia" y consiste en la falta de respuesta de una célula después de una exposición inicial al estímulo en cuestión, en este caso de endotoxina (LPS) (Pena, Pistolic et al. 2011).

La tolerancia al LPS desempeña un papel importante en la protección del hospedero ante el daño potencial causado por la inflamación excesiva, con la estimulación repetitiva el macrófago se toleriza y esto se ve caracterizado por una supresión de la producción de citocinas proinflamatorias, una regulación positiva de genes anti-inflamatorios y el aumento de la fagocitosis (Jing, Yang et al. 2013).

2.4 Actividad patológica asociada al reconocimiento de LPS

En algunos casos se ha observado una inmunosupresión que se ve reflejada en disfunciones en monocitos y macrófagos (reducción en la producción de citocinas pro inflamatorias) asociados al aumento de infecciones nosocomiales en pacientes expuestos a infecciones bacterianas (Turrel-Davin, Venet et al. 2011).

La desensibilización ante el LPS es un mecanismo importante para proteger al hospedero de un choque séptico, esta tolerancia se ha reportado en varias enfermedades como por ejemplo: pancreatitis o en algunas cirugías (Biswas y Lopez-Collazo 2009)

En el hospedero, cuando hay un exceso de mediadores inflamatorios producidos por las células activados por LPS puede ocasionar inflamación sistémica y el síndrome de sepsis, una condición que amenaza la vida que se caracteriza por fiebre, hipotensión, comprometido el rendimiento cardíaco, coagulopatía, y daños en múltiples órganos (Schromm, Lien et al. 2001).

3. Regulación de la activación de TLR4

Cuando se ha producido la interacción del LPS con el TLR, la señalización de TLR puede ser controlada por reguladores intracelulares que pueden inhibir las vías de señalización de TLR, algunos de estos reguladores intracelulares están presentes constitutivamente en la activación de TLR a nivel fisiológico, mientras que otros son sobre regulados por la señalización del TLR durante la infección para atenuar la respuesta en un circuito de retroalimentación negativa (Liew, Xu et al. 2005).

3.1 Regulación positiva

Receptores como TLR4 y SR-A (receptor scavenger de clase A) se expresan en la superficie de macrófagos y células dendríticas, algunos estudios han demostrado que las interacciones entre TLR4 y SR-A responden a estímulos microbianos; es decir, el SR-A actúa como co-receptor del TLR4 para facilitar el reconocimiento y la respuesta inmune que resulta en una respuesta inflamatoria, además tienen sinergismo para mediar la fagocitosis ya que SR-A promueve la unión de LPS con su ligando TLR4, se ha comprobado que el sinergismo entre estos dos receptores es esencial para la producción de citocinas inflamatorias (Yu, Ha et al. 2012).

Por otra parte estudios con enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide también se ha observado sinergismo entre el receptor TLR4 y TLR2 para favorecer la expresión de IL5 en fibroblastos sinoviales (componente celular más importante en la membrana sinovial articular) (Jung, Cho et al. 2009).

3.2 Regulación negativa

La regulación de la respuesta inflamatoria también se produce mediante la reducción en la expresión de los TLR ya que al haber una regulación negativa dejan de transcribirse los genes de los TLR, si éste mecanismo de regulación negativa falla se activa la apoptosis para eliminar a las células (Liew, Xu et al. 2005).

Muchos mecanismos del control negativo para poder regular los efectos tóxicos por parte del LPS tienen que ver principalmente con los receptores como los TLR pero también incluyen proteínas que interfieren con la transducción de señales como MyD88-s3, IRAK-M4 y TAG5 (Sheedy, Palsson-McDermott et al. 2010)

El inhibidor del factor de transcripción NF- κ B produce una subunidad α (IkBa) para bloquear el factor de transcripción que se produce en exceso después de la estimulación con LPS. La producción de citocinas anti-inflamatorias también incluyen la vía de señalización de LPS incluyendo la Interleucina 10 (IL-10) que tiene efectos parácrinos con células vecinas y regula negativamente la acción de NF- κ B y citocinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-2. Productos no codificantes de RNA conocidos como micro RNA (miRNA) se han descrito para regular negativamente a proteínas como IRAK1 y TRAF6 a nivel post- transcripcional (Sheedy, Palsson-McDermott et al. 2010).

4. Propuesta de estudio

Existe una línea fina entre los beneficios de la respuesta inmune y el daño causado por el sistema inmune. La inflamación inducida por TLR4 se ha visto implicada en diversos desórdenes inflamatorios, por lo que es necesario que haya una regulación fina de la respuesta de TLR4 para mantener el balance inmunológico.

Esta regulación incluye la insensibilización de los macrófagos que han sido expuestos a LPS por una infección crónica. La reactivación de estos macrófagos es necesaria para la resolución de infecciones subsecuentes.

En este trabajo proponemos que esta reactivación podría ser estimulada farmacológicamente con el ligando de NOD2. El conocimiento de la interacción entre TLR4 y NOD2 es esencial para proponer estrategias de reactivación de la respuesta

inflamatorias que además favorezcan la respuesta antimicrobiana en macrófagos insensibilizados.

4.1 ¿NOD2 puede regular la actividad de TLR4?

1.-En trabajos previos se observó que la adición del ligando de NOD2 (MDP) ejerce un efecto modulador de la respuesta inflamatoria ($\text{TNF}\alpha$) dependiente de la activación de TLR4 (LPS) en macrófagos alveolares humanos (Figura 4).

2.-Macrófagos murinos tolerizados por infección con *E. coli* restauran su actividad antimicrobiana y pro inflamatoria cuando son estimulados con el ligando de NOD2 (MDP) (Kim, Park et al. 2008)

3.-La estimulación con LPS de macrófagos murinos deficientes en NOD2 genera una producción de citocinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$ e IL-6) excesiva, lo que sugiere un papel para NOD2 en la regulación de la señal de TLR4 (Kim, Kim et al. 2012)

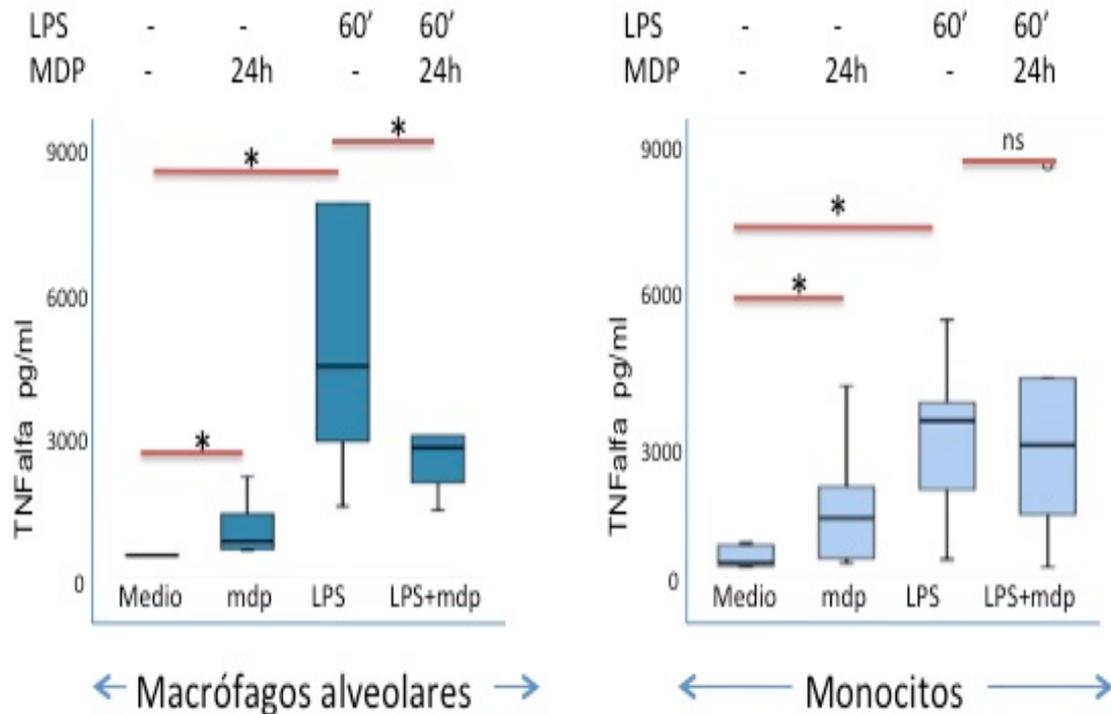


Figura 4. **Producción de TNF α en macrófagos alveolares y monocitos.** Se observa que el ligando de NOD2 (MDP) tiene una producción significativa en macrófagos alveolares y monocitos, al combinar los estímulos MDP y LPS continua una producción de TNF α en los macrófagos alveolares sin embargo en monocitos la respuesta deja de ser significativa (Nidia Lucio, no publicado).

4.2 Justificación

La tolerancia al LPS es un estado de hiperreactividad celular que se caracteriza por ausencia de producción de citocinas pro-inflamatorias. Este fenómeno es beneficioso hasta por dos semanas en pacientes con sepsis (Pena, Pistolic et al. 2011), sin embargo, la falta de respuesta en los macrófagos aumenta el riesgo de sucumbir ante un infección bacteriana secundaria (Kim, Park et al. 2008), por ello la importancia que tiene el poder modificar, por ejemplo con la adición del ligando de NOD2, el fenotipo de los macrófagos de un estado anti-inflamatorio (M2) a uno pro-inflamatorio (M1) cuya actividad antimicrobiana es deseable conservar, al menos a nivel local. La comprensión de cómo se regula la señalización de TLR4 facilitará el desarrollo de nuevas estrategias para el control de las enfermedades inflamatorias mediadas por TLR4.

HIPÓTESIS

La estimulación del receptor NOD2 con su ligando ejerce un efecto regulador negativo sobre la producción de TNF α en macrófagos tolerizados por exposición previa a LPS.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de la estimulación de NOD2 sobre la producción de TNF α y en el fenotipo de macrófagos tolerizados por exposición previa a LPS.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la estimulación de NOD2 sobre la producción de TNF α en macrófagos tolerizados con LPS.
- Evaluar la modulación de marcadores membranales de diferenciación en macrófagos tolerizados por comparación con macrófagos diferenciados con fenotipo M1 y macrófagos diferenciados con fenotipo M2.
- Determinar el efecto de la estimulación de NOD2 sobre la expresión del fenotipo pro-inflamatorio en macrófagos tolerizados con LPS.

MÉTODO

Obtención de monocitos de sangre periférica.

Se obtuvieron 8 paquetes celulares de donadores sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER). Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por gradientes de densidad sobre solución separadora de linfocitos (Lonza, Walkersville, MD) y se centrifugó a 1680 rpm por 30 min a temperatura ambiente, se recuperó el anillo celular correspondiente a las PBMC (monocitos y linfocitos) y se resuspendió en medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con 10mM de glutamina y 1mg/ml de gentamicina (Sigma) y se volvió a centrifugar a 1500 rpm por 10 min, eliminando el sobrenadante. Se recuperó el botón celular y se repitió el paso anterior 3 veces. El botón celular se resuspendió en 20 mL de RPMI (Lonza) con suero humano descomplementado (Valley) al 10% (en adelante me referiré a este medio simplemente como Medio) y se colocaron 10 mL de la suspensión celular en placas petri de cultivo de poliestireno (Costar) que se pusieron a incubar por 1h a 37° C a 5% de CO₂. Se eliminaron las células no adherentes y las adherentes se recuperaron mecánicamente con un levantador de células (Costar) y se resuspendieron en 5 mL de Medio. Se centrifugó a 1500 rpm a 4° por 10 min y se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer (superior Marienfeld, Germany). La viabilidad se determinó por exclusión de azul de tripano y en todos los casos fue superior al 98%. Se preparó una suspensión celular de trabajo de 1×10^6 células/ml de Medio y se sembraron 1×10^6 células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos para la diferenciación a macrófagos.

Diferenciación celular de MDMs en M1, M2 y Tolerizados.

Los macrófagos derivados de monocitos (MDM) se prepararon cultivando los monocitos durante 7 días en placas de baja adherencia. La insensibilización de macrófagos se realizó estimulando con 100 ng/mL de LPS (*E. coli* O:26, B6, Sigma, St. Louis, MO) seguido de una re-estimulación con 50 ng/mL a las 72h, los cultivos se incubaron otras 48h antes de realizar las diferentes estimulaciones. En algunos experimentos se requirió la generación de macrófagos polarizados hacia el fenotipo M1 y otros polarizados hacia el fenotipo M2. Para la diferenciación de macrófagos M1 se estimularon las células con 100 U/mL de IFN γ humano recombinante (R&D, Minneapolis, MN) el primer día y se re-estimularon a las

72h con 50U/mL de IFN γ ; para la diferenciación de macrófagos M2 se añadió al cultivo 40 ng/mL de IL-4 (R&D, Minneapolis, MN) seguida de una re-estimulación a las 72h con 20ng/mL de IL4. En ambos casos las células permanecieron 48h en incubación antes de proceder a la estimulación. Cada tipo celular se trató con 4 condiciones, estas son: sin estímulo (SE), MDP (10 μ g/mL) (Invivogen, San Diego, CA), LPS (100ng/mL) y LPS+MDP (100ng/mL y 10 μ g/mL) durante 24h y se recuperaron los sobrenadantes para la posterior evaluación de la producción de TNF α y las células para determinación de fenotipo.

Evaluación del fenotipo de MDM por citometría de flujo.

La detección de marcadores membranales de fenotipo se realizó por citometria de flujo, método que nos permite evaluar en células individuales la presencia de moléculas mediante el uso de anticuerpos específicos acoplados a distintos fluorocromos. Se utilizó un citómetro que permite la visualización de hasta 8 fluorocromos y en función de los mismos se realizó la tinción. Las células se tiñeron con 1 μ L de sonda de viabilidad azul para leerse en el detector de APC (Fixable Viability Dye eFluor 660, eBioscience) diluida 1:20 en DMSO (dimetil-sulfóxido, Sigma) y se incubó a 20 min a 4°C en oscuridad, las células se lavaron con 1 mL de PBS.

Las células se resuspendieron en 100 μ L de PBS y se añadió 10 μ L de bloqueador de los receptores Fc, se agitó y se dejó en reposo 2 min. Posteriormente se añadió 14 μ L de una mezcla de anticuerpos de reconocimiento de moléculas membranales; CD14 (Invitrogen, Carlsbad, CA), CD16 (Biolegend, San Diego, CA), CD163 (Biolegend, San Diego, CA), CD209 (Pharmingen, San José CA), DECTINI (Biolegend, San Diego, CA), CD36 (Biolegend, San Diego, CA), MR (Biolegend, San Diego, CA), CCR2 (Biolegend, San Diego, CA), CCR7 (Biolegend, San Diego, CA), y CD62L (Biolegend, San Diego, CA), en combinaciones apropiadas para un total de 8 marcadores por tubo. Se incluyeron tubos control sin tinción. Se incubó 20 min a 4° C en oscuridad, después de ello las células se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y las células se volvieron a resuspender en 200 μ L de PBS. Se llevó al citómetro protegido de la luz.

Al mismo tiempo de preparar las células se preparan los controles de compensación (1 por cada fluorocromo más un control negativo). Se colocó una gota de

perlas negativas en cada tubo del control negativo y una gota de perlas positivas (anti IgG de ratón, CompBeads, Pharmingen, San José, CA) en los tubos previamente marcados por fluorocromos, se agregó 0.2 μ L del anticuerpo acoplado al fluorocromo de la siguiente manera: CD14- PE-Texas Red-A, CD16-PECy7-A, CD163-APC-A, CD209-PE-A, CD36-PECy5-A, CD62L-APC-Cy7-A, DECTINI-Alexa Fluor488-A, MR-Alexa Fluor488-A, CCR2-PECy5-A, CCR7-APC-A, se incubó a 4°C por 20 min, al igual que las células se lavaron con 1 mL de PBS, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min se eliminó el sobrenadante y se volvió a resuspender en 200 μ L de PBS.

Se adquirieron de inmediato 50,000-100,000 eventos en un FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA) y se analizaron con el software FACSDiva (Becton Dickinson, San José, CA).

Determinación de TNF α por ELISA.

A partir del sobrenadante obtenido de la estimulación celular, se realizaron pruebas de ELISA para cuantificar la producción de TNF α . El ensayo por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) permite cuantificar la presencia de metabolitos solubles por medio de la captura y detección de la molécula de interés por anticuerpos específicos.

Los ensayos de ELISA se realizaron en placas Maxisorp (Nunc) de noventa y seis pozos, se añadió el anticuerpo de captura diluyendo 1:5000 de anti-TNF α humano (Pharmingen, San José, CA) con PBS (Solución amortiguadora de fosfatos, Lonza, Walkersville, MD) y se colocó 50 μ L en cada pozo de manera uniforme dejando la placa a 4° por 24h, se desechó la solución de anticuerpo y se lavó tres veces con una solución de lavado (PBS (0.01M, pH 7.2) con Tween-20 al 0.05% (Sigma), a continuación se añadió 100 μ L de superbloc (Pierce) y se incubó 30 min a 37° después de la incubación se lavo 3 veces con la solución de lavado y se colocaron las muestras; la curva de calibración se hizo con 6 diluciones (250 μ L a base de RPMI 1640 suplementado con suero 10%) para tener una concentración final de 62.5 pg/mL a partir de un stock inicial de 250 μ L de TNF α con 250 μ L de Medio que estaba a una concentración inicial de 2000 pg/mL, también se añadieron las muestras y blancos, todo por duplicado y se incubó 2h a 37°.

Se volvió a lavar con solución de lavado y se adicionó el anticuerpo secundario anti- TNF α biotinilado (1:1000 5 μ L de anticuerpo con 5 mL de solución de dilución de

anticuerpo (Tween-20 al 0.05% , PBS 0.01M, pH 7.2, BSA 2%) y se incubó a temperatura ambiente por 45 min posteriormente se lavó seis veces con solución de lavado y se añadió estreptavidina fosfatasa alcalina (Jackson) incubando por 30 min, se volvió a lavar 6 veces con la misma solución y se añadió el sustrato de fosfatasa (Sigma), este proceso se lleva a cabo en oscuridad aproximadamente 20 minutos para que desarrolle el color, la reacción se detuvo con NaOH 1M y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas (Multiscan) a 405 nm.

Se promediaron los valores de absorbancia de cada duplicado, se hicieron gráficas en función de la concentración y se calculó la ecuación de la recta y su coeficiente de regresión, se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras de acuerdo a la curva de referencia y se multiplicó por el factor de dilución según el caso. Los resultados se presentaron como pg/mL.

Análisis Estadísticos.

Se utilizó el software SPICE 5.3 para visualizar la frecuencia de células con marcadores específicos, para el análisis de los datos de TNF α y los cambios en la intensidad media de fluorescencia se utilizó SPSS 18. Los resultados se expresan como medianas \pm rango. Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La producción de TNF α de los macrófagos tolerizados ante una re-estimulación con LPS es significativamente menor que la de los macrófagos no estimulados.

La tolerancia se define como la pérdida en la capacidad de respuesta de una célula después de una exposición inicial a LPS, ésta tolerancia es un mecanismo de regulación para equilibrar la inflamación (Pena, 2012). Para comprobar que los macrófagos fueron tolerizados, se re-estimuló con LPS por 24h y se cuantificó la producción de TNF α en sus sobrenadantes. Los macrófagos no tolerizados produjeron 6112 pg/mL de TNF α (rango 2743 – 38300) mientras que la producción de TNF α por macrófagos tolerizados fue significativamente menor 685 pg/mL (rango 100 – 1416), $p < 0.05$ (Figura 5).

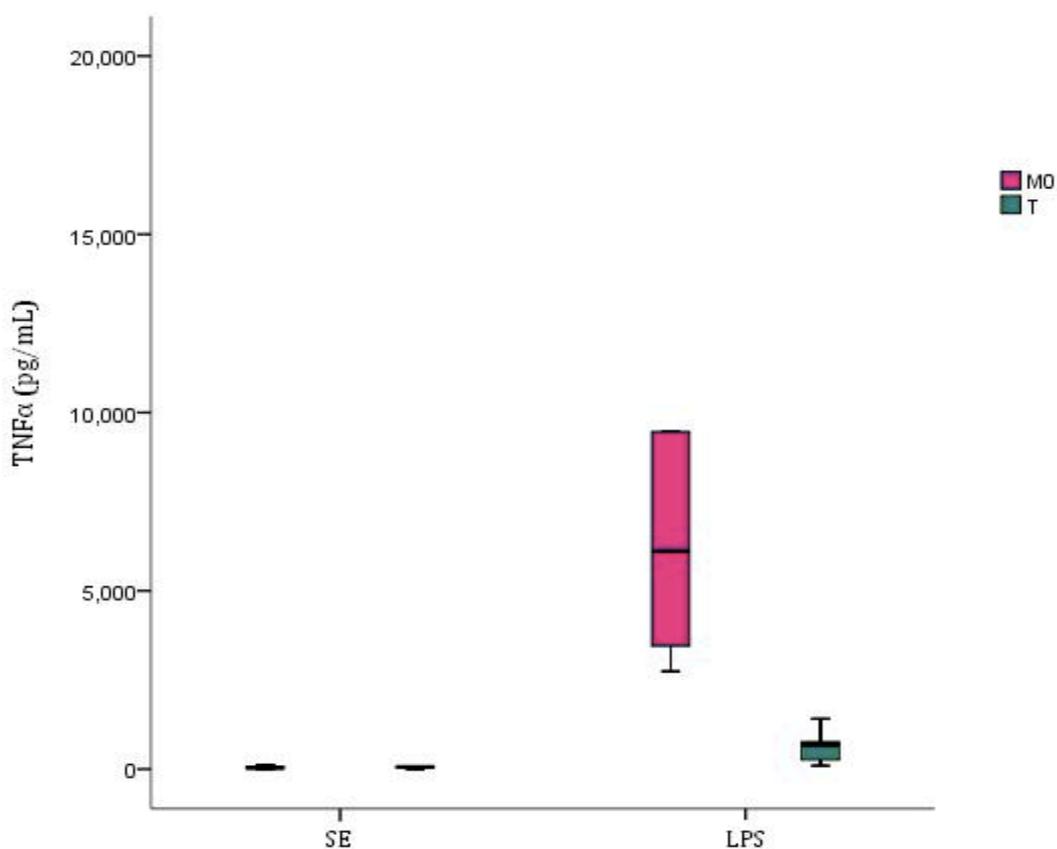
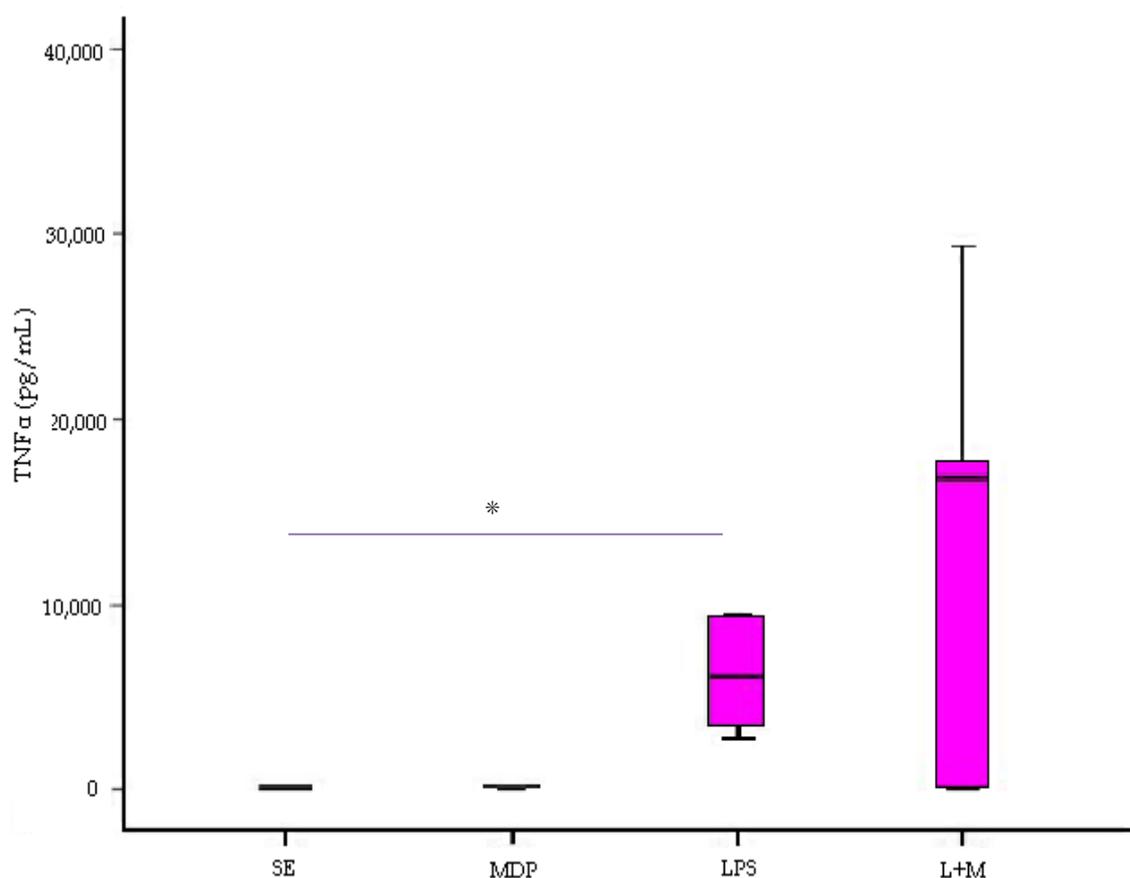


Figura 5. **Inducción de Tolerancia.** Macrófagos derivados de monocitos sin estimular (M0) y tolerizados (T) fueron estimulados con 100 ng/mL de LPS por 24h. La producción de TNF α se midió por ELISA. Se muestran gráficas de caja con medianas y cuartiles, $n=8$. * ($p < 0.03$).

La adición de MDP no induce producción de TNF α en macrófagos tolerizados

Para determinar el efecto de la estimulación de NOD2 sobre macrófagos tolerizados se añadió su ligando (MDP), también se estimuló adicionando MDP y LPS al mismo tiempo para establecer si los macrófagos tolerizados podrían restituir la producción de TNF α . Los macrófagos no tolerizados no produjeron TNF α con la adición de MDP, con LPS y MDP produjeron 16850 pg/mL (rango 2743–29400), mientras que los macrófagos tolerizados tuvieron una producción de TNF α con MDP de 97 pg/mL (rango 12.86–582.55) y significativa ($p < 0.03$) con MDP y LPS 200 pg/mL (rango 20 –1689) respecto a la condición sin estímulo (Figura 6).

Macrófagos no Tolerizados



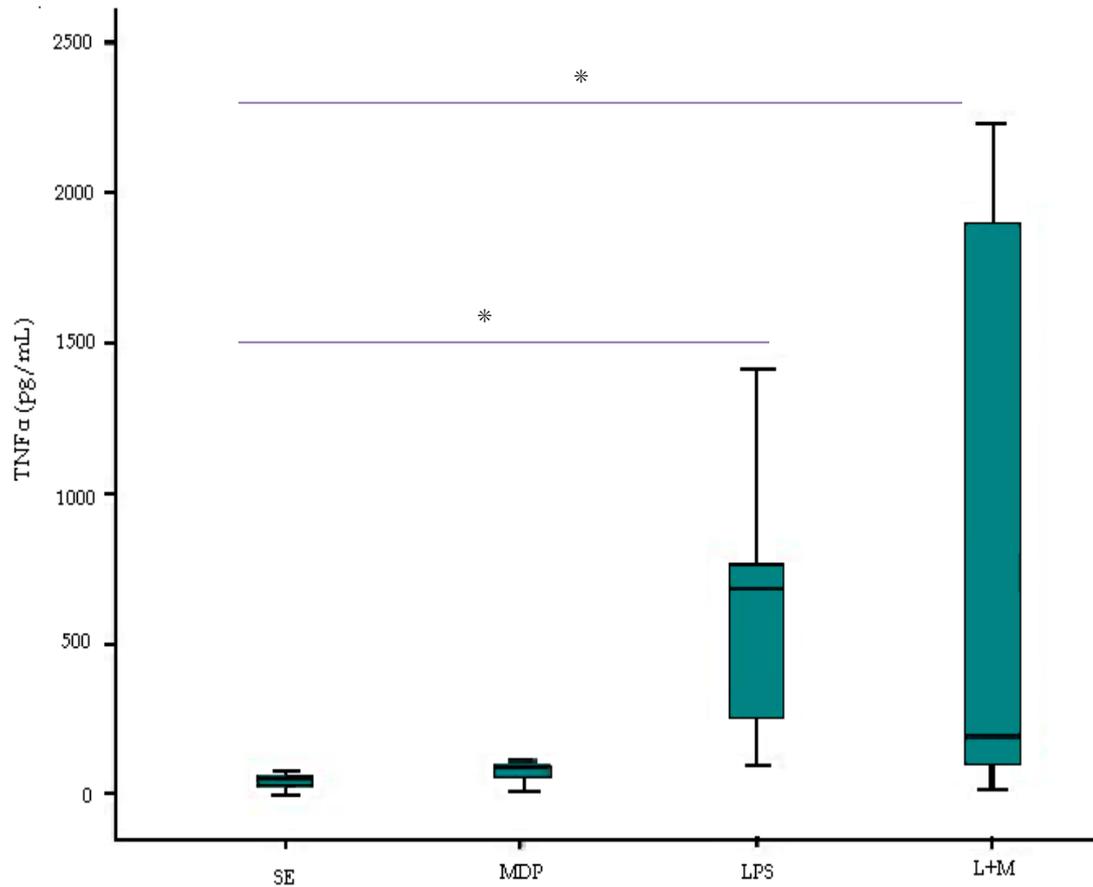
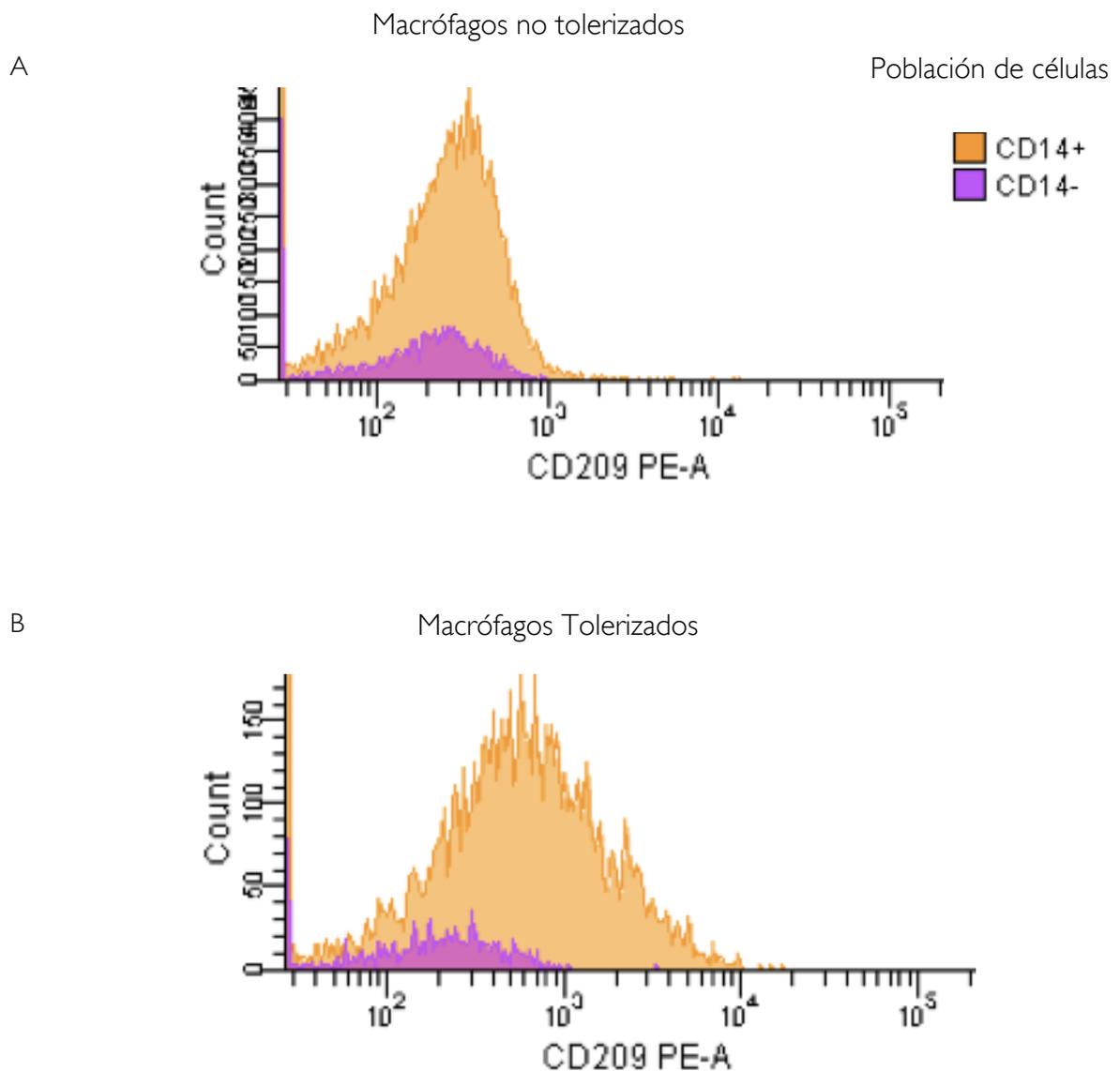


Figura 6. **Producción de TNF α en macrófagos no tolerizados y macrófagos tolerizados.** Macrófagos derivados de monocitos no estimulados (M0) y tolerizados (T) fueron estimulados con 10 μ g/ml de MDP, 100 ng/mL de LPS y con 10 μ g/mL de MDP y 100 ng/mL de LPS, se cuantificó la producción de TNF α por ELISA y se representaron en gráficas de caja con medianas y cuartiles, n=6.

Los marcadores de superficie correspondiente al fenotipo M2 se encuentran sobre expresados en macrófagos tolerizados

Para poder elaborar un panel que nos permitiera estudiar conjuntos de tres marcadores de superficie se graficó el cambio en la intensidad media de fluorescencia relativo a células no tolerizadas, los marcadores del fenotipo M2 (DECTINI, CD209, MR y CCR7) resultaron más expresados, con esto se determinó el perfil de marcadores.



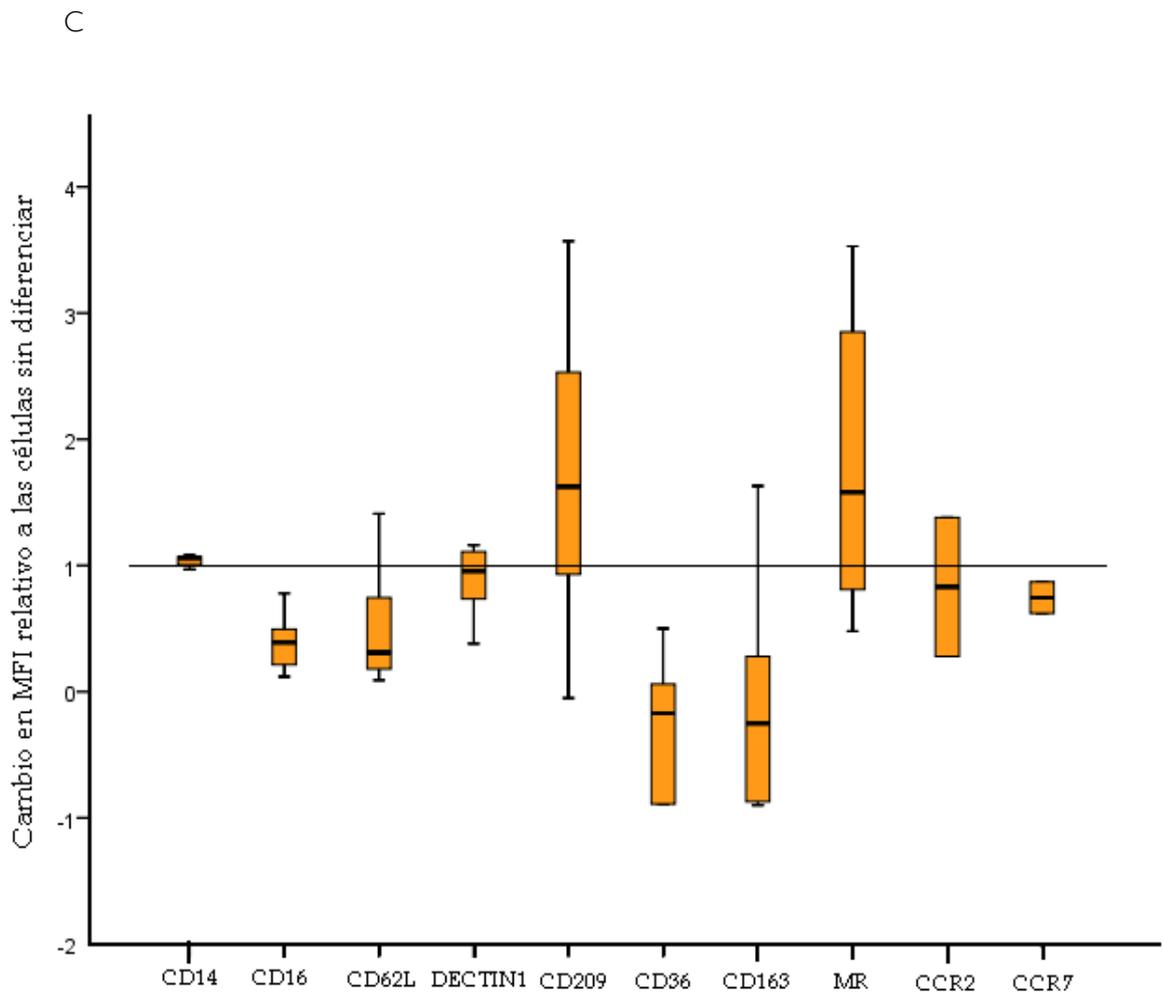


Figura 7. **Expresión de marcadores en Células Tolerizadas.** Para establecer el fenotipo se seleccionaron los marcadores M1 (CD14, CD16, CD62L y CCR2) y M2 (DECTIN1, CD209 y MR y CCR7) , los marcadores M2 se encuentran sobre expresados (A Y B) por lo que se seleccionaron 3 marcadores (CD14, DECTIN1 y CD209) para evaluar el perfil de los macrófagos (C).

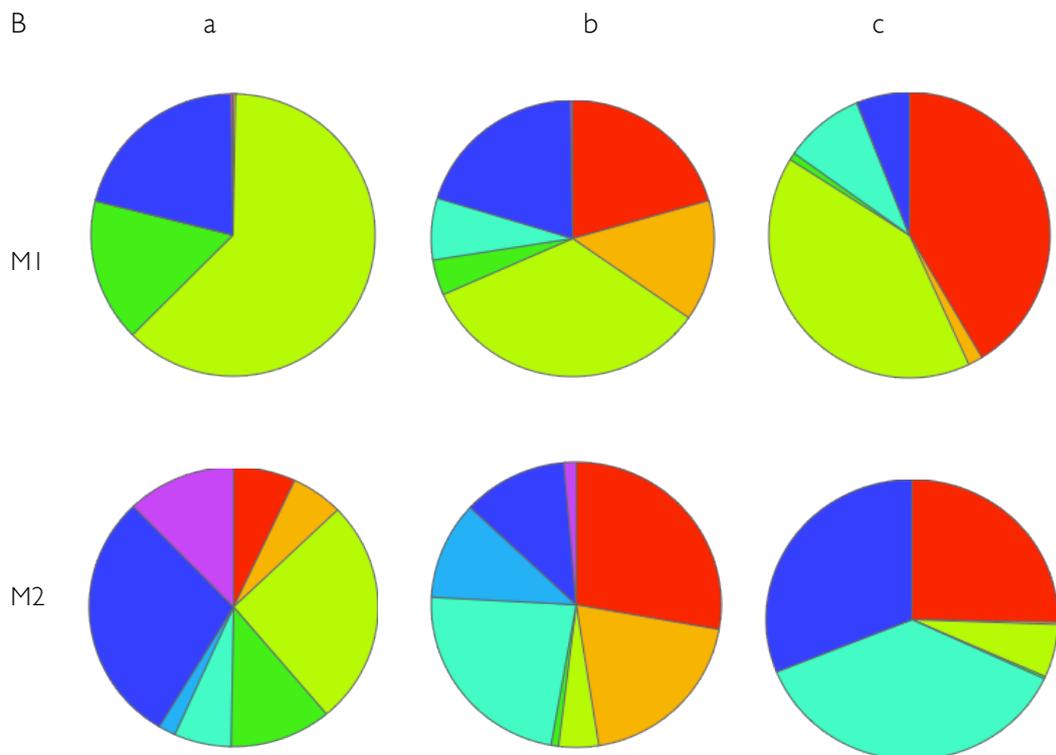
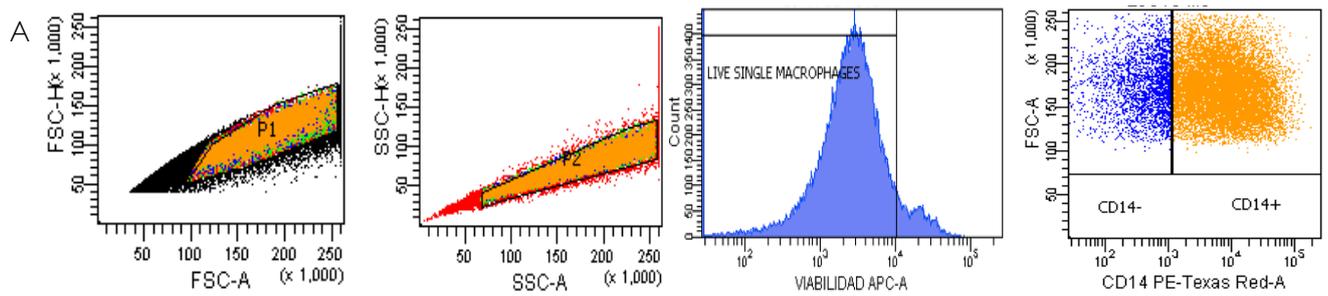
El fenotipo en macrófagos M1 y M2 está determinado principalmente por los marcadores CD14, DECTINI y CD209

Para determinar el fenotipo de los macrófagos tolerizados seleccionamos triples marcadores que definieran un criterio de identidad. Fue necesario primero, determinar el fenotipo que corresponde a macrófagos M1 y M2 para posteriormente hacer una comparación de acuerdo a la expresión de marcadores de superficie que presentan las células tolerizadas. Por definición los macrófagos M1 son CD14+, DECTINI-, CD209- mientras que los M2 son CD14-, DECTINI+, CD209+. También se ha observado que los macrófagos M1 son CD14+, CD36-, CD163- y los M2 son CD14-, CD36+, CD163+. Investigamos la presencia de estas combinaciones de marcadores de células diferenciadas hacia esos fenotipos específicos. Observamos que el porcentaje de células que expresan esas combinaciones de marcadores es distinta de su fenotipo, esto nos servirá como referencia para evaluar el fenotipo de los macrófagos tolerizados. Los datos se analizaron con el programa para evaluación de matrices complejas de citometría de flujo SPICE, que representa las poblaciones celulares en graficas de pastel (Figura 8).

La comprobación del fenotipo corresponde funcionalmente a células M1 y M2 se muestra en el anexo I que contiene cuantificación de TNF α , expresión de marcadores de superficie y la expresión del gen que codifica a IL10.

Los macrófagos tolerizados presentaron un fenotipo M1 pero presentan variabilidad de marcadores parciales

Determinamos el fenotipo que presentan los macrófagos tolerizados. Los macrófagos no tolerantes (M0) y los macrófagos tolerizados presentan un perfil de marcadores M1, en el que la población de CD14+, DECTINI- y CD209- es la más abundante (Figura 9).



	a	b	c							
CD14	+	+	+	+	-	-	-	-		
DECTIN I	+	+	-	-	+	+	-	-		
CD209	-	+	-	+	-	+	-	+		

Figura 8. **Fenotipo M1 y M2.** (A) Los macrófagos fueron seleccionados de acuerdo a su viabilidad y por su perfil de dispersión por tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Células M1 diferenciadas con IFN γ y células M2 diferenciadas con IL4 por cinco días y re-estimuladas por otros dos días con las mismas citocinas en placa de baja adherencia. Se muestran tres combinaciones de marcadores, sin embargo la mejor combinación que ayudo a definir las células M1 y M2 fue CD14, DECTIN1 y CD209 (n=9).

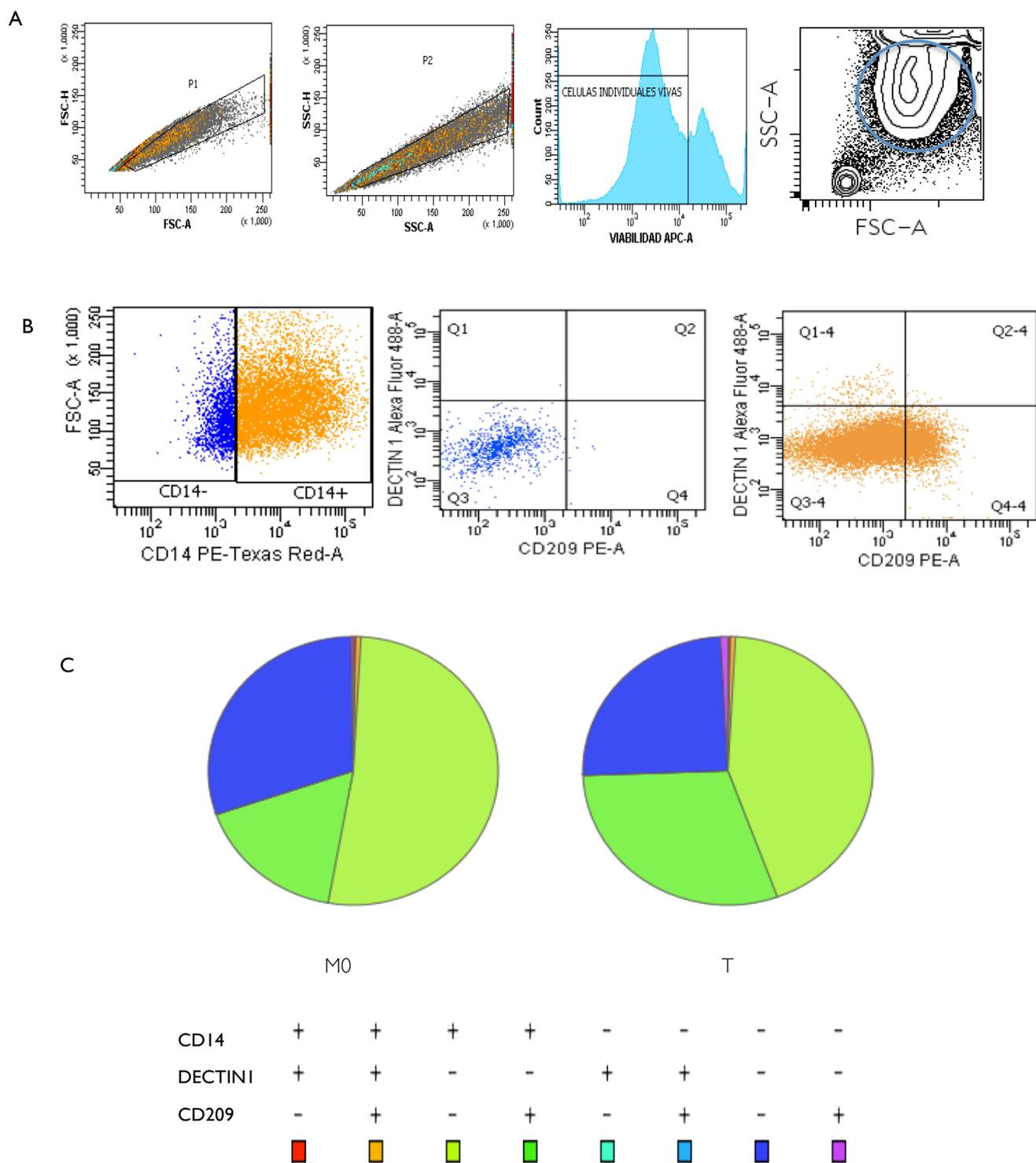


Figura 9. **Fenotipo de macrófagos tolerizados.** (A) Los macrófagos fueron seleccionados por su viabilidad y de acuerdo a su perfil de dispersión por tamaño (FSC) y granularidad (SSC). (B) Se cuantificó la expresión de marcadores en las células CD14+ y CD14- para hacer un triple marcaje con los marcadores CD209 y DECTIN1 y determinar el porcentaje de células M1 y M2 presentes en las macrófagos tolerizados. (C) Comparación fenotípica de macrófagos no tolerizados (M0) y tolerizados (T) (n=9).

La estimulación de los macrófagos tolerizados no modifica el fenotipo de expresión de marcadores

Queríamos determinar si con la adición de MDP por si solo, y en combinación con LPS se podía modificar el fenotipo en función de los marcadores utilizados en la caracterización de las poblaciones. Observamos polarización de los marcadores de superficie sin embargo no se encontraron diferencias significativas con la adición de estímulos (Figura 10).

Cambio en la Intensidad media de fluorescencia (IMF) de los marcadores CD14, DECTINI y CD163 en macrófagos tolerizados.

Aunque no observamos diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para uno marcador en particular, investigamos si el nivel de expresión de marcadores se encontraba modificado. Para ello analizamos la intensidad media de fluorescencia. Encontramos que los marcadores CD14 y CD163 se expresan de manera similar en todos los casos y sin embargo la expresión de DECTINI tiende a aumentar cuando las células se re-estimulan con LPS por si solo y tiende a disminuir cuando se añade la combinación de LPS y MDP (Figura 11).

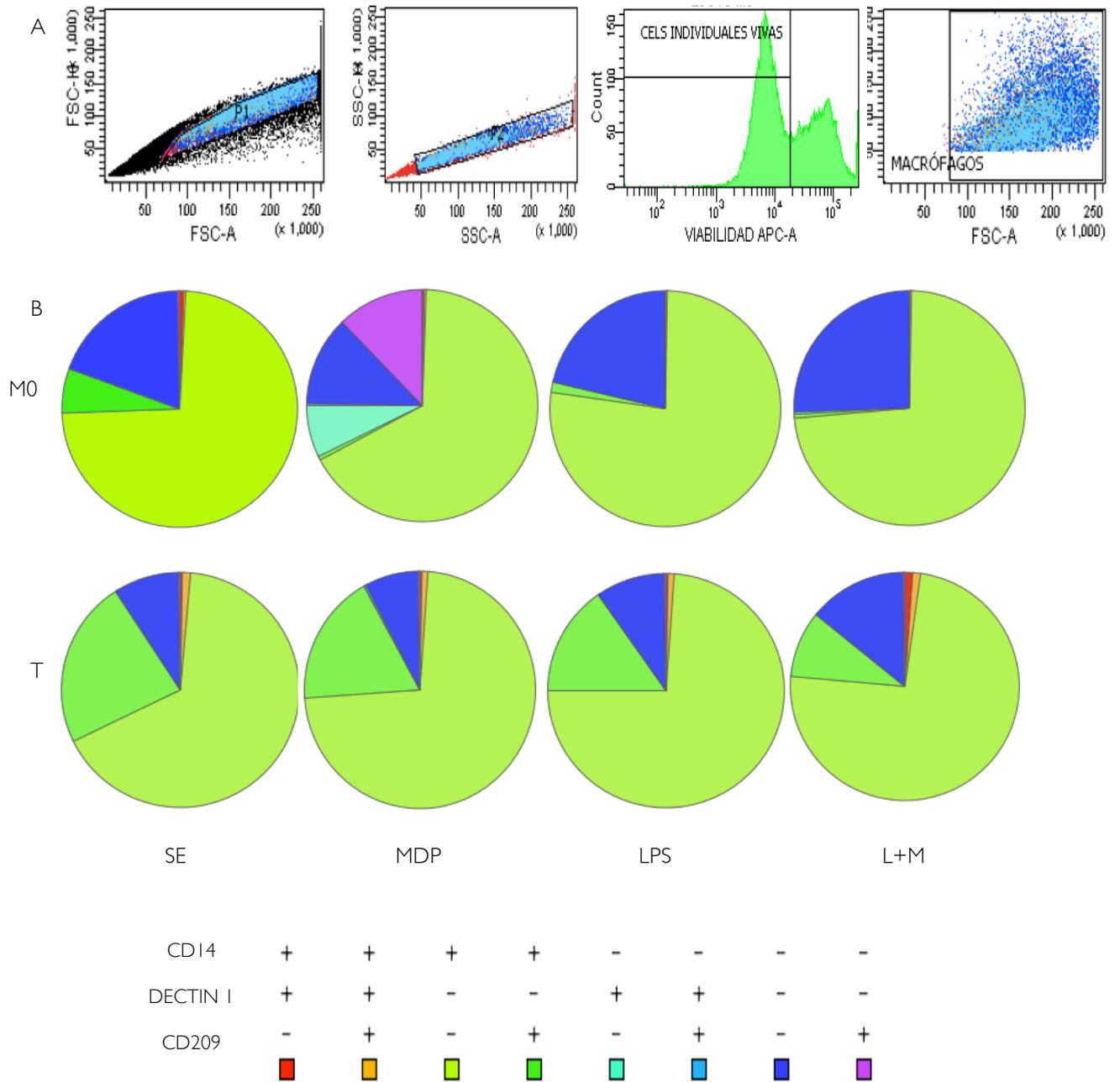
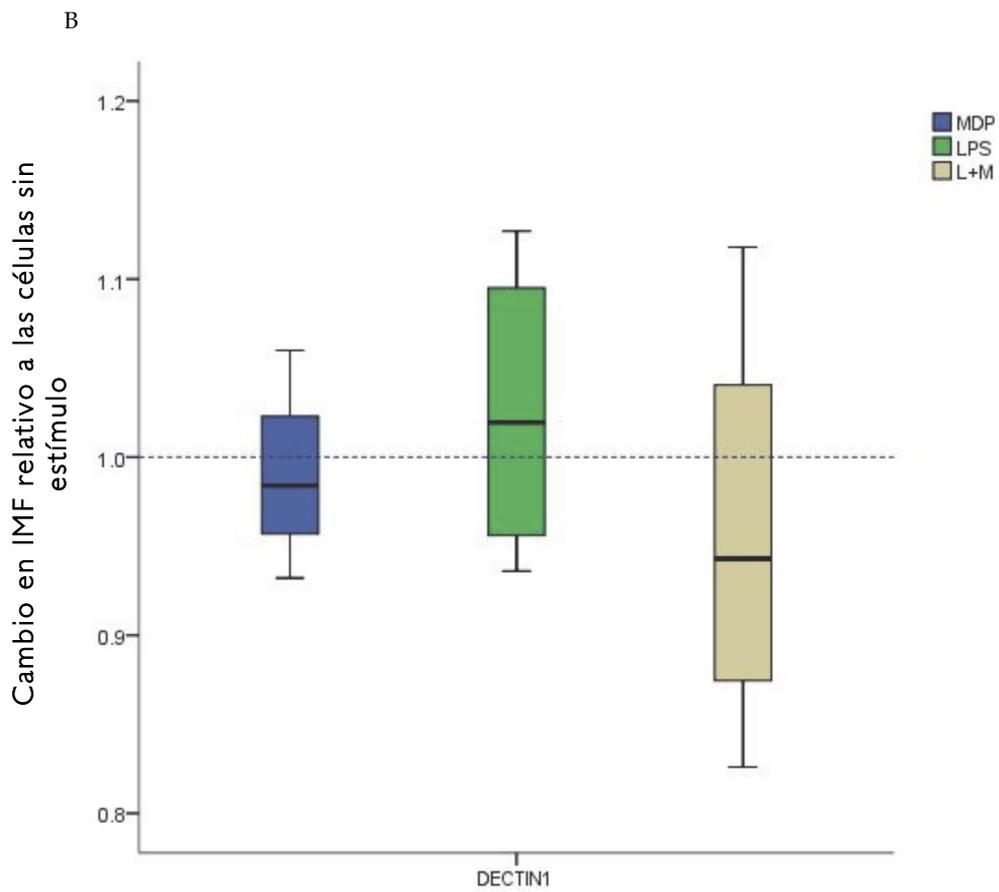
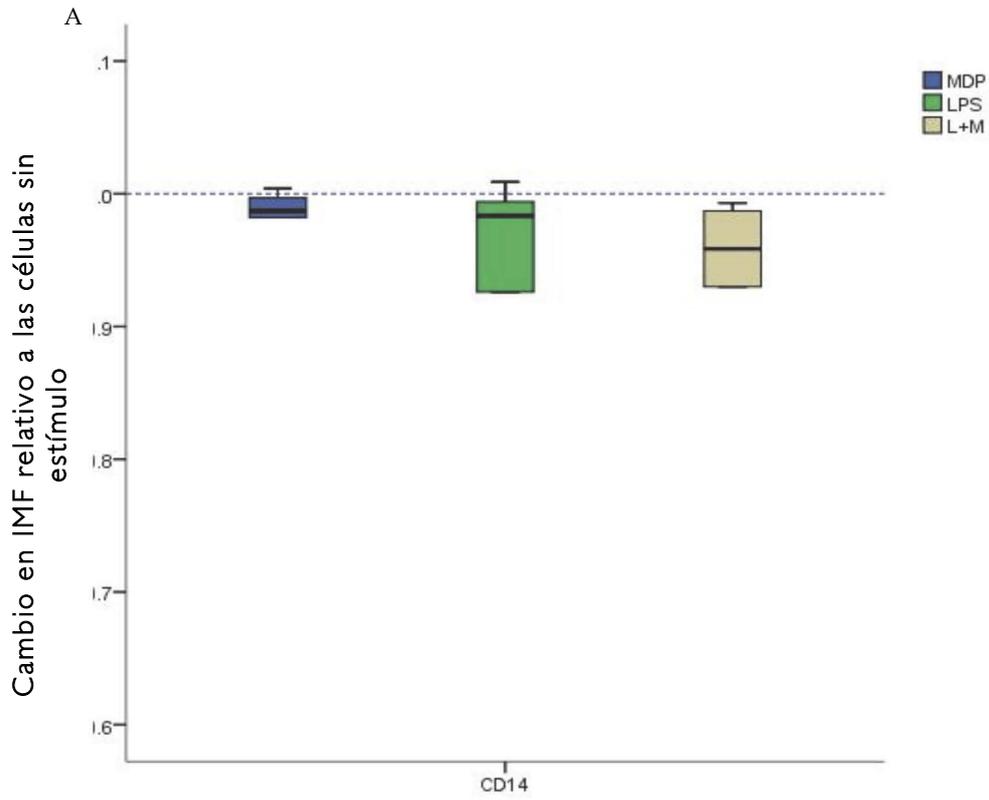


Figura 10. Polarización del fenotipo en respuesta a una estimulación. (A) Las células se trataron con MDP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (100 ng/mL) y L+M (100 ng/mL y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (B) Macrófagos no tolerizados (M0) y tolerizados (T) presentan el mismo fenotipo MI aún con la adición de estímulos.



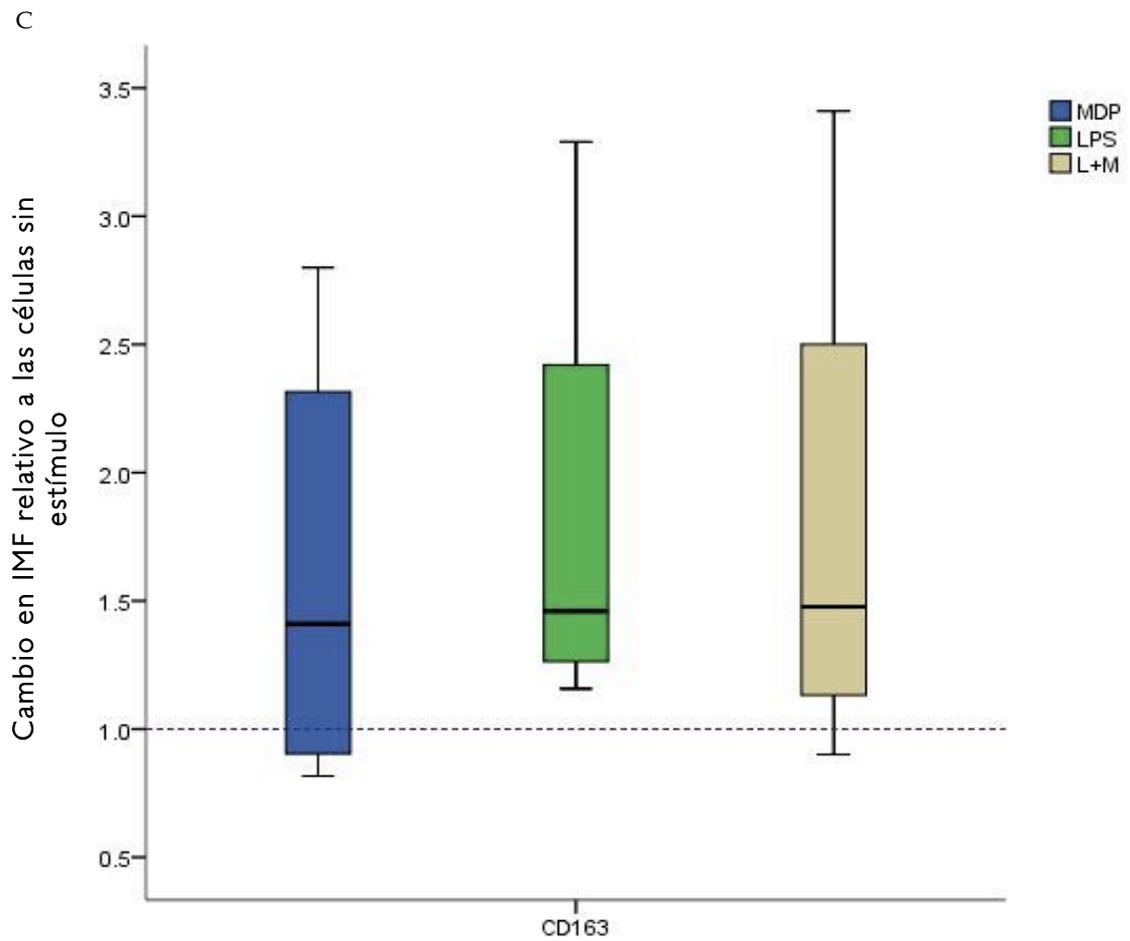


Figura 11. **Cambio en IMF en macrófagos Tolerizados.** Macrófagos Tolerizados fueron estimulados 24 h con LPS (100 ng/mL), MDP (10 μ g/mL), y L+M (100 ng/mL y 10 μ g /mL). Se muestra el cambio en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada molécula relativo a las células sin diferenciar, n=6.

DISCUSIÓN

Los fagocitos mononucleares se definen en base a la actividad fagocítica y la ontogenia, incluye monocitos, macrófagos y células dendríticas derivadas de monocitos. Existe tal diversidad entre las diferentes subpoblaciones celulares que funcionalmente y en su fenotipo los macrófagos reflejan una compleja interacción entre la diferenciación intrínseca o cuestiones ambientales recibidas desde células vecinas. El sistema de fagocitos mononucleares es dinámico ante una infección ya que bajo esta condición los monocitos son reclutados en los tejidos donde se diferencian a macrófagos (Lawrence y Natoli 2011). Los macrófagos tienen la capacidad de producir mediadores solubles, moléculas de actividad bactericida y fagocitan partículas grandes por lo que son de gran importancia en la presentación de antígeno (Rodríguez 2004), por lo tanto tienen propiedades pro y anti-inflamatorias dependiendo del microambiente en el que se encuentre ya sea un estado de equilibrio o ante una enfermedad (Porcheray, Viaud et al. 2005).

En este trabajo estudiamos algunos aspectos de la respuesta inmune de los macrófagos tolerizados por exposición previa a LPS; para ello, antes de evaluar la respuesta de los macrófagos tolerizados primero se comprobó que teníamos células tolerizadas ya que la producción de citocinas pro-inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ es significativamente diferente en macrófagos diferenciados sin estimulación que en macrófagos tolerizados, de esta manera demostramos que una re-estimulación con LPS induce una reducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias en los macrófagos tolerizados, lo que concuerda con lo que reporta la literatura (Sinistro, Ciapriani et al. 2007).

Los experimentos que llevamos a cabo en esta tesis estuvieron encaminados a probar la hipótesis de que la estimulación con MDP, ligando del receptor citosólico NOD2 modificaría la respuesta inmune de los macrófagos tolerizados. El MDP tiene propiedades como inmunoestimulador, sobre las células la adición de MDP estimula a su receptor NOD2 para producir la expresión de genes inflamatorios (Girardin 2003), trabajos previos como el de Divangahi y col en 2008 demostraron que en macrófagos de ratón al estimular sólo con MDP no había producción de $\text{TNF}\alpha$ pero al combinar los estímulos de MDP y LPS existía un sinergismo en la respuesta hacia la producción de

mediadores pro-inflamatorios.

Por otra parte, el MDP no induce la producción de citocinas en células sanguíneas humanas pero si de amplificar la producción de citocinas dependiente de TLR4-LPS, esto sugiere que los componentes sanguíneos son insensibles a la estimulación para la liberación de citocinas pro-inflamatorias pero la actividad residual del MDP puede hacer sinergismo con la vía del TLR4-LPS para la producción de citocinas; es decir, el MDP es significativamente menos potente que el LPS para la inducción de citocinas y por lo tanto posiblemente más susceptibles a los efectos inhibitorios (Van der Meer, Netea et al 2009). Bajo nuestras condiciones experimentales encontramos que la respuesta de células no tolerizadas (M0) y células tolerizadas con LPS y estimuladas con MDP fue casi nula, lo que sugiere que no se lleva a cabo la activación de NOD2 por su ligando MDP para producir TNF α en estas células.

La estimulación de monocitos y macrófagos con LPS en induce la expresión de genes que expresan los mediadores inflamatorios, como citocinas (TNF α , IL-1 e IL-6) y quimiocinas (MCP-1) (Guha y Mackman 2000). En este estudio los macrófagos tuvieron una significativa producción de TNF α pero al combinar los estímulos MDP y LPS observamos que no hay sinergismo y que la respuesta principalmente está dada por la estimulación con LPS puesto que no se observó respuesta ante la estimulación con MDP.

Este resultado fue inesperado porque se ha reportado que el MDP (especialmente en bajas concentraciones) tiene fuertes efectos sinérgicos sobre la producción de citocinas inducida por TLRs (Van der Meer, Netea et al 2009) y esperábamos observar este fenómeno sin embargo no observamos una reactivación en la respuesta proinflamatoria con la adición de MDP en los macrófagos tolerizados pero sí hubo un discreto aumento en la producción de TNF α por lo que además exploramos si había modificaciones en el fenotipo.

Se ha clasificado a los macrófagos en dos grupos principales M1 y M2, los M1 tienen actividad microbicida y pro-inflamatoria mientras que los M2 son inmunomoduladores y anti-inflamatorios (Pena, Pistollic et al. 2011); se pueden diferenciar unos de otros debido a los marcadores de superficie que presentan. Nosotros utilizamos una panel de 10 marcadores de superficie pro-inflamatorio y anti-inflamatorio para determinar el fenotipo de todas las células, de los 10 marcadores seleccionamos la

expresión de tres principales que nos permitieran diferenciar los grupos principales. La expresión de estos marcadores aumentó (medido por intensidad media de fluorescencia); los cuales son CD14, CD209 y DECTIN1, con esta combinación de marcadores es posible establecer el perfil fenotípico M1 y M2.

Los macrófagos M1 son CD14+CD209-DECTIN1- mientras que los M2 son CD14-CD209+DECTIN1+. También se consideraron los marcadores MR, y CD163, sin embargo, en estos casos las células no presentaron cambios considerables por lo tanto para las pruebas siguientes sólo se consideró la combinación CD14, DECTIN1 y CD209 (Labeta, Durieux et al 1993).

Se ha demostrado que el LPS puede aumentar la expresión de CD14 en la superficie celular de monocitos y de macrófagos derivados de monocitos, también la tolerancia depende del tiempo en que el LPS produce una máxima regulación sobre el receptor CD14 (Labeta, Durieux et al 1993; Fujihara, Moroi et al 2003) en nuestros resultados la expresión de CD14 en macrófagos no tolerizados y tolerizados fue la misma al igual que los marcadores CD209 y DECTIN1, ambos fenotipos corresponden a M1.

Se ha comprobado que los macrófagos estimulados hacia un fenotipo específico tienen la capacidad de volver a un estado de no activación después de retirar el estímulo (Porcheray, Viaud et al. 2005). En macrófagos tolerizados, la adición de MDP y la re-estimulación con LPS mantuvo el fenotipo M1, sólo algunas poblaciones celulares perdieron el marcador CD14 y expresaron CD209, al añadir los dos estímulos juntos no observamos diferencias significativas; es decir presentan un fenotipo M1 sin embargo la producción de TNF α resulto significativamente menor.

Por otra parte, el marcador que se encuentra sobre expresado y el cual observamos una diferencia fue DECTIN que es una molécula que tiene efectos sinérgicos tanto con TLR2 como con TLR4 (Ferwerda, Meyer-Wentrup et al. 2008). Además la expresión de DECTIN1 está altamente regulada por las citocinas que inducen la activación de los macrófagos como IL4 e IL13 mientras que con IL10 y LPS su expresión disminuye (Willement, Lin et al. 2003), en contraste nosotros encontramos que con la adición de LPS DECTIN1 aumenta su expresión y al combinar el estímulo de LPS y MDP el cambio en la intensidad media de fluorescencia (IMF) tiene a bajar su expresión, con lo anterior la modulación de DECTIN1 relaciona la capacidad del macrófago para reconocer y responder a patógenos.

Entender la complejidad de las redes transcripcionales que operan durante la activación de TLR4 y que definen la respuesta inmune subsecuente es de gran importancia, especialmente en investigaciones relacionadas con pacientes que sufrieron choque séptico, para los cuales la presencia de infecciones secundarias son un problema debido a que son más susceptibles a contraer una, este trabajo aporta evidencia experimental *in vitro* que apoya que la estimulación de NOD2 vía MDP no es capaz de reactivar la respuesta, por lo que se necesitan investigaciones adicionales sobre las moléculas adaptadoras que pueden ser candidatos para plantear terapias benéficas para disminuir la desensibilización por LPS. Identificar y caracterizar moléculas que contribuyen a los mecanismos de regulación positiva y negativa de funciones de los macrófagos permitirá contemplar nuevos enfoques para restaurar la respuesta protectora ante el choque séptico y evitar las complicaciones causadas por infecciones secundarias.

CONCLUSIONES

-La producción de TNF α de los macrófagos tolerizados ante una re-estimulación con LPS es significativamente menor que la de los macrófagos no estimulados.

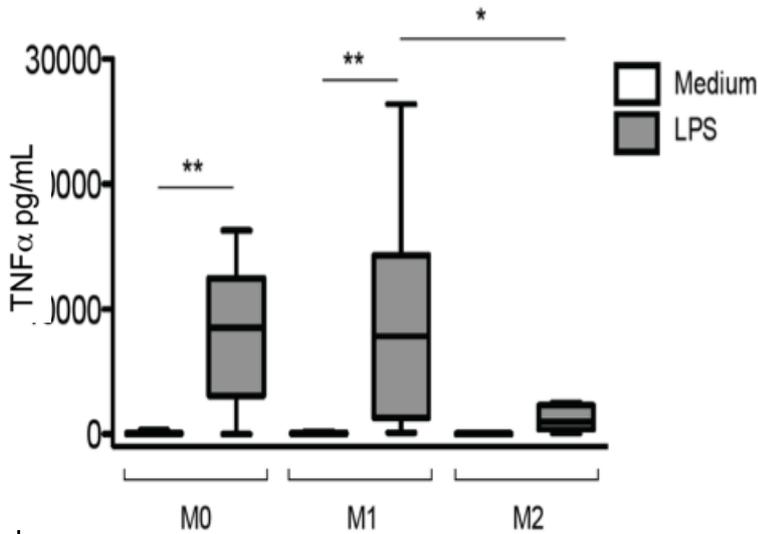
-El fenotipo de células tolerizadas por exposición previa a LPS corresponde al tipo M1.

-A pesar de tener células tolerizadas con fenotipo M1, la producción de TNF α es significativamente menor que en células no tolerizadas.

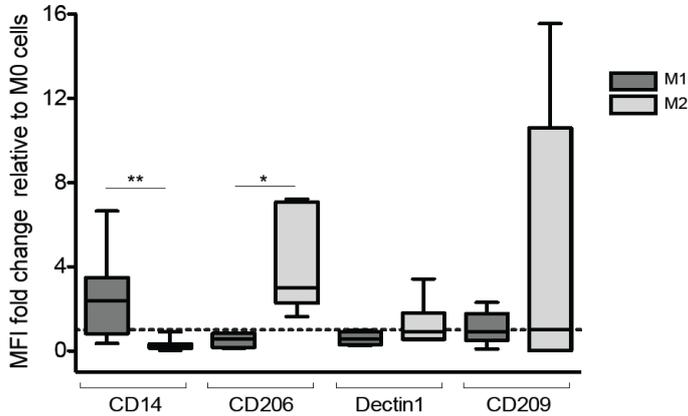
-EL receptor NOD2 no es estimulado por MDP para una respuesta moduladora de la respuesta inmune de macrófagos tolerizados.

ANEXO

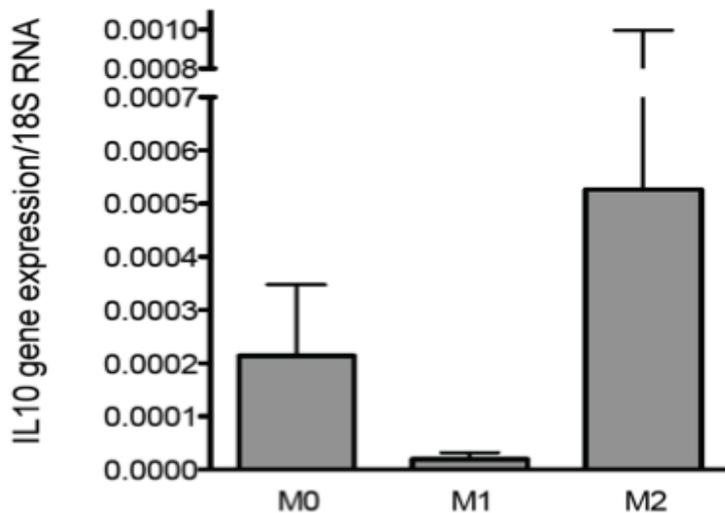
a



b



c



Polarización de macrófagos. Los macrófagos fueron diferenciados a partir de monocitos en placas de baja adherencia en ausencia de citocinas (M0), en presencia de INF γ (M1) o de IL4+IL10 (M2). Por definición, las células M1 son pro-inflamatorias y producen TNF α , al ser estimuladas con LPS y las M2 no (a, n=8). Las moléculas CD14 y CD206 se expresan de manera diferencial en ambas poblaciones de macrófagos (b, n=8). Así mismo durante la polarización las M2 producen IL10 y las M1 no (c, n=3).

*p<0.05, **p<0.01

(Montserrat Buendía, datos no publicados usados con permiso).

REFERENCIAS

1. Benoit, M., B. t. Desnues, et al. (2008). "Macrophage Polarization in Bacterial Infections." The Journal of Immunology **181**: 3733-3739.
2. Beutler, B. (2004). "Innate immunity: an overview." Molecular Immunology **40**(12): 845-859.
3. Biswas, S. K. and E. Lopez-Collazo (2009). "Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance." Trends in Immunology **30**(10): 475-487.
4. Cui, Y., X. Yang, et al. (2013). "Immune response, clinical outcome and safety of dendritic cell vaccine in combination with cytokine-induced killer cell therapy in cancer patients." Oncology Letters **6**: 537-541.
5. Divangahi, M., S. Mostowy, et al. (2008). "NOD2-Deficient Mice Have Impaired Resistance to Mycobacterium tuberculosis Infection through Defective Innate and Adaptive Immunity." The Journal of Immunology **181**: 7157-7165.
6. Dobrovolskaia, M. A. and S. N. Vogel (2002). "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS." Microbes and Infection **4**: 903-914.
7. Domínguez, A., A. Zentella, et al. (2009). "Control molecular de la inflamación: regulación de los receptores tipo Toll." REB **28**(4): 125-131.
8. Edén, R. F. M. (2004). Estudio de los aislados clínicos de Mycobacterium tuberculosis con "tropismo" hacia el sistema nervioso central. UNAM. Maestría: 78.
9. Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, et al. (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." Cellular Microbiology **10**(10): 2058-2066.
10. Fu, B., F. Wang, et al. (2011). "CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells." Immunology **133**: 350-359.
11. Fujihara, M., M. Muroi, et al. (2003). "Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex." Pharmacology & Therapeutics **100**(2): 171-194.
12. Gack, M. U., M. Baril, et al. (2013). "Genome-wide RNAi Screen Reveals a New Role of a WNT/CTNNB1 Signaling Pathway as Negative Regulator of Virus-induced Innate Immune Responses." PLoS Pathogens **9**(6): e1003416.
13. Girardin, S. E. (2003). "Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection." Journal of Biological Chemistry **278**(11): 8869-8872.

14. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, et al. (2007). "Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides." Nature Reviews Immunology **7**(1): 52-63.
15. Guha, M. and N. Mackman (2001). "LPS induction of gene expression in human monocytes." Cellular Signalling **13**: 85-94.
16. Lawrence, T. and G. Natoli (2011). "Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity." Nature Reviews Immunology **11**(11): 750-761.
17. Jing, J., I. V. Yang, et al. (2013). "Role of Macrophage Receptor with Collagenous Structure in Innate Immune Tolerance." The Journal of Immunology **190**: 6360-6367.
18. Jung, Y. O., M.-L. Cho, et al. (2009). "Synergism of toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and TLR6 ligation on the production of tumor necrosis factor (TNF)- α in a spontaneous arthritis animal model of interleukin (IL)-1 receptor antagonist-deficient mice." Immunology Letters **123**(2): 138-143.
19. Kim, H. J., H. S. Kim, et al. (2012). "Direct Engagement of TLR4 in Invariant NKT Cells Regulates Immune Diseases by Differential IL-4 and IFN- γ Production in Mice." PLOS ONE **7**: 1-11.
20. Kim, Y.-G., J.-H. Park, et al. (2008). "The Cytosolic Sensors Nod1 and Nod2 Are Critical for Bacterial Recognition and Host Defense after Exposure to Toll-like Receptor Ligands." Immunity **28**(2): 246-257.
21. Labeta, M. O., J. J. Durieux, et al. (1993). "CD14 and tolerance to lipopolysaccharide: biochemical and functional analysis." Immunology **80**: 415-423.
22. Lawrence, T. and G. Natoli (2011). "Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity." Nature Reviews Immunology **11**(11): 750-761.
23. Liew, F. Y., D. Xu, et al. (2005). "Negative regulation of Toll like receptor mediated immune responses " Nature Immunology **5**: 446-458.
24. Liu, C.-Y., J.-Y. Xu, et al. (2013). "M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway." Laboratory Investigation **93**: 844–854.
25. Miller, S. I., R. K. Ernst, et al. (2005). "LPS, TLR4 and infectious disease diversity." Nature Reviews Microbiology **3**(1): 36-46.
26. Palucka, K. and J. Banchereau (2012). "Cancer immunotherapy via dendritic cells." Cancer **12**: 265-277.
27. Parks, W. C., C. L. Wilson, et al. (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nature Reviews Immunology **4**(8): 617-629.

28. Pena, O. M., J. Pistolic, et al. (2011). "Endotoxin Tolerance Represents a Distinctive State of Alternative Polarization (M2) in Human Mononuclear Cells." The Journal of Immunology **186**: 7243-7254.
29. Pollard, K. M. and D. Kono (2013). "Requirements for innate immune pathways in environmentally induced autoimmunity." BMC Medicine **11**: 1-12.
30. Porcheray, F., S. Viaud, et al. (2005). "Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation." Clin Exp Immunol. **142**(3): 481-489.
31. Rajaiah, R., D. J. Perkins, et al. (2013). "Dissociation of Endotoxin Tolerance and Differentiation of Alternatively Activated Macrophages." The Journal of Immunology **190**(9): 4763-4772.
32. Schromm, A. B., E. Lien, et al. (2001). "Molecular Genetic Analysis of an Endotoxin Nonresponder Mutant Cell Line: A Point Mutation in a Conserved Region of MD-2 Abolishes Endotoxin-induced Signaling." J. Exp. Med. **194**(1): 79-88.
33. Sheedy, F. J., E. Palsson-McDermott, et al. (2010). "Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21." Nature Immunology **11**: 141-147
34. Sinistro, A., C. Ciaprini, et al. (2007). "Lipopolysaccharide desensitizes monocytes-macrophages to CD40 ligand stimulation." Immunology **122**(3): 362-370.
35. Strober, W. and T. Watanabe (2011). "NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease." Mucosal Immunology **4**(5): 484-495.
36. Takao, K. (2009). "Chemical biology of inflammatory cytokine signaling." The Journal of Antibiotics **62**: 655-667.
37. Turrel-Davin, F., F. Venet, et al. (2011). "mRNA-based approach to monitor recombinant gamma-interferon restoration of LPS-induced endotoxin tolerance." BioMed Centra **15**: 1-11.
38. Van der Meer, J. H. M., M. G. Netea, et al. (2009). "Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components." Clinical & Experimental Immunology **156**(3): 428-433.
39. Vodovotz, Y., G. Constantine, et al. (2010). "Translational Systems Approaches to the Biology of Inflammation and Healing" Immunopharmacol Immunotoxicol **32**(2): 181-195.
40. Watanabe, T., A. Kitani, et al. (2004). "NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses." Nature Immunology **5**: 800-808.
41. Willement, J. A., H.-H. Lin, et al. (2003). "Dectin-1 Expression and Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide." The Journal of Immunology **171**: 4569-4573.

42. Yu, H., T. Ha, et al. (2012). "Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF- κ B activation in macrophages." Biochim Biophys **1823**(7): 1192–1198.
43. Zhong, Y., A. Kinio, et al. (2013). "Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases." Frontiers in Immunology **4**: 1-18.