



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Participación de la activación del receptor NOD2 en la
regulación de la producción de TNF- α inducida por TRL4
en macrófagos humanos.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NIDIA LUCIO JIMÉNEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL
2015.**

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

1.Datos del Alumno.

Lucio
Jiménez
Nidia
54 28 18 12
Universidad Nacional Autónoma de México
México
Facultad de Ciencias
Biología
304093669

2.Datos del tutor.

Dra.
Esmeralda
Juárez
Carvajal

3.Datos del Sinodal 1 (Presidente).

Dra.
Luisa Alvarina
Alba
Lois

4.Datos del Sinodal 2 (Vocal).

Dra.
María Teresa
Herrera
Barrios

5.Datos del Sinodal 3 (Suplente).

Dra.
Silvia
Guzmán
Beltrán

6.Datos del Sinodal 4 (Suplente).

M en C.
Fernando
Hernández
Sánchez

7.Datos del trabajo escrito

Participación de la activación del receptor NOD2
en la regulación de la producción de TNF- α
inducida por TRL4 en macrófagos humanos.

61p
2015



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Participación de la activación del receptor NOD2 en la regulación de la producción de TNF- α
inducida por el receptor TLR4 en macrófagos humanos**

realizado por **Lucio Jiménez Nidia** con número de cuenta **3-0409366-9** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

Propietario Dra. María Teresa Herrera Barrios

Propietario
Tutora Dra. Esmeralda Juárez Carvajal

Suplente Dra. Silvia Guzmán Beltrán

Suplente M. en C. Fernando Hernández Sánchez

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 03 de septiembre de 2014

EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/MGM/mdm *Uau*

Este trabajo está dedicado a mi familia.

A mi **mamá** y mis **tíos** que
siempre han estado para mi,
apoyándome con mucho cariño
e incondicionalmente,
y a mis primos porque
sin darse cuenta,
me incentivaron todo el tiempo.
Pero en especial a mi tío,
a quién siempre
tengo muy presente en mi corazón.

A mis amigos
y a todas las personas
que creen y confían en mi.
Y a mi persona especial
que endulza cada uno de mis días.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y a los profesores que me formaron profesionalmente.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, al Departamento de Microbiología del INER por brindar el espacio para la realización de este proyecto.

A mis sinodales por su minuciosa revisión, consejos y críticas constructivas.

A mi mamá Cecilia Jiménez Lucio que siempre ha sido paciente y amorosa, a mis tíos Felipe Jiménez Lucio y Juan Jiménez Lucio quienes siempre han estado conmigo. Y a toda mi familia por el apoyo, comprensión y amor que me han brindado toda la vida.

A mis amigas por su amistad incondicional y por estar para mi en todo momento. A mis amigos del laboratorio, quienes hacían más ligeros los experimentos.

A Levi, quién sin notarlo, llegó a componer mi vida, me motiva y hace que disfrute cada momento.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Abreviaturas	4
3. Introducción.....	6
3.1 Propuesta de estudio.....	6
3.2 Generalidades del sistema biológico en estudio.....	8
3.2.1 Características de la inmunidad innata.....	9
3.2.2 Elementos de la inmunidad innata.....	10
3.3 Macrófagos (MØ).....	11
3.3.1 Monocitos (MN).....	11
3.3.2 Macrófagos alveolares (MA).....	11
3.3.3 Macrófagos derivados de monocitos (MDM).....	12
4. Detección de patógenos por elementos de la respuesta innata	14
4.1 TLR4.....	16
4.2 NOD2.....	20
4.3 Tipos de interacciones entre PRRs.....	22
5. Justificación.....	25
6. Hipótesis.....	27
7. Objetivo general.....	27
7.1 Objetivos particulares.....	27
8. Materiales y métodos.....	28
8.1 Grupo de estudio.....	28
8.2 Purificación de células.....	28
8.3 Estímulos.....	30

8.4 Tinción de NOD2 para la detección por citometría de flujo.....	34
8.5 Determinación de TNF- α	35
8.6 Análisis estadístico.	36
9. Resultados.	37
9.1 Producción de TNF- α en respuesta a LPS y MDP administrados de manera individual en las 3 estirpes celulares estudiadas (MN, MDM, MA).	37
9.2 Producción de TNF- α en respuesta a la administración diferida de LPS y MDP.....	41
9.3 Participación del inflamasoma y la PI3K en la interacción entre TLR4 y NOD2 en la producción de TNF- α	44
10. Discusión.....	47
11. Conclusiones.....	52
12. Bibliografía	52

1. RESUMEN

La defensa inicial contra microorganismos tiene lugar a través de la inmunidad innata en procesos como la inflamación y el sistema de complemento. La inflamación se presenta ante infecciones ocasionadas por agentes inocuos y patógenos y, en ocasiones se vuelve dañina para el propio individuo, lo que puede contribuir a la patología tisular y así al daño del órgano. Por ello es necesaria una regulación para mantener un balance inmunológico entre la respuesta eficaz del organismo y la pérdida de una respuesta protectora.

Las células del sistema inmune de mamíferos reconocen estructuras moleculares denominadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos mediante estructuras llamadas Receptores de Reconocimiento de Patrones presentes en células como monocitos y macrófagos. Dentro de estos receptores se encuentran los receptores tipo Toll y receptores tipo NOD; como TLR4 que reconoce al lipopolisacárido y NOD2 que reconoce al muramildipéptido. Al ser activados los receptores, se producen proteínas pro-inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa o TNF- α mediante un proceso de señalización.

En este trabajo el objetivo principal fue determinar la participación del receptor innato NOD2 en la regulación de la inflamación generada en macrófagos humanos por la exposición a lipopolisacárido. Para ello, se estudiaron 6 sujetos sanos; se les realizó una broncoscopia y un lavado bronquioloalveolar para obtener macrófagos alveolares y, a partir de su sangre periférica se obtuvieron monocitos

y algunos de ellos fueron diferenciados a macrófagos *in vitro*. Las células fueron estimuladas con lipopolisacárido y después tratadas con muramildipéptido en distintas condiciones de temporalidad; adicionalmente se incluyeron controles negativos (medio) y positivos (lipopolisacárido y muramildipéptido). Después de 1 hora y 24 horas de estimulación con ambos ligandos de los receptores, se recuperaron los sobrenadantes del cultivo para la determinación de TNF- α por el método de ELISA. En experimentos seleccionados se investigó la participación de las vías de señalización de la caspasa 1 y la molécula fosfatidil inositol 3 cinasa o PI3K, que se encuentran circundantes a las vías de señalización de estudio en el proceso inflamatorio.

Se encontró que los macrófagos producen TNF- α en respuesta a lipopolisacárido (los monocitos producen: 3216 ± 754.2 pg/ml, los macrófagos derivados de monocitos producen: 819.8 ± 399.2 pg/ml y los macrófagos alveolares producen: 5929 ± 2364 pg/ml). Cuando los macrófagos alveolares se trataron con MDP durante 24 horas y después con LPS durante 1 hora, se observó una reducción del 40% en la cantidad de TNF- α ; en cambio, bajo las mismas condiciones, en los monocitos y en los macrófagos derivados de monocitos, hubo un sinergismo al estimular con LPS y después MDP. También se observó que en monocitos y en macrófagos derivados de monocitos hubo una reducción en la cantidad de TNF- α de 95% y 60% respectivamente cuando se agregó LPS durante 24 horas y después MDP durante 24 horas.

Finalmente, se comprobó que las vías de señalización de la molécula fosfatidil inositol 3 cinasa y del inflamasoma que es un complejo protéico que forma la caspasa 1, no participan en nuestro fenómeno de estudio, puesto que al agregar de manera diferida en temporalidad los inhibidores que son Wortmanina para la fosfatidil inositol 3 cinasa y Z-vad-fmk para el inflamasoma, no se observaron cambios en las cantidades de TNF- α .

En conclusión, NOD2 podría jugar un papel como regulador negativo en la respuesta inflamatoria ocasionada por la activación de TLR4 en macrófagos alveolares humanos.

2. ABREVIATURAS

CARD15. Dominio Recultador de Caspasa contenido en la proteína 15

CARD9. Dominio Recultador de Caspasa contenido en la proteína 9

CLR. Receptores de Lectina tipo C, Receptores tipo Lectina

CpG. Oligonucleótido trifosfato con un motivo CG

DC. Células Dendríticas

DNA. Ácido Desoxirribonucleico

IKK1. Inhibidor de Cinasa 1

IKK2. Inhibidor de Cinasa 2

IL1. Interleucina 1

IL-10. Interleucina 10

IL1-b. Interleucina 1- Beta

IL-1 β . Interleucina 1, beta

IL-2 . Interleucina 2

IRAK. Receptor de Interleucina Asociado a Cinasas

I κ B. Factor nuclear de de los péptidos ligeros kappa en células B

kDa. Kilo Daltones

LPS. Lipopolisacárido

MA. Macrófagos Alveolares

MAKP. MAP Cinasas

MDP. Muramil dipéptido

MN. Monocito

M \emptyset . Macrófagos

MyD88. Gen Inducido por Ác. Retinóico de Resp. Primaria de Dif. Mieloide

NF κ B. Factor Nuclear de las cadenas ligeras kappa de células B

NLR / NACHT-LRR. Receptores tipo NOD

NOD1. Dominio de Oligomerización de Nucleótido 1

NOD2. Dominio de Oligomerización de Nucleótidos 2

NOD2fs. Dominio de Oligomerización de Nucleótidos

PAMP. Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PI3K. Fosfatidil inositol 3 cinasa

PRR. Receptor de Reconocimiento de Patrones

RICK. Receptor Interacting C Kinase

RIG. Gen Inducido por Ácido Retinóico

RLR. Receptores tipo RIG

RNA. Ácido Ribonucléico

RPMI. Medio Roswell Park Memorial Institute

RPMIg+g. Medio Roswell Park Memorial Institute con Glutamina y Gentamicina

TAK1. TRIF Activating kinase

TIR. Receptor tipo Toll/1L; Dominio Toll-IR-1L

TLR. Receptores tipo Toll

TLR2. Receptor tipo Toll 2

TLR4. Receptor tipo Toll 4

TNF α . Factor de Necrosis Tumoral alfa

TRAF6. Factor Asociado al Receptor de TNF, 6

TRAIL. Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Propuesta de estudio

En este trabajo estudiaremos la interacción entre NOD2 y TLR4, ambos son receptores de reconocimiento de patógenos que pueden iniciar la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que el muramil dipéptido (MDP), que es ligando de NOD2, puede actuar sinérgicamente con el lipopolisacárido (LPS), que es ligando de TLR4, para inducir la producción de citocinas proinflamatorias en condiciones *in vitro*, usando monocitos (MN) purificados y que sobreexpresan artificialmente TLR2, NOD1 y NOD2 en presencia de *MDP* y de LPS (100nM y 40 ó 100 ng/mL respectivamente) (Fritz, Jörg, 2005), lo que sugiere que NOD2 y TLR4 interactúan sinérgicamente en MN.

Aquí, nosotros proponemos que la posible interacción entre las vías de señalización de NOD2 y TLR4 puede no solo ser sinérgica sino antagónica, es decir, reguladora (al inhibir la señalización de los receptores y así la producción de TNF- α) como se muestra en la figura 1. Y, que depende del estadio de diferenciación de la célula; es decir, si es monocito, macrófago derivado de monocito (MDM) o macrófago alveolar (MA) y del período con que se administre los estímulos, el resultado de las interacciones entre ambos receptores.

A continuación explicaré las generalidades del sistema inmune innato y los receptores que son objeto de este estudio.

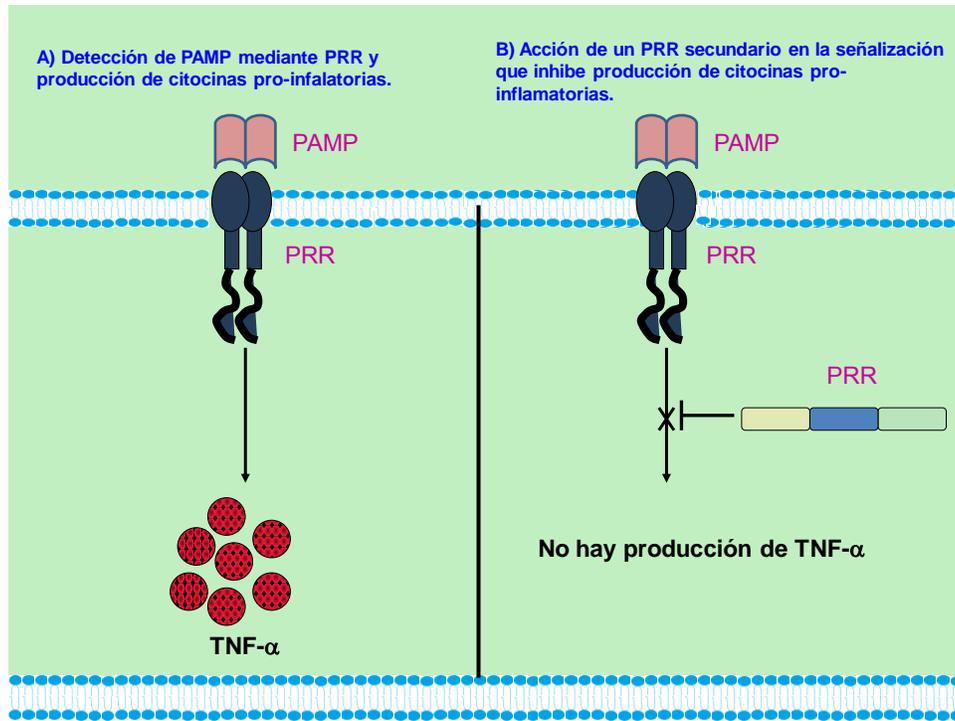


Fig 1. Respuesta general de la activación de los receptores TLR4 y NOD2. Cuando los PRR reconocen a su PAMP ligando, generan una señalización intracelular que termina en la producción de citocinas (que pueden ser pro-inflatorias) como TNF- α . Sin embargo, esta señal puede ser regulada de manera natural o inhibida en condiciones *in vitro* provocando así que no haya tal producción de citocinas pro-inflatorias.

3.2 Generalidades del sistema biológico en estudio

Los MN y macrófagos (MØ) son células del sistema inmune que juegan un papel importante en la defensa del hospedero contra invasores como microorganismos (English, Keith, 2011). Los MN conforman del 8 al 10% de los leucocitos humanos y son considerados parte primordial en la inmunidad innata. (Brostjan, Christine, 2012).

Los macrófagos son células fagocíticas que juegan un rol importante tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adquirida. No son considerados una población celular homogénea, debido a que son células con plasticidad capaces de responder a una variedad de estímulos ambientales y así, tanto su morfología como su fisiología cambian (Teunissen, Charlotte, 2011).

También estudiamos a los MA, los cuales son el componente celular más abundante en el pulmón, su principal función es defender a éste órgano de las bacterias patogénicas que pasan a través del aire. Los MA juegan también un papel importante en la inflamación ya que fagocitan las sustancias provenientes del exterior y así activan la producción de factores químicos como interleucinas (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Kawakami, Tadashi, 2012).

3.2.1 Características de la inmunidad innata

En el medio ambiente existen diversos microorganismos, algunos de los cuales pueden ser patógenos potencialmente invasores a través del contacto, ingestión o bien, inhalación de los mismos. Los seres vertebrados, poseen un sistema de defensa con dos niveles contra los patógenos: El primero en ser activado es el sistema de inmunidad innata, que está presente desde el momento del nacimiento y generalmente es suficiente para la protección del organismo (Wolff, H. 2011). El segundo en ser activado es la inmunidad adaptativa, que se considera como una respuesta especializada del organismo (Lopez-Larrea, Carlos, 2011).

La inmunidad innata tiene componentes celulares y humorales, se moviliza de manera rápida (comparada con la respuesta adaptativa), es decir, se inicia desde las cero hasta las 12 horas, reacciona frente a numerosos microorganismos de una manera parcialmente específica, no posee memoria y se encarga de destruir agentes invasores como bacterias, virus y parásitos mediante el proceso inflamatorio (Turvey, S., 2010).

La inflamación es una respuesta inmune frente a los agentes infecciosos y las señales moleculares de peligro, de estrés celular o que son producto de daño tisular. El mecanismo se lleva a cabo con la acumulación de células leucocitarias en el sitio de infección y la producción *in situ* de mediadores solubles pro-inflamatorios; se trata de un proceso fisiológico que se origina para el control de las infecciones y la posterior reparación de tejidos. Muchos receptores de la inmunidad innata (entre ellos TLR4 y NOD2) participan en la respuesta

inflamatoria e inducen la activación transcripcional para la producción de una gran cantidad de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios (Hernández, J., 2012).

3.2.2 Elementos de la inmunidad innata

Los componentes celulares del sistema inmune innato incluyen componentes celulares y humorales. Los componentes celulares comprenden células fagocíticas tales como macrófagos, células dendríticas y granulocitos polimorfonucleares. Los componentes solubles o humorales incluyen las citocinas y las quimiocinas, entre otros. Las citocinas son moléculas protéicas presentes en la señalización, las cuales tienen actividad parácrina que induce el proceso inflamatorio para atraerlas al sitio de infección, algunas citocinas proinflamatorias son: IL-1 β , IL-2, IL-10 y TNF- α (Valen, G., 2010). Algunos ejemplos tanto de componentes celulares como humorales aparecen en la Tabla 1.

Las quimiocinas son un grupo de moléculas pequeñas (alrededor de 8 a 14 KDa) con actividad quimiotáctica, son proteínas que viajan en la circulación hacia la matriz extracelular de los tejidos. Sus funciones son atraer células inflamatorias mediante gradientes de concentración y mejorar las interacciones celulares entre leucocitos y células endoteliales. (Dwinell, M., 2014). Otro componente humoral es el sistema del complemento que consta de varias proteínas plasmáticas que se activan en presencia de microbios favoreciendo la destrucción de los mismos. Por este motivo, el sistema del complemento juega un papel importante en la resistencia del hospedero a la infección (Banda, N. K., 2009). Las proteínas de

fase aguda en el proceso inflamatorio, que son también parte de la respuesta humoral, son proteínas secretadas por el hígado después de que ocurre la inducción de citocinas provenientes de macrófagos activados.

3.3 Macrófagos (MØ)

En este trabajo estudiamos la respuesta del MØ humano. Los macrófagos son células que se encuentran en los tejidos, por lo cual actúan como primera línea de defensa del organismo contra agentes infecciosos, jugando así un papel relevante en la defensa del huésped contra agentes invasivos. Su función es fagocitar y digerir a los patógenos. Esta célula es responsable de una producción local de mediadores inflamatorios. (English, Keith, 2011).

3.3.1 Monocitos (MN)

Los MN son las células precursoras de los macrófagos, pertenecen a los fagocitos mononucleares del sistema inmune y se encuentran circundantes en la sangre. Al igual que los macrófagos, se encargan de mediar el proceso de infección de microorganismos a través de interleucinas, factores de crecimiento y quimiocinas (DeNardo, 2010., Xiong, Sidong, 2013).

3.3.2 Macrófagos alveolares (MA)

Los MA son uno de los componentes más importantes en la primera línea de defensa pulmonar contra los patógenos inhalados u otros microorganismos. (Zhao,

Zhi-Jun, 2013). Entre sus funciones se encuentran digerir y fagocitar los elementos que llegan a los alveolos, para la protección de los mismos.

3.3.3 Macrófagos derivados de monocitos (MDM)

Este tipo celular forma de igual manera parte de la inmunidad innata. Son células provenientes de los MN, que se logran obtener mediante un cultivo por adherencia en placas y al ser activados adquieren una nueva morfología. Se ha demostrado que este tipo celular es un buen modelo para estudiar macrófagos en condiciones *in vitro*.

Tabla 1. Distintos componentes humorales y celulares del sistema inmune.

	Nombre del componente y función	Localización	Mecanismo	Referencia
Humorales	Complemento: Consta de un sistema proteico implicado tanto en la inflamación, como en la defensa del huésped ante infecciones ocasionadas por microorganismos.	Está presente tanto en sangre como en tejidos del organismo.	Tiene 3 vías de activación: alternativa, clásica y por lectina.	Ward, Peter, 2011
	Lisozimas. Se trata de enzimas que mediante hidrólisis eliminan células bacterianas, interviniendo así en la defensa del huésped.	Se encuentra en lágrimas y saliva.	Rompimiento de la pared celular bacteriana.	La Pevre, Jerome, 2010.
	Citocinas: Son proteínas secretadas por células de inmunidad innata y adaptativa, que regulan distintas funciones celulares y se encuentran relacionadas en la comunicación celular.	Están localizadas en diferentes tejidos y tipos celulares.	Tienen diversos efectos dependiendo de la citocina que se trate.	Abbas, Abul, 2003.
	Interferones: Los interferones tipo I son citocinas pleiotrópicas que poseen funciones antivirales, antitumorales e inmunoreguladoras.	En células T y células B dependiendo del tipo de interferón.	Funcionan como antivirales, antitumorales e inmunoreguladores.	Ivashkiv, Lionel, 2011.
Celulares	Neutrófilos: Son un tipo celular predominante en el infiltrado inflamatorio, estos leucocitos se encuentran en mayor cantidad que cualquier otro tipo de leucocito en la sangre.	Se encuentran en sangre.	Fagocitosis y proceso inflamatorio. Así ayudan a eliminar bacterias y hongos.	Smyth, Rosalind, 2011.
	Macrófagos (MØ) y monocitos: Células inmunitarias con un papel importante en la defensa del hospedero contra microorganismos.	Se localizan en tejidos circundantes a la sangre	Fagocitosis y proceso inflamatorio.	English, Keith, 2011.
	Células NK: Son linfocitos que detectan y lisan células dañinas.	Están presentes en sangre, bazo y médula ósea	Tienen la capacidad de lisar células tumorales y virales	Mirshafiqy, Abbas, 2011.
	Eosinófilos: Son leucocitos multifuncionales de tipo granulocito	Se encuentran en sangre.	Funciones proinflamatorias como patogénesis, es célula efectora de hipersensibilidad y ayuda a eliminar parásitos.	Kita, Hirohito, 2010.

4. DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR ELEMENTOS DE LA RESPUESTA INNATA

Parte importante de la inmunidad innata son los receptores, cuya función es realizar el reconocimiento de microorganismos. Actualmente existen cuatro familias principales de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR):

La familia de proteínas transmembranales de receptores tipo Toll (TLR); receptores tipo lectina (CLR); la familia de proteínas citoplásmicas con dominio de oligomerización de nucleótidos, que incluye a los receptores tipo Nod (NOD) y a los receptores parecidos a Nod o NLR (Nod Like Receptors, por sus siglas en inglés); y finalmente a los receptores tipo RIG (del inglés Retinoic-Acid Induced Gen), RLR.

Los PRR median la detección de patógenos bacterianos y se expresan en muchos tipos celulares como MØ, MN, células dendríticas (DC), neutrófilos y células epiteliales, lo cual permite la detección de patógenos directamente en el sitio de infección. (Martinón, F., 2009).

Los PRR detectan estructuras microbianas comunes en un gran número de microorganismos. Los blancos del reconocimiento de éstos son llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), son estructuras conservadas, únicas para los microorganismos e invariantes entre las clases de patógenos (Iwasaki, A., 2004). Algunos ejemplos de PAMPs son ácidos nucleicos (DNA con motivos CpG o RNA de cadena sencilla), componentes de la pared celular bacteriana o de hongos (peptidoglicana o betaglucanos), proteínas (profilina,

flagelina), carbohidratos (manosa), lípidos y lipoproteínas que comparten distintos grupos bacterianos (Gyu Kim, Jae, 2004).

Una vez que los PRR reconocen a los PAMPs de los microorganismos, se inicia la respuesta inflamatoria con el fin de aumentar la defensa contra el patógeno potencial. Esta respuesta comienza con un proceso de señalización de proteínas adaptadoras como MyD88 (Gen de Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide), MAPK (MAP cinasas) y otros elementos de respuesta inmune como el inflamasoma, que es un complejo molecular que se localiza en el citosol y dentro del cual se lleva a cabo la maduración proteolítica de la IL-1 β (Hernández, J., 2012), para llevar a cabo la activación de factores de transcripción como el NF κ B y este a su vez induce la expresión de moléculas como TNF α , que activará a las células vecinas para que se inicie el proceso inflamatorio con el fin de reclutar más células del sistema inmune innato hacia el sitio de la infección. (Park, J., 2007; Wolff, H., 2011). (Martín, F., 2009). El NF κ B es uno de los factores de transcripción, que regulan la respuesta inmune posterior a la activación de los PRR y ha sido considerado como el puente entre la inmunidad innata y adaptativa. (Valen, G., 2010).

En este trabajo enfocaremos nuestra atención en los PRRs: TLR4, que forma parte de la familia de los TLRs y NOD2, que forma parte de la familia de los NLRs. El receptor TLR4 que es un receptor de membrana y su PAMP ligando es LPS (lipopolisacárido) de bacterias en superficie celular o endosomas. Y por su

parte, el receptor NOD2 es citoplásmico y su ligando es el muramildipéptido (MDP) (Juárez, Esmeralda., 2009).

4.1 TLR4

Los receptores tipo toll (TLR) juegan un papel importante en la respuesta de la inmunidad innata y adaptativa, se trata de glucoproteínas integrales de membrana que contienen repeticiones cargadas de leucina flanqueadas en sus regiones extracelulares por secuencias con abundante cisteína y por un dominio de homología de TIR (Abbas, A., 2008). TLR4 es de los receptores pertenecientes a la familia de TLR más estudiados; éste se encuentra de manera transmembranal en las células y reconoce como ligando a LPS. El lipopolisacárido (LPS) es un componente que se encuentra en la parte externa de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas; al ser detectado por el receptor TLR4, éste puede activar a células del sistema inmune como monocitos y macrófagos. (Ho, Wen-Zhe, 2011). Cuando el LPS es reconocido por los TLR4, se activan señales intracelulares que promueven la traslocación al núcleo del factor nuclear kappa B (NF- κ B) para inducir la transcripción de genes de la respuesta inmune como el de TNF- α . (Ruef, Peter, 2012).

Cuando se une a su ligando, la señalización es iniciada y TLR4 forma homodímeros. La señalización de los TLR utiliza a la proteína adaptadora MyD88, la cual es reclutada por el receptor a través de su dominio (TIR). A este complejo formado se une otra proteína que pertenece a la familia de cinasas y se denomina IRAK, las interacciones mediante los dominios de ambas proteínas conducen a la

activación de TRAF6. Después este complejo se unirá al complejo formado por la MAP3K con IKK1 e IKK2, lo cual da como resultado la degradación de I κ B y la subsecuente liberación de NF κ B el cual se puede traslocar al núcleo (Figueroa, Leandra, 2012) (Fig. 2).

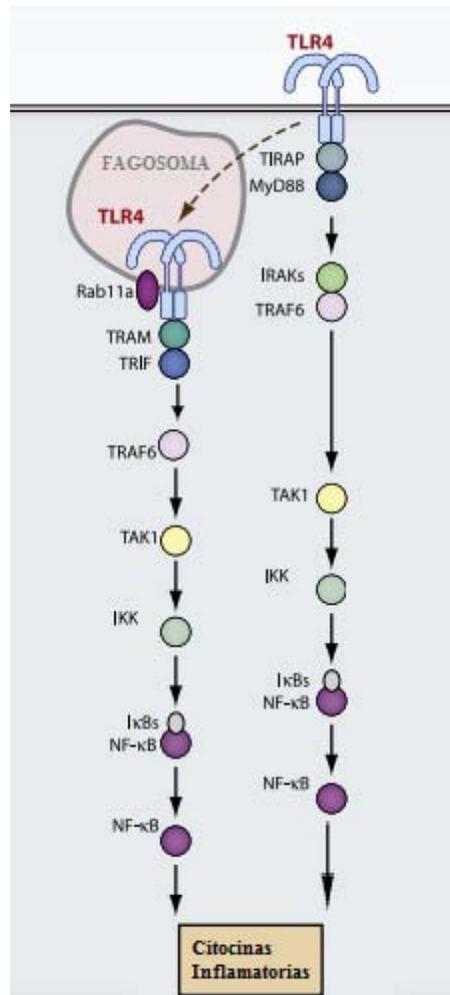


Fig 2. Señalización de TLR4. Una vez que TLR4 reconoce a su ligando (LPS), se une a la proteína adaptadora MyD88, a este complejo se unen las proteínas IRAK y TRAF6, posteriormente se adiciona al complejo IKK, lo que permite la disgregación de I κ B y con esto, finalmente se da la liberación de NF κ B para que se pueda traslocar al núcleo, iniciando así la transcripción de genes de proteínas pro-inflamatorias como TNF- α . (Tomado de Kawai, Taro., 2011. Editado).

Para que ocurra la respuesta inmune innata y posteriormente la adaptativa, es necesaria la activación de los TLRs por su ligando. Sin embargo, cuando la cantidad de LPS es muy alta o su presencia es continua, se pueden desencadenar enfermedades inflamatorias como sepsis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y exacerbación del asma (Causadas por LPS) (Liew, F., 2005). Esto puede ocurrir por la producción exacerbada de citocinas y mediadores inflamatorios, por este motivo, se ha contemplado como una buena alternativa, la inhibición de la respuesta inflamatoria como un tratamiento a este tipo de enfermedades. (Park, Sung-Joo, 2012). Uno de los componentes inflamatorios que genera una respuesta inflamatoria exacerbada, es la citocina TNF- α , la cual es la principal citocina producida por células de la inmunidad innata que se encuentra presente en los desórdenes antes mencionados. (Kullberg, B., 2007).

En el caso particular de la enfermedad de Crohn, se ha encontrado una asociación genética con la respuesta inmune innata. Se trata de un polimorfismo en el gen CARD15/NOD2, que junto con sus variantes de TLR4, han sido asociados con el desarrollo de esta enfermedad. (Shalaby, Manal, 2012). Específicamente, esta asociación se debe a una mutación que se presenta en el nucleótido del segundo dominio de NOD2, lo cual da como resultado un incremento de la respuesta inflamatoria local que consiste en una respuesta exacerbada a los comensales de la flora normal. Por este motivo, se ha sugerido que el receptor NOD2 conduce a una tolerancia cuando se trata de la estimulación

de receptores TLR, en particular TLR4. Se conoce que las células de sangre periférica de sujetos sanos, que son preincubadas con ligandos de NOD2, es decir, MDP en varias concentraciones, reducen su capacidad para sintetizar TNF- α después de la estimulación de TLR4 con LPS (Kullberg, Bart., 2007).

Mientras tanto, en células provenientes de pacientes con enfermedad de Crohn, se produce una respuesta de tolerancia cruzada sobre TLR4 causada por NOD2. La tolerancia entre ambos receptores está ausente en pacientes con una mutación en NOD2 (NOD2fs).

4.2 NOD2

NOD2 es un receptor citoplásmico, miembro de la familia de proteínas de los receptores NACHT-LRR (NLRs) localizado en el citoplasma de células fagocíticas, (Hedl, M, 2007). Pertenece a la familia de receptores NLR (NATCH-LRR), que son moléculas citoplásmicas con estructuras conservadas en sus dominios, y que sirven como sensores intracelulares en las infecciones bacterianas (Abbas, A., 2008).

NOD2 reconoce principalmente a un componente bacteriano: el muramildipéptido (MDP) y también reconoce componentes tóxicos de patógenos que penetran a la célula. Cuando el MDP, que se encuentra en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, es reconocido por NOD2, éste manda una señal a través de RICK o CARD9 hacia MAPK o TACK1, estas moléculas a su vez inducen la traslocación al núcleo de NF- κ B, el que a su vez induce la transcripción de genes, en particular los de las citocinas pro-inflamatorias como TNF- α (Fig. 3). NOD2 se ha encontrado vinculado a la enfermedad de Chron, al síndrome de Blau y a la sarcoidosis, que son enfermedades inflamatorias, debido a que se genera un incremento local de inflamación (inflamación crónica) (Kullberg, B., 2007). Un polimorfismo en el gen NOD2/CARD15 fue identificado como un factor de riesgo para la enfermedad de Crohn en caucásicos. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación crónica gastrointestinal. (Posovsky, C., 2013).

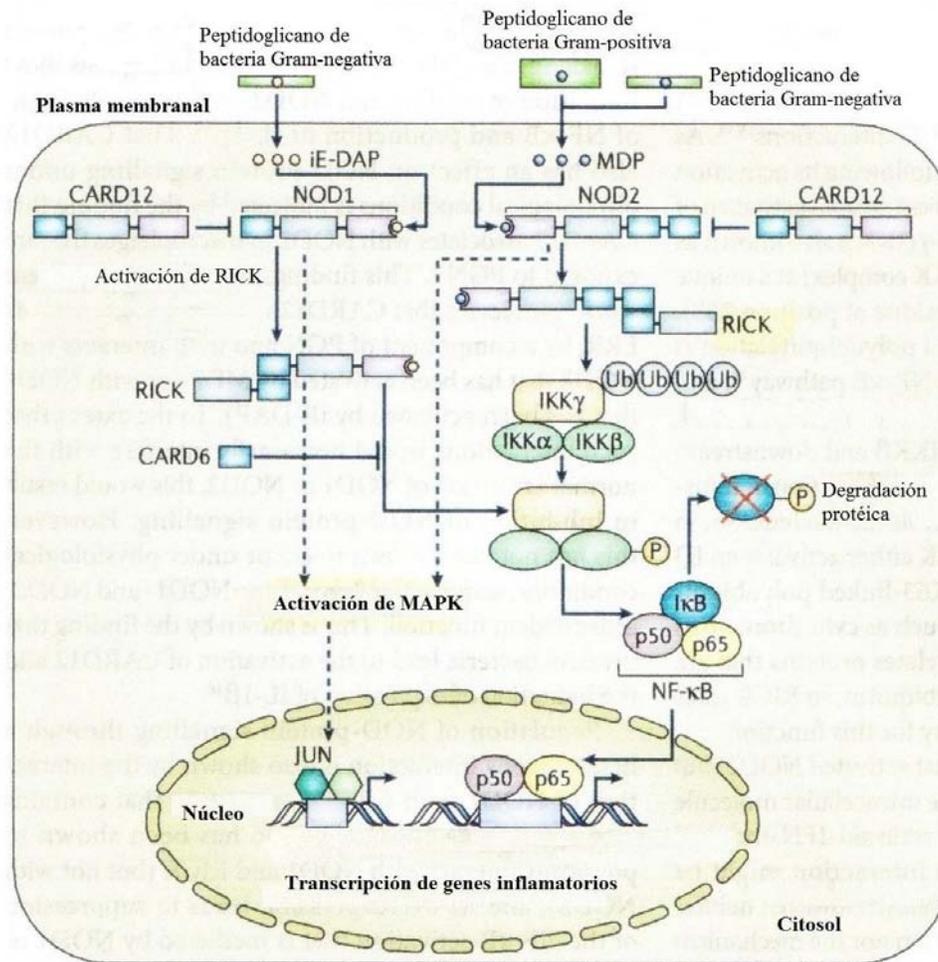


Fig 3. Señalización de NOD2. Cuando el receptor NOD2 reconoce en el citoplasma al compuesto MDP de las bacterias, activa a RICK y CARD9, las cuales posteriormente activan a la MAPK y TAK1. Esta señal activa al NFκB, el cual se trasloca al núcleo para que se pueda iniciar la transcripción de los genes de la respuesta pro-inflamatoria, como $TNF\alpha$. (Tomado de Strober, Warren., 2005).

4.3 Tipos de interacciones entre PRRs

Un análisis de la señalización intracelular ha mostrado que un gran número de vías convergen en un conjunto relativamente limitado de mecanismos de interacción que incluye interacciones sinérgicas y antagónicas que facilitan cascadas de señales intracelulares cuando las células (como MØ) reciben estímulos ambientales u ocasionados por patógenos (Hajishengallis, 2011).

Las interacciones incluyen:

- Sinergismo: en el que aumenta en gran medida la sensibilidad de la detección, en este caso varios estímulos débiles e individuales se combinan para producir una respuesta celular vigorosa. Un ejemplo de esto, es la cooperación que existe entre TLR3 ó TLR4 y TLR7 ó TLR9 para estimular la producción de citocinas en el perfil Th1.

Ejemplos adicionales:

1. Se ha demostrado que la interacción que ocurre entre TLR2 y TLR4 induce la producción de ERO (Especies Reactivas de Oxígeno) desde la mitocondria hacia el fagosoma, incrementando la producción de éstas en macrófagos de rata con actividad bactericida (Kawai, Taro, 2011).
2. Se han reportado efectos sinérgicos entre TLR2 y TLR4 también para la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos. (Underhill, David., 2007).

3. NOD2 actúa sinérgicamente con TLR2 para favorecer la producción de citocinas proinflamatorias después de la infección de *Mycobacterium tuberculosis*. (Kawai, Taro, 2011).

- Antagonismo: Es el efecto neutralizante de un receptor frente a otro; en este caso, aumenta la especificidad de la respuesta del huésped para restringir una señal y prevenir el daño colateral del tejido. Por ejemplo:
 1. La interacción entre TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF y TRAILR a través del contacto celular, genera una regulación negativa de las funciones de los TLR (Liew, F., 2005).

La información publicada permite suponer que la interacción entre PRRs ocurre para:

- Diversificar el repertorio de reconocimiento.
- Potenciar la respuesta inmune.
- Regular negativamente la sobreexpresión de genes (se pueden inhibir señales que podrían causar daño al hospedero).

Por tanto proponemos que existe interacción mediada por las vías de señalización del receptor de membrana TLR4 y del receptor citoplásmico NOD2, esta interacción puede ser del tipo regulador y lo exploramos en este trabajo. Sin embargo, éstas vías de señalización convergen únicamente hasta el NFκB, por lo que es posible que se encuentren vinculadas las vías de señalización de

estimulación autócrina del inflammasoma y la activación de las MAP cinasas, como se muestra en la figura 4.

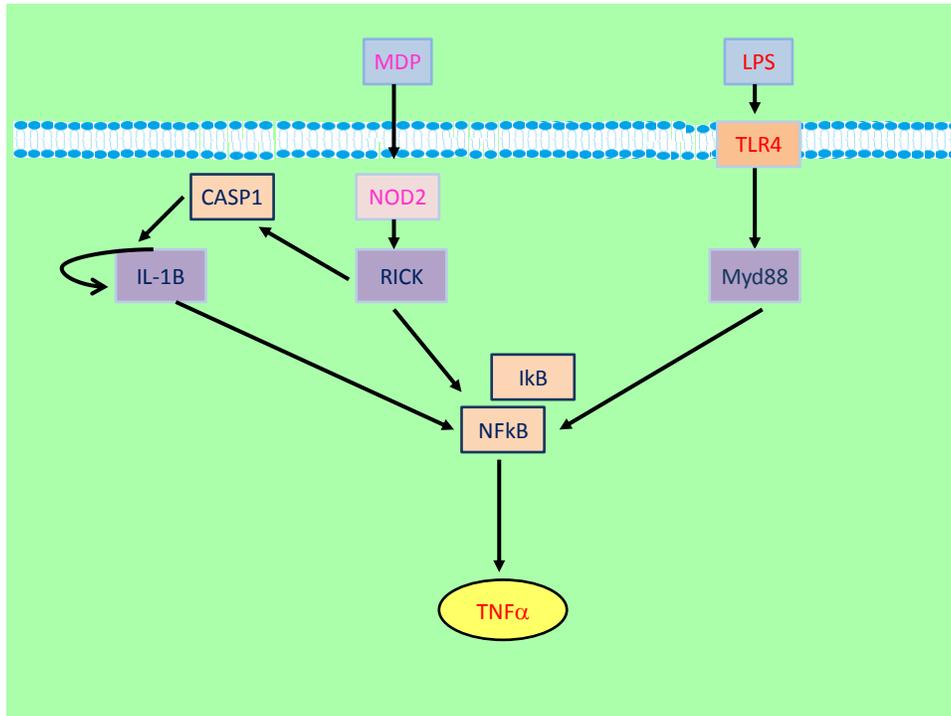


Fig 4. Activación de la señalización de TLR4, NOD2 y vías alternativas que culminan en la producción de TNF-α. Cuando NOD2 se activa, también activa a la molécula RICK y ésta a su vez a la caspasa 1 y ésta a IL-1β, que se estimula a sí misma y al NFκB, lo cual lleva finalmente a la producción de TNF-α, esta producción se genera también cuando se activa TLR4.

5. JUSTIFICACIÓN

El reconocimiento de patógenos o sus componentes por TLR4 inicia una respuesta celular compleja en la que participan múltiples vías de señalización para la producción de citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-1 β y desencadena mecanismos bactericidas, como péptidos antimicrobianos, que contribuyen a la respuesta inmune la cual culmina con la erradicación del patógeno (Bleuter, B., 2004). El control de la activación de estos mecanismos inmunológicos en macrófagos es crítico porque una activación excesiva puede generar desórdenes inflamatorios crónicos, mientras que una activación insuficiente puede dejar al hospedero susceptible a otras infecciones (Akira, S., 2006; Beutler, B., 2006; Creagh, E., 2006).

Controlar las vías de señalización que llevan a una inflamación patológica por medios farmacológicos es de gran interés y el diseño de agentes terapéuticos que activen la regulación negativa de la señal del TLR4 podrían ser útiles en el tratamiento de infecciones y procesos inflamatorios (O'Neil, L., 2006) (Liew, F. Y. et al., 2005). Debido a que la inducción de citocinas proinflamatorias requiere la traslocación del NF κ B, diversos estudios se han encaminado a descubrir un fármaco capaz de bloquear el efecto del NF κ B (Chen et al., 2010) (Shen et al., 2010). Sin embargo, la utilidad de alguno de los componentes de la señalización de TLR4, incluyendo el NF κ B, como blanco terapéutico tiene grandes limitantes; por ejemplo, la toxicidad de los fármacos disponibles, dificultades para su uso *in vivo*, falta de especificidad porque las moléculas de la señalización se comparten

entre diversos receptores y además, un bloqueo sostenido traería deficiencias en la protección contra infecciones subsecuentes (Wissinger et al, 2008).

Es probable que una mejor estrategia requiera la estimulación de vías específicas en lugar de una inhibición generalizada. La diferencia entre inflamación protectora e inflamación patológica podría estar en la interacción entre distintos receptores y sus señales. Particularmente, se ha reportado que la activación de NOD2 funciona como un regulador negativo de la respuesta de TLR2 en un modelo murino (Watanabe, T., 2004) y como regulador negativo de la señal de TLR4 en células epiteliales humanas (Rosenstiel et al, 2007). Controversialmente, algunos reportes indican que los macrófagos murinos y los monocitos humanos estimulados simultáneamente con ligandos de TLR4 y NOD2 potencian la producción de citocinas proinflamatorias (Ferwerda, G., 2005) (Fritz, J., 2005). Sin embargo, cuando MDP es administrado tiempo después de la exposición al LPS, el resultado es el opuesto tanto en monocitos humanos (Hedl, M. et al, 2008) como en macrófagos murinos; además, la adición de MDP a macrófagos murinos con tolerancia por exposición continua al LPS induce la producción de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias revirtiendo la tolerancia y restaurando la actividad bactericida (Kim, Y., 2008). Por lo que consideramos que estudiar las interacciones entre TLR4 y NOD2 en un contexto específico de tipo celular que podría contribuir a esclarecer las funciones reguladoras o estimuladoras de NOD2 y su papel en la modulación de la respuesta inflamatoria.

6. HIPÓTESIS.

En MØ humanos, la activación el receptor citoplásmico NOD2 regula la producción de TNF- α inducida por el receptor TLR4.

7. OBJETIVO GENERAL.

Analizar el papel que la activación del receptor NOD2 ejerce sobre la regulación del proceso inflamatorio ocasionado por la exposición a LPS en MN, MDM y MA humanos.

7.1 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto que la activación de NOD2 tiene sobre la producción de TNF- α inducida por LPS en macrófagos alveolares primarios, macrófagos derivados de monocitos y monocitos.
2. Determinar si la activación del inflamasoma participa en la regulación de la producción de TNF- α inducida por la activación de TLR4.
3. Determinar el papel de PI3K en la producción de TNF- α inducida por TLR4.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Grupo de estudio

Se incluyeron en este estudio de 10 individuos sanos mayores de edad. Ninguno de los voluntarios tenía patologías respiratorias o inflamatorias crónicas y fueron seronegativos para VIH-1. A los sujetos se les realizó una broncoscopia para la realización de un lavado bronquioloalveolar a partir del cual se obtuvieron los MA y una muestra de 180 ml de sangre periférica. Los sujetos donantes firmaron el consentimiento informado para el uso de sus células en estos experimentos y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER). Adicionalmente se utilizaron los paquetes leucocitarios de 6 sujetos sanos donadores al banco de sangre del INER para la obtención de MDM y MN.

8.2 Purificación de células

Se analizaron tres estirpes celulares de linaje mieloide que son: monocitos (MN), macrófagos derivados de monocitos (MDM) y macrófagos alveolares (MA).

De las muestras sanguíneas (180ml) se obtuvieron células mononucleares mediante la técnica de separación de células que consiste en diluir la sangre 1:2 con medio RPMI (Lonza, Walkersville, MD) adicionado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de sulfato de gentamicina (Lonza, Walkersville) y 100 mM de L-glutamina (RPMI+g) (Lonza, Walkersville), y después se estratificaron con lymphoprep (Axis Shield) y se centrifugó 45 minutos a una velocidad de 1200 rpm a temperatura ambiente. Después de centrifugar, se recuperaron con una pipeta de transferencia las

células mononucleares (que son el anillo que se encuentra en la interfase del gradiente formado). Posteriormente para eliminar el remanente de lymphoprep se realizaron dos lavados con RPMI+g suplementado con 10% de suero humano descomplementado (Valley Biomedical).

Para obtener los monocitos (MN), se recubrió la superficie de una caja de Petri (Costar) para cultivo con suero humano descomplementado. Después se agregaron $50-80 \times 10^6$ células mononucleares de sangre periférica por caja Petri y se incubaron 1h a 37°C / 5% CO_2 , para luego remover las células no adherentes mediante lavados. Las células adherentes (MN) se lavaron 4 veces con medio. Posteriormente, con un levantador de células (Costar) se colectaron las células dentro de un tubo de 50ml (Falcon), se centrifugaron a 1200rpm por 15 min a 4°C , y se resuspendieron las células en RPMI-10%PSH y finalmente se contaron las células y se determinó la viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano (Gibco), la cual siempre fue superior al 97%. Las células se sembraron a razón de 5×10^5 MN/pozo en una placa de poliestireno de 24 pozos y se estimularon directamente en la placa.

Una parte de los monocitos se derivaron a macrófagos (MDM) *in vitro*. Para esto, se sembraron 5×10^5 MN/pozo en una placa de poliestireno de 24 pozos (Costar) y se incubaron por 7 días a 37°C / 5% CO_2 . En este tiempo la morfología de las células correspondió a la de los $\text{M}\emptyset$. Las células se estimularon directamente en la placa en la que se diferenciaron.

Los MA se obtuvieron directamente por centrifugación del lavado bronquioloalveolar 15 minutos a 1500 rpm a 4°C . La viabilidad se determinó por

exclusión de azul de tripano y en todos los casos fue superior al 98%. Las células se sembraron a razón de 5×10^5 MN/pozo en una placa de poliestireno de 24 pozos y se estimularon directamente en la placa.

8.3 Estímulos

Para determinar el papel regulador de NOD2 sobre la respuesta inflamatoria inducida por TLR4, las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS de *E. Coli* (LPS) (Sigma Aldrich) o con 10 μ g/ml de MDP (Invivogen, San Diego, CA) durante 1 y 24 h a 37°C/5%CO₂, lavadas posteriormente 3 veces con 500 μ l de RPMI y re-estimuladas con LPS o MDP en forma cruzada por otras 24 h en las mismas condiciones, como se muestra en la figura 5.

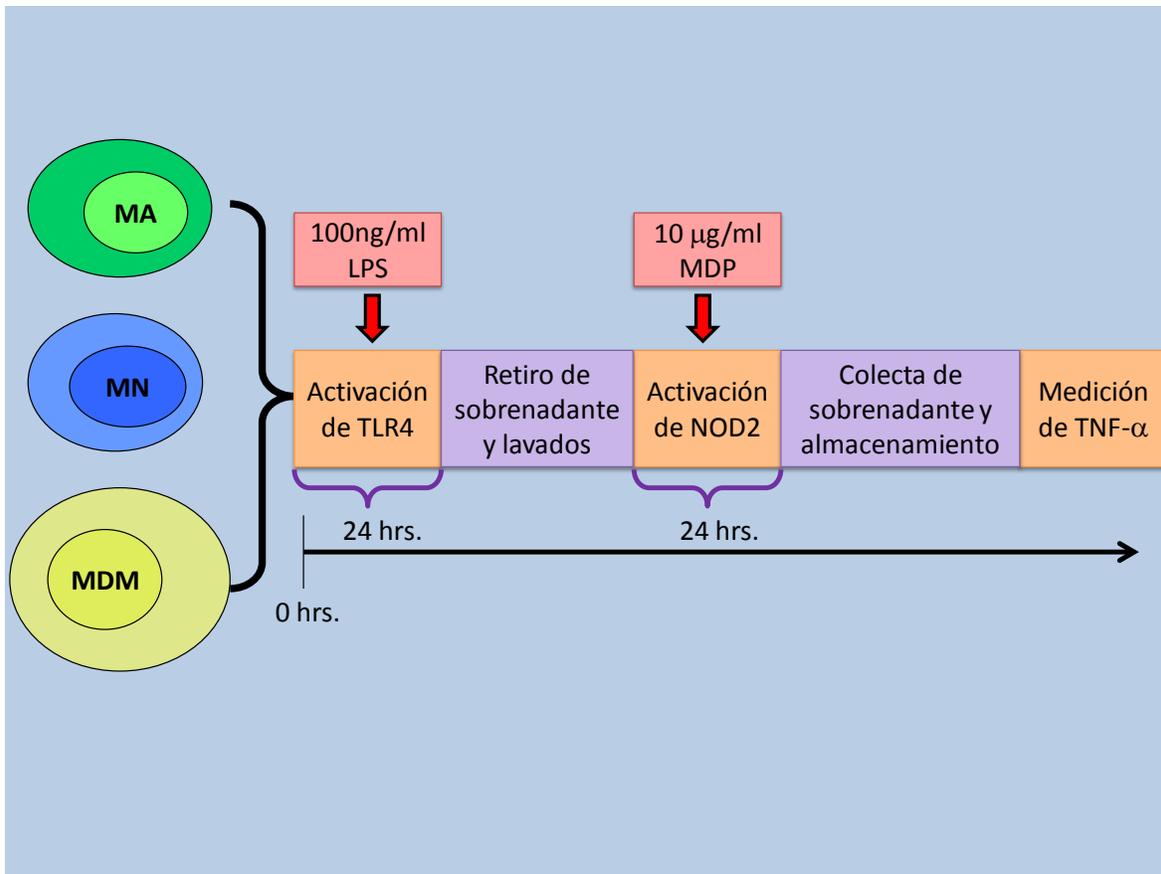


Fig 5. Metodología de estímulos adicionados. En cada tipo celular (MA, MN y MDM) los estímulos de TLR4 y NOD2 fueron agregados a las 0 y 24 h y se colectaron los sobrenadantes después de 48 h de estimulación para la medición de TNF- α y, en cada caso se realizaron 3 lavados para remover el primer estímulo antes de agregar el segundo.

Para investigar el papel de la caspasa 1 y el papel de PI3K, en experimentos seleccionados se preincubaron los MN y MØ por 10 min con el inhibidor de PI3K, Workmanina (100nM) (Fluka, St. Louis, MO) (Fig. 6) y el inhibidor de pancaspasas Z-vad-fmk (20µM) (Calbiochem, La Jolla, CA) (Fig. 7), antes de añadir los estímulos correspondientes como en el caso anterior. Así mismo se incluyeron controles de medio sin ningún ligando para evaluar el efecto de los inhibidores.

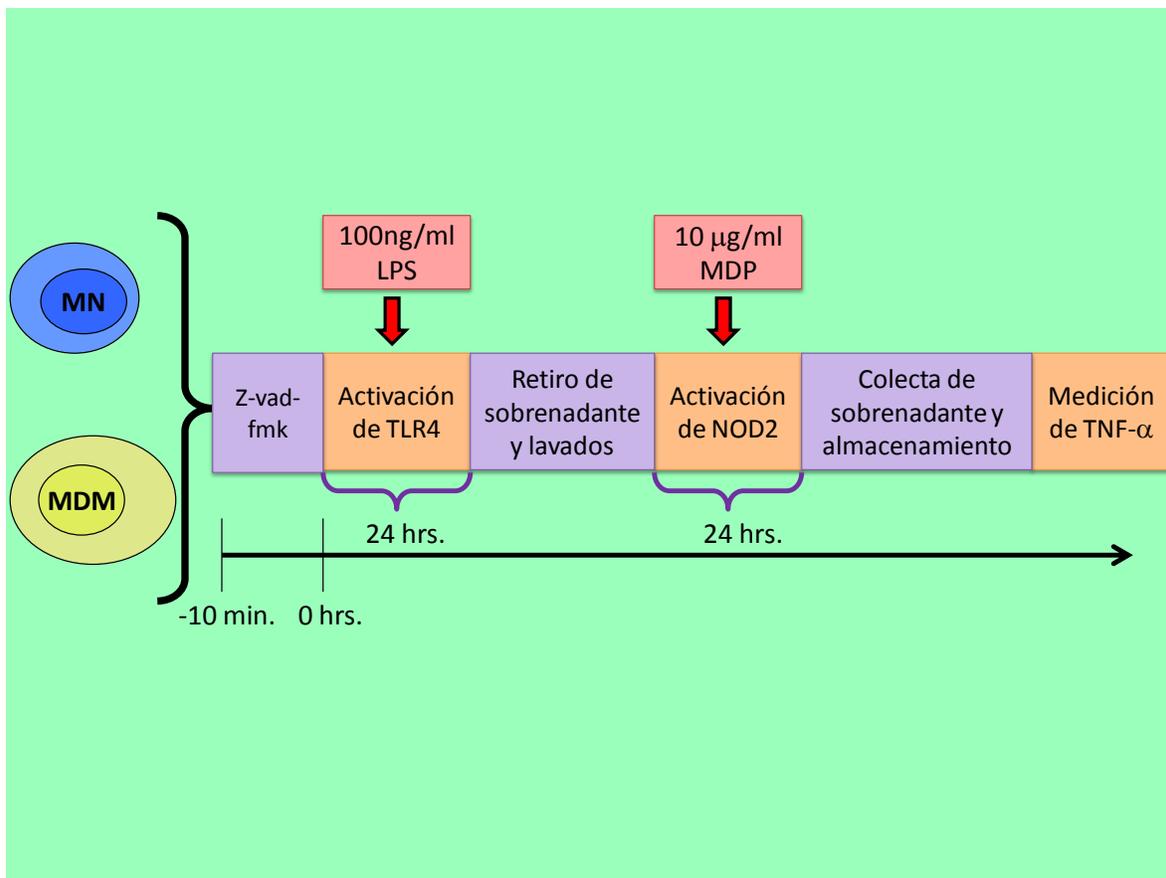


Fig 6. Metodología de estímulos e inhibidor de la caspasa 1 adicionados. A los MN y MDM se les agregó inicialmente el inhibidor de caspasa 1, Z-vad-fmk (20µM) durante 10 min y, se prosiguió el experimento de igual manera activando a los receptores TLR4 y NOD2 de manera diferida para posteriormente medir la cantidad de TNF-α.

Simultáneamente se probaron otros tratamientos para determinar el papel de PI3K; se utilizó el mismo esquema de horarios y con las células empleadas, pero esta vez el inhibidor empleado fue wortmanina, como se muestra en la figura 7.

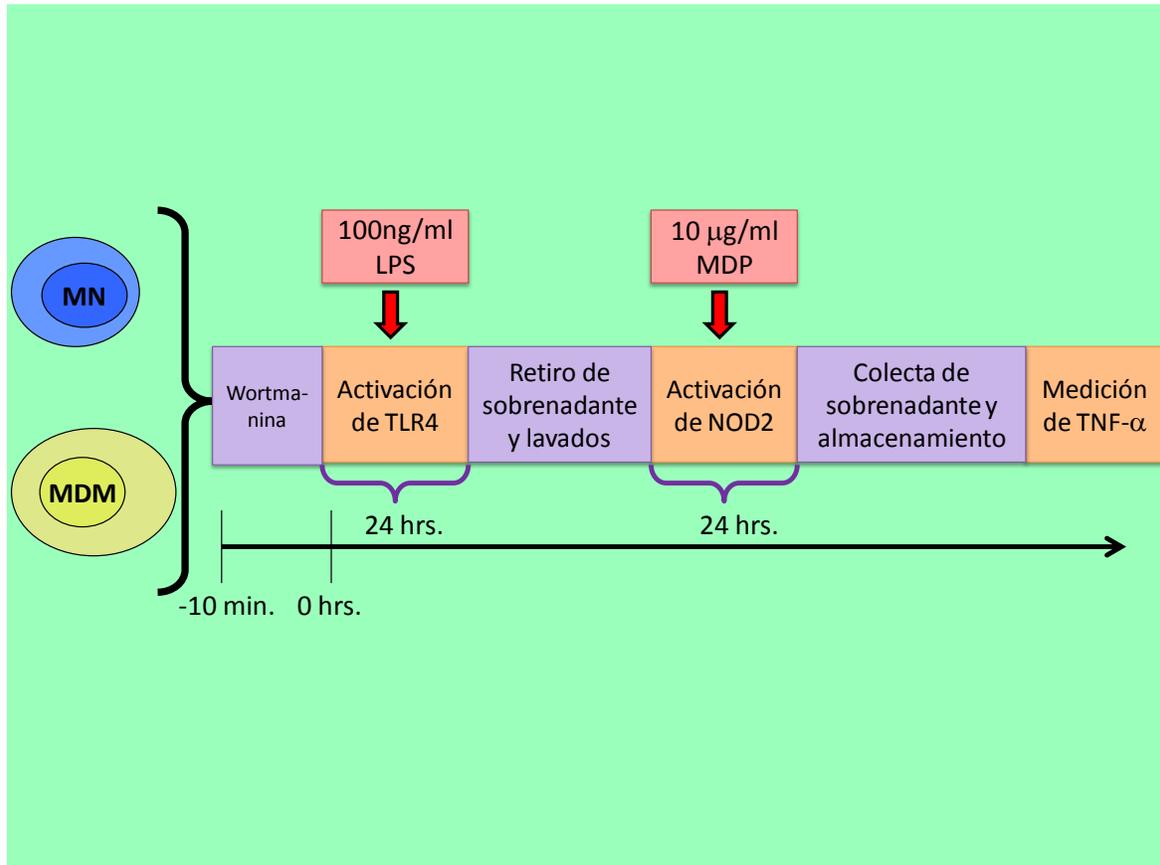


Fig 7. Metodología de estímulos e inhibidor de la PI3K adicionados. Las células (MN y MDM) fueron preincubadas durante 10 min con el inhibidor de PI3K, wortmanina (100nM); consecutivamente se activaron los receptores TLR4 y NOD2 como se ha mostrado anteriormente y de igual manera se midió la cantidad de TNF- α en cada condición.

8.4 Tinción de NOD2 para la detección por citometría de flujo

Se realizó una tinción del receptor NOD2 en las células MA, MDM y MN. Primero se colocaron 5×10^5 células por tubo (se utilizaron 2 tubos de 500 μ l por cada condición). Los tubos se centrifugaron a 5 min a 2000 rpm a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular. Se añadieron 50 μ l de RPMI-50% suero hiperinmune de conejo (SHIC). Se incubaron los tubos a temperatura ambiente por 10 min mientras se agitaban ocasionalmente. Se añadieron 200 μ l de solución de lisis 1X y se incubaron de nuevo durante 10 min a temperatura ambiente, agitándose de manera ocasional. Posteriormente se añadió a cada tubo 1ml de solución washing buffer (PBS-0.5% Suero fetal bovino o SFB) y se centrifugó nuevamente 5 min a 2000 rpm para lavar las células. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las células y se añadieron 200 μ l de solución permeabilizadora 1X. Se incubaron una vez más los tubos durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente las células. Se adicionaron 50 μ l de RPMI-50% SHCI+2.5 μ l del anticuerpo anti-NOD2 de cabra y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, se lavaron con washing buffer y se resuspendieron las células. Se añadieron 2.5 μ l del segundo anticuerpo Anti-cabra IgG-FITC a todos los tubos y se incubó nuevamente por 20 min a 4°C protegido de la luz. Finalmente se lavaron con washing buffer y se resuspendió el contenido de los tubos en 300 μ l de paraformaldehído al 1%, y se guardaron a 4°C con papel aluminio. Se incluyó un control de isotipo.

Las células se analizaron en un citómetro FACSCalibur (BD, San José, CA) para lo cual se adquirieron al menos 20,000 eventos y se analizaron con el software Cell-Quest (BD).

8.5 Determinación de TNF- α

La cantidad de TNF- α secretada al medio se determinó a través de la técnica de ELISA, la cual consiste primero en diluir 1:500 el anticuerpo de captura, para esto se toman 5mL de PBS (Lonza, Walkersville, MD) y se les adiciona 10 μ L de anticuerpo anti-human TNF- α (Pharmingen, San José), posteriormente se ponen 50 μ L de dilución a cada pozo de la placa de ELISA (Maxisorp F96, Nunc) de manera uniforme en el pozo. Después se cubre con parafilm y se incuba a 4°C toda la noche. Al día siguiente se desecha la solución del anticuerpo y se lavan 3 veces con PBS 0.01M, pH 7.2, Tween-20 al 0.05%, una vez lavada la placa, se adicionan 100 μ L de superbloc (Pierce, Rockford, IL) a cada pozo y se prosigue a cubrir la placa con Parafilm para incubarla a 37°C durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó la placa 3 veces con PBS 0.01M, pH 7.2, Tween-20 (Jackson) al 0.05%, con esta solución se llenó todo el pozo y después se aspiró el líquido totalmente, una vez seca la placa perfectamente, se adicionaron por duplicado en cada pozo 50 μ l de cada muestra, los estándares y blancos, nuevamente se cubrió la placa con parafilm y se incubó por 2 hrs en las mismas condiciones la placa.

Se lavó la placa 3 veces con PBS 0.01M, pH 7.2, Tween-20 al 0.05%, llenando los pozos y aspirando después todo el líquido, se secó la placa y se adicionó el anticuerpo secundario diluido (anti TNF- α -biotina) 1:1000 en PBS 0.01M pH 7.2,

Tween20 al 0.05%, BSA 2%, lo que equivale a 5 μ L de anticuerpo en 5ml, por lo que se pusieron 50 μ L por pozo. Una vez mas se tapó con parafilm la placa y se incubó a temperatura ambiente por 45min, se lavó en esta ocasión 6 veces la placa con PBS 0.01M, pH 7.2; Tween-20 al 0.05%, llenando todo el pozo cada vez y secando perfectamente para luego adicionar la estreptavidina-fosfatasa alcalina (EAF, Jackson ImmunoResearch), la cual fue diluida 1:2000 en PBS 0.01M pH 7.2; Tween20 al 0.05%, BSA 2%, esto es 2.5 μ L de EAF en 5ml, se pusieron 50 μ L por pozo.

Se tapó la placa con parafilm y se incubó a temperatura ambiente por 30min, se lavó la placa 6 veces con PBS 0.01M, pH 7.2; Tween-20 al 0.05%, llenando todo el pozo cada vez y secando perfectamente, se adicionaron 50 μ L de substrato de fosfatasa (Sigma, St Louis, SA), se dejó desarrollar la reacción y se midió en un lector de ELISA a 405 nm. Se utilizó la absorbancia promedio de los duplicados para el cálculo de la concentración de acuerdo a la regresión lineal, que se reporta en pg/ml.

8.6 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con la prueba estadística suma de rangos de Wilcoxon, la cual es una prueba no paramétrica y se utiliza para comparar la mediana de pares de muestras relacionadas, por lo que se utilizaron las opciones de valores pareados y no paramétricos del programa GraphPad Prism (versión 5 para Mac).

9. RESULTADOS

9.1 Expresión de TLR4 y NOD2 en MN, MA y MDM.

Primero probamos que las células en estudio expresan los receptores TLR4 y NOD2. Tanto MA, como MN y MDM recién obtenidos tienen una expresión basal de ambos receptores, la de TLR4 se había reportado previamente, como se muestra en la figura 8 (Juárez, Esmeralda., 2010).

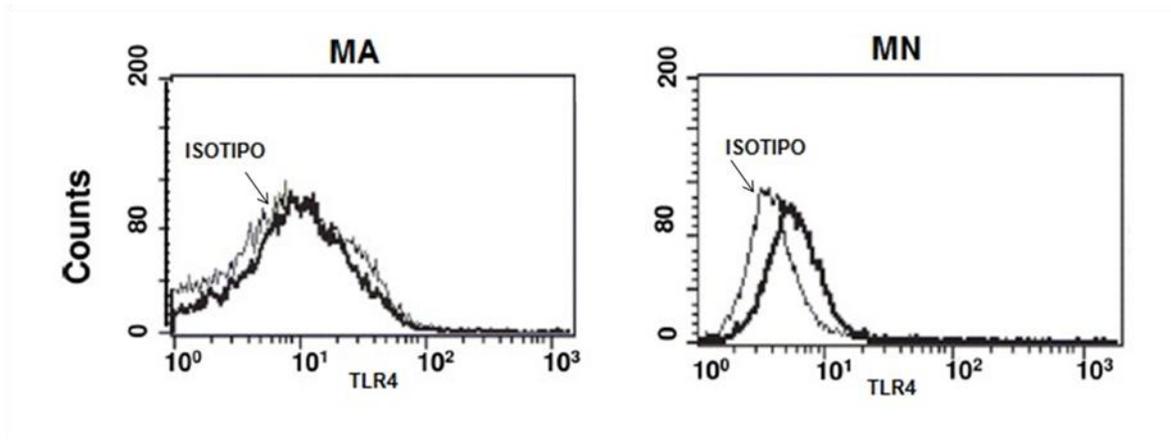


Fig 8. Expresión de TLR4 en la superficie de macrófagos alveolares y monocitos humanos.

Los MN y los MA fueron analizados por citometría de flujo y anticuerpos murinos anti-TLR4 y su correspondiente control (isotipo en líneas color gris). El histograma es representativo de 8 experimentos independientes. Imagen utilizada con permiso de E. Juárez.

En este trabajo determinamos la expresión de NOD2, mostrada en el histograma correspondiente a la figura 9 y observamos que los tres tipos de células expresan niveles citoplásmicos de NOD2.

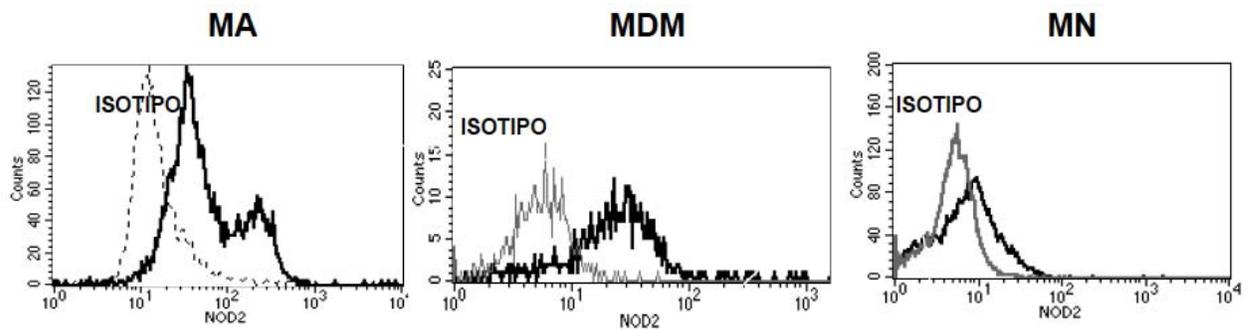


Fig 9. Expresión basal de NOD2 en MA, MDM y MN. A las células se les realizó una tinción intracelular para citometría de flujo con el anticuerpo anti-NOD2 (2.5µl de anticuerpo por cada 5x10⁵ células) y el isotipo correspondiente. Se adquirieron 20,000 eventos representativos de 3 experimentos independientes.

9.2 Expresión de TNF- α en respuesta a la estimulación de TLR4 y NOD2.

Primero cuantificamos la expresión de TNF- α producida en condiciones basales (medio) y con las células estimuladas con los ligandos de estudio (LPS y MDP), medimos la cantidad de dicha citocina en cada condición y así determinamos si las células responden a la estimulación. En condiciones basales (medio) los MN producen 100.5pg/ml (0 – 1423 pg/ml), los MDM producen 31.30pg/ml (0 – 160.5 pg/ml) y los MA .4050 pg/ml (0 – 172.6 pg/ml).

Observamos que los MA, MDM y MN producen cantidades significativas de TNF- α a las 24h de estimulación con su respectivo ligando, $p < 0.05$ vs. MED (medio) (Fig 10). Los MN (n= 11) tratados con 100ng/ml de LPS produjeron cantidades significativas de TNF- α (mediana 2543pg/ml, rango: 173.6 – 9196 pg/ml, $p = 0.0010$). Los MDM (n = 7) tratados con 100 ng/ml de LPS, también tuvieron una respuesta con una producción de TNF- α en esta misma condición (mediana 335.5 pg/ml, rango: 90.86 – 2448pg/ml), aunque la producción no alcanzó significancia estadística. Los MA (n=6) activados con 100ng/ml de LPS, mostraron también aumento significativo en la expresión de TNF- α como respuesta a la activación con LPS (mediana 3946pg/ml, rango: 1026 – 16903pg/ml, $p = 0.0313$).

Ahora bien, expresión de TNF- α en presencia del ligando de NOD2 (10 μ g de MDP) en MN, fue de 242.4pg/ml (con un rango de 0 – 5546pg/ml), esto comparado contra el medio dio un valor de $p = 0.0020$. En MDM la producción que se obtuvo de TNF- α , cuando se estimula con 10 μ g de MDP, fue de una mediana

de 0pg/ml (rango: 0 – 118.2pg/ml), en este caso el comportamiento no fue estadísticamente significativo.

Los MA tratados con 10 μ g de MDP produjeron 290.8pg/ml (104.8 – 1642pg/ml), aquí la producción de TNF- α fue estadísticamente significativa (p=0.0313).

También se generó una respuesta significativa entre las condiciones LPS y MDP en MN (p=0.0029), MDM (p=0.0313) y MA (p=0.0313).

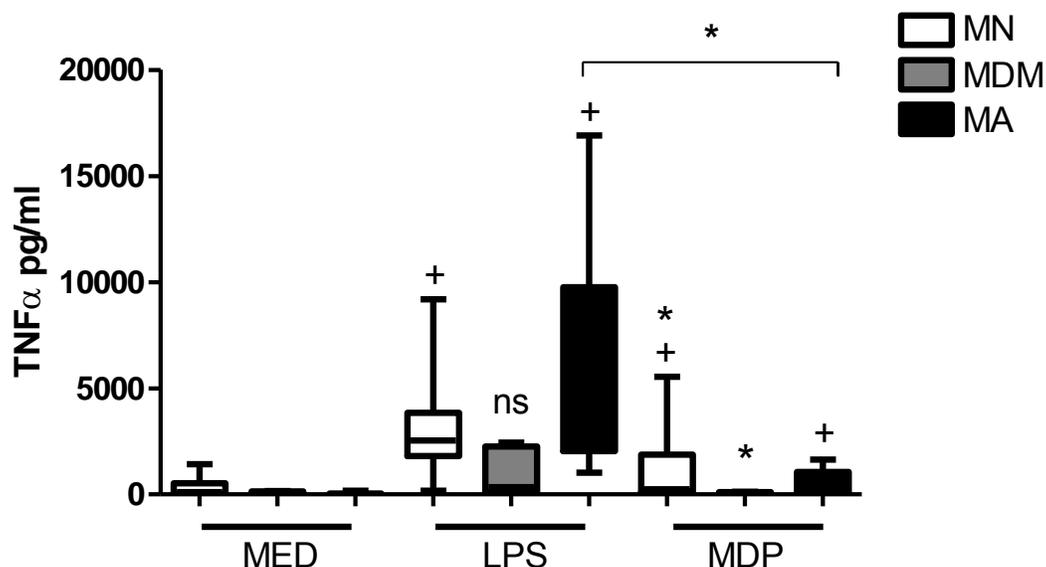


Fig 10. Producción de TNF- α en los 3 tipos celulares. Los monocitos (MN), macrófagos derivados de monocitos (MDM) y macrófagos alveolares (MA) fueron estimulados con 100 ng/ml de LPS, o con 10 μ g/ml de MDP durante 24hrs. La producción de TNF- α se determinó en los sobrenadantes por el método de ELISA. N=6-11, +p<0.05 vs medio, *p<0.05 vs LPS, ns= no significativo.

9.2 Producción de TNF- α en respuesta a la administración diferida de LPS y MDP.

Para investigar si la interacción entre TLR4 y NOD2 genera una respuesta sinérgica o reguladora, estimulamos de manera diferida en el tiempo y en el orden los ligandos de esos receptores como se describe en la figura 5. Al estimular primero una hora con uno de los ligandos y seguido de la administración del segundo ligando, esperábamos analizar si había sinergismo o antagonismo entre ambas señales.

Observamos que en MA (Fig. 11A), la producción de TNF- α cuando el tratamiento con MDP se aplicó después de 1 hora de estimulación con LPS fue de una mediana de 2243 pg/ml, rango: 939.9 – 12109 pg/ml. Cuando se trataron las células con LPS por 24 horas después de haber agregado MDP por 1h, la mediana fue de 5129, rango: 1451 – 26969 pg/ml. Ambos valores son significativamente diferentes comparado con MDP solo ($p < 0.05$). La estimulación con MDP y LPS es equivalente a la respuesta observada al estimular solamente con LPS, independientemente del orden en el que se añadan los dos estímulos (no hay diferencia estadística significativa).

En MN observamos que el tratamiento con MDP después de haber estimulado las células con LPS durante 1h tampoco modifica la respuesta de TNF- α con respecto a los MN estimulados únicamente con LPS. La mediana obtenida con este tratamiento (LPS durante 1h y después MDP durante 24 horas) es de 2743 pg/ml; con un rango de 0 – 43775 pg/ml. En cambio, cuando se estimulan las células con

LPS durante 24 horas y posteriormente MDP durante otras 24 horas, la producción de TNF- α se abate significativamente ($p=0.0313$) comparada con la estimulación de LPS únicamente. En este caso se obtuvo una mediana de 159.3pg/ml; con un rango de 50.70 – 471 pg/ml (Fig.11B). No parece haber ningún efecto sobre la producción de TNF- α dependiente del reconocimiento de LPS cuando éste se añade después de MDP en ningún tiempo.

En MDM tampoco observamos un efecto del tratamiento con MDP sobre la respuesta al LPS en ningún tiempo y orden de adición de los estímulos. Esto es, se puede apreciar que la cantidad de TNF- α en la condición de LPS 1 hora y después MDP 24 horas, donde la producción de dicha citocina fue de 594.7 pg/ml (0 – 3682 pg/ml), es similar a la producción de TNF- α cuando sólo se estimularon las células con LPS, en este caso la producción de esa citocina fue de 375.7pg/ml (90.86 – 3353 pg/ml). También se pudo observar que la adición de MDP 24 h después de haber estimulado con LPS por 24h activa significativamente la producción de TNF α ($p=0.0313$, comparado con el medio); en esta condición, la cantidad registrada de TNF- α fue de 253.7 pg/ml (0 – 1121 pg/ml) (Fig.11C).

Para efectos de comparación se muestra en la Fig. 11D que en MN la re-estimulación con LPS tanto 1 como 24 h después del estímulo inicial con LPS abate la producción de TNF- α (este fenómeno se denomina tolerancia a la endotoxina), efecto que se replica cuando se adicionan simultáneamente ambos ligandos. En los MDM no se aprecian diferencias en la estimulación diferida de

LPS y MDP con la estimulación simultánea de ambos ligandos y la tolerancia a la endotoxina se observa sólo a las 24 h de la re-estimulación.

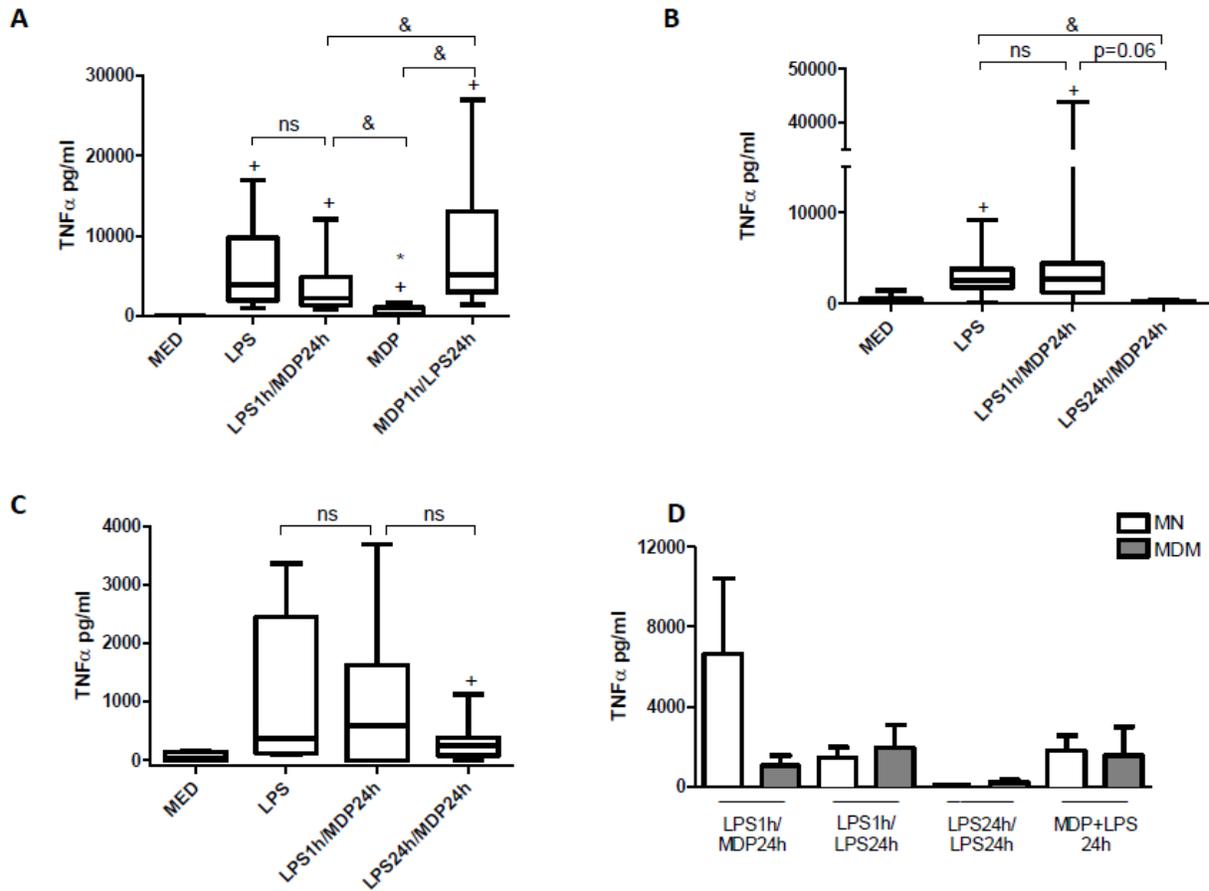


Fig 11. El receptor NOD2 como proteína reguladora en el proceso inflamatorio de MA (Fig 11A), MN (Fig 11B) y MDM (Fig 11C). Las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS y 10 μ g/ml de MDP, la producción de TNF- α fue medida en los sobrenadantes de cada condición mostrada en la gráfica y determinada a través de la técnica de ELISA. N=6-11. +p<0.05 vs medio, *p<0.05 vs LPS, &p<0.05 vs condiciones especificadas, ns= no significativo. Se utilizó la prueba estadística suma de rangos de Wilcoxon.

9.3 Participación del inflamasoma y la PI3K en la interacción entre TLR4 y NOD2 en la producción de TNF α

Debido a que las vías de señalización de TLR4 y NOD2 no convergen hasta la activación del IKB para traslocar el NFkB, exploramos dos posibles interacciones entre ellos: el inflamasoma por estimulación autócrina y la activación de las MAP cinasas. Para ello utilizamos dos inhibidores de ambos procesos; en el caso del inflamasoma, utilizamos el inhibidor z-vad-fmk para inhibir a la caspasa 1 y en el caso de las MAP cinasas, utilizamos el inhibidor wortmanina para inhibir a la PI3K. Para conocer si la molécula PI3K jugaba un papel relevante en nuestro fenómeno de estudio, la inhibimos en distintas condiciones y con diferencia también en el tiempo. Se incluyen como referencia los valores obtenidos con la estimulación con LPS por 1 o 24 h seguido de la estimulación con con MDP por otras 24 h.

Los resultados al inhibir la PI3K mostraron que tanto en MN (Fig. 12A) como en MDM (Fig. 12B), la administración incluso diferida del inhibidor de la cinasa PI3K, es decir, el inhibidor wortmanina, parece disminuir la producción de TNF- α , pero este efecto no fue significativo. De modo que la inhibición de PI3K no modifica los efectos observados en ausencia del inhibidor.

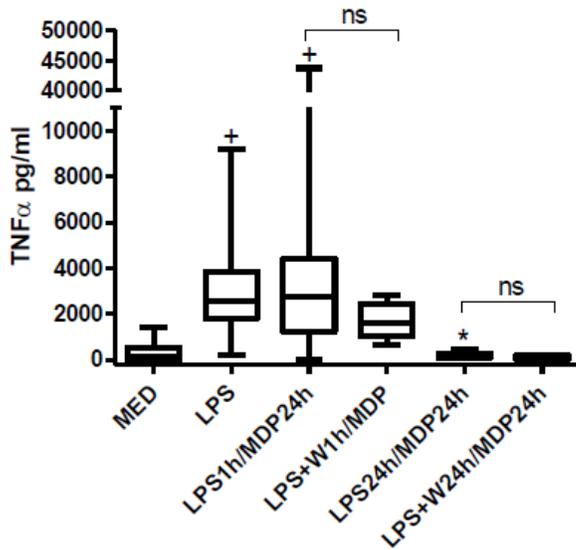
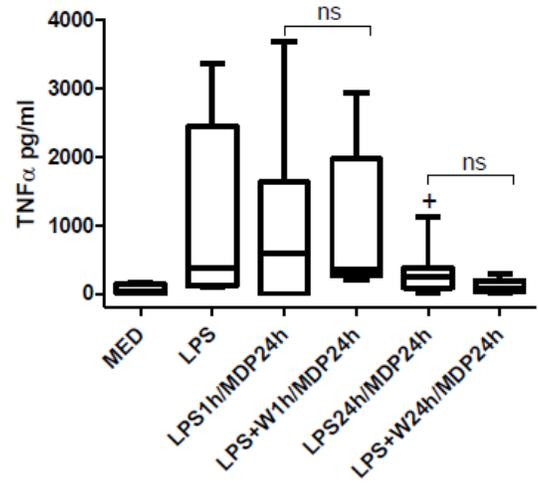
A**B**

Fig 12. Papel de PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) en MN (Fig 12A) y en MDM (Fig 12B). Las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS y 10 μ g/ml de MDP. En algunas condiciones se preincubó con W (wortmanina) 100 ng/ml antes de agregar LPS. La producción de TNF- α fue medida en los sobrenadantes de cada condición mostrada en la gráfica y determinada a través de la técnica de ELISA: N=6-11, +p<0.05 vs medio, *p<0.05 vs LPS, ns= no significativo.

En cuanto al inflamasoma, en MN observamos que no hay ningún cambio en la cantidad de TNF- α cuando las células son preincubadas con el inhibidor Z-VAD (Fig.13A). Así mismo, en MDM, ocurre un comportamiento similar, el inhibidor Z-VAD tampoco modifica la cantidad de TNF- α de manera significativa en ninguna de las condiciones evaluadas (Fig.13B).

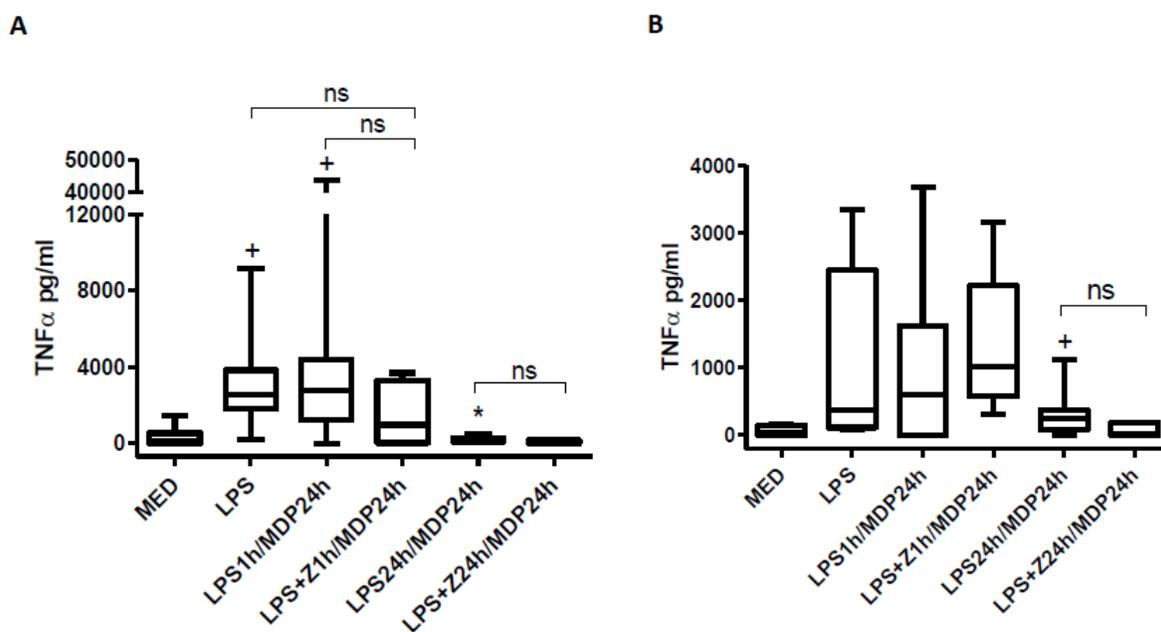


Fig 13. Papel del inflamasoma en MN (Fig 13A) y en MDM (Fig 13B). Las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS y 10 mg/ml de MDP y en algunas condiciones, se preincubó con Z (Z-vad-fmk) 20 μ M antes de agregar LPS. La producción de TNF- α fue medida en los sobrenadantes de cada condición mostrada en la gráfica y determinada a través de la técnica de ELISA. N=6-1, +p<0.05 vs medio, +p<0.05 vs LPS, ns= no significativo.

10. DISCUSIÓN

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (García, P. 2008). Los MN, que se encuentran en sangre y en su estado de madurez se convierten en macrófagos (que pueden residir en tejidos y órganos particulares como las mucosas) y los MA, tienen como función proteger al pulmón contra patógenos, generalmente mediante el mecanismo de inflamación; no obstante, el proceso inflamatorio exagerado bloquea distintos mecanismos críticos para la función de este tipo de células. (Zhao, Zhi-Jun., 2013).

En este trabajo se evaluaron las respuestas de tres estirpes celulares: (MN, MDM y MA ante los estímulos específicos de los receptores en estudio (TLR4 y NOD2), mismos que participan en el proceso inflamatorio. Se estableció la respuesta ligando-específica al comparar la producción de TNF- α en respuesta a los ligandos LPS y MDP con la de las células no estimuladas (Figura 9). Los tres tipos celulares respondieron a los estímulos aplicados, lo cual significa que no sólo expresaban ambos receptores (determinado por la expresión de los mismos) sino que además ambos eran receptores funcionales.

Los valores más altos de producción de TNF α se obtuvieron en la condición de LPS para los tres tipos celulares (Figura 10), y este trabajo propuso que MDP podía ser usado como tratamiento para modular disminuyendo la producción de

TNF- α en nuestro sistema de estudio, ya que estudios señalan que en el modelo murino, el receptor NOD2 es un regulador negativo de la respuesta de TLR2 (Watanabe, Tomohiro., 2006), esto nos sugiere que posiblemente también lo sea de TLR4.

Al evaluar la respuesta de los MA encontramos que cuando utilizamos MDP como tratamiento después de haber agregado LPS por 1 hora, no se modificó la producción de TNF- α , aunque se observó una tendencia a la disminución de la misma comparado con la estimulación con LPS; probablemente se debe a que el tamaño de la muestra fue pequeño. En cambio, cuando se estimularon los MA primero con MDP y después con LPS (Figura 11A), se observó un aumento significativo de la producción de TNF- α lo que sugiere que el orden y temporalidad en la que las células son estimuladas influye sobre el grado de activación, en este caso se aprecia sinergismo. Cabe mencionar que debido a la naturaleza de los MA y a la dificultad de conseguir estas células, no tuvimos el suficiente número de ellas para probar otras condiciones experimentales.

Los MN que fueron estimulados con LPS por 1 h y después tratados con MDP mantuvieron la producción de TNF- α comparable a la inducida por LPS solo. Sin embargo, cuando se usa el mismo tratamiento (MDP durante 24 horas) después de estimular las células previamente con LPS durante 24 horas (Figura 11B), se aprecia una disminución significativa en la cantidad de TNF- α . En este caso la cantidad de TNF- α obtenida es similar a la del medio, por lo que podemos hablar

de una posible tolerancia cruzada entre ambos receptores (TLR4 y NOD2). Es sabido que los PAMPs pueden interactuar entre sí disminuyendo las respuestas celulares que pueden causar daño al hospedero (Underhill, D., 2007), por tanto esta tolerancia puede ser requerida para controlar el proceso inflamatorio y así proteger al hospedero. En este caso, ese resultado se asemeja al de las células estimuladas con LPS y re-estimuladas con LPS (Fig.11D) que por definición se conoce como tolerancia a la endotoxina.

Los MDM son bajos productores de TNF- α , aún así producen cantidades significativas de éste en respuesta a MDP y también responden considerablemente a la estimulación con LPS solo, aunque no de manera significativa. Al igual que los MA y MN, en los MDM no hay un efecto de la estimulación con MDP posterior a la de LPS sobre la producción de TNF α (Figura 11C); sin embargo la tolerancia que se observó en los MN al estimular 24 h con LPS seguido de estimulación con MDP no se observa en éstas células. Los macrófagos cuando son estimulados con LPS, éstos quedan temporalmente incapaces de responder a una nueva estimulación del propio LPS (Liew, Foo., 2005), por lo que la tolerancia a este PRR es benéfica porque se vuelve protectora contra enfermedades inflamatorias crónicas debido a que el LPS es responsable de diversos desórdenes inflamatorios. Sin embargo, al mismo tiempo incapacita a los macrófagos para responder a una nueva infección, lo cual hace evidente que existe una fina línea entre la respuesta inmune eficaz y el daño causado por el propio sistema inmune. Aunque algunos reportes indican que los macrófagos

murinos y los monocitos humanos estimulados simultáneamente con los ligandos de TLRs y NODs potencian la producción de citocinas proinflamatorias (Ferweda, G., 2005), nuestros resultados no nos permiten corroborar tal información.

Se conoce que la estimulación con MDP de macrófagos murinos que previamente se hicieron tolerantes por exposición a LPS induce la producción de grandes cantidades de citocinas proinflamatorias revirtiendo la tolerancia. La producción de estas citocinas es sorprendente porque en general MDP es un pobre inductor de TNF- α en los mismos macrófagos murinos (Kim, Yun-Gi, 2008). Esto concuerda con lo encontrado en nuestro sistema de estudio, donde tampoco los MDM produjeron TNF- α de manera significativa cuando fueron estimulados con LPS, ni con MDP por separado (datos no mostrados) pero al mismo tiempo contrasta con la parte de sinergismo reportada en el trabajo de Kim y cols, porque nosotros no observamos incremento en la producción de TNF- α al añadir ambos estímulos. Es posible que la razón por la que observamos bajas respuestas en los MDM se relacionen con el hecho de que los MA y los MN tienen mayor expresión de los TLR (Visintin, Alberto., 2001), los cuales producen mayores cantidades de TNF- α en respuesta a la estimulación con LPS.

Se conoce que la molécula PI3K inhibe la señalización de varios TLR en células dendríticas de ratón, entre ellos el TLR4 (aunque no se conoce el mecanismo preciso) (Fukao, T., 2002), por esta razón pensamos que podría estar involucrada en nuestro sistema de estudio. Sin embargo, nuestros resultados muestran que esta molécula no afecta las vías de señalización estudiadas, pues tanto en MN

(Fig. 12A) como en MDM (Fig. 12B), la cantidad de TNF- α producida al inhibir la PI3K (con su inhibidor wortmanina) no es estadísticamente distinta a las condiciones probadas sin el inhibidor. Quizás si se aumenta el tamaño de muestra, nuestros resultados puedan ser concluyentes.

La secreción de IL1- β es altamente regulada por el inflamasoma que contiene proteínas de la familia NLR y es inducida por MDP (Yang, Chul-Su., 2012), es por ello que decidimos estudiar esta vía alterna de señalización. Encontramos que en MN (Figura 13A) y en MDM (Figura 13B), la caspasa 1 (evaluada por bloqueo con z-vad-fmk) no participa en la respuesta inicial al LPS y tampoco participa en la producción de TNF- α producida por re-estimulación con MDP.

En general, nuestros resultados indican que es posible que NOD2 sea un regulador negativo de la respuesta inflamatoria ocasionada por TLR4 en macrófagos alveolares humanos solamente.

Controlar las vías de señalización estudiadas, de modo que exista una regulación en el proceso inflamatorio sin que haya una pérdida de la respuesta protectora del mismo, es de vital interés clínico. Sin embargo, habrá que realizar más experimentos para poder lograrlo. Además, será necesario determinar si esta interacción afecta la capacidad de enfrentar nuevas infecciones, es decir, si se afecta o no la actividad bactericida del macrófago humano y, de esta manera poder definir su uso terapéutico.

11. CONCLUSIONES

1. En MN, MDM y MA el tratamiento con MDP posterior a la activación con LPS tiene una tendencia a modular la respuesta inflamatoria disminuyendo la expresión de TNF- α .
2. La exposición crónica de los estímulos, deja a los MN y MDM incapaces de responder a una activación subsecuente, por lo que dejan de producir TNF- α .
3. Tanto la Caspasa 1 como la PI3K no parecen estar vinculadas en el fenómeno de regulación de la interacción TLR4-NOD2.
4. NOD2 podría ser un regulador negativo de la respuesta inflamatoria crónica producida por LPS en MØ humanos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Fritz, J. H., Giardin, S. E. Fitting, C., Werts, C., Mengin-Lecreulx, D. Caroff, M., Cavaillon, J. M., Philpott, D. J. and Adibb-Conguy, M. (2005). Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2- activating agonists. *Eur. J. Immunol.*, 35, 2459-2470.
2. Schauer, D., Starlinger, P., Reiter, C., Jahn, N., Zajc, P., Buchberger, E., Bachleitner-Hofmann, T., Bergmann, M., Stift, A., Gruenberger, G., Brostjan, C. (2012). Intermediate Monocytes but not TIE-2 Expressing Monocytes Are a Sensitive Diagnostic Indicator for Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 7 (9), 1-10.
3. Vereyken, E., Heijnen, P., Baron, W., Vries, E., Dijkstra, C., Teunissen, C. (2011). Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 1-16.
4. Hiruma, H., Hikawa, S., Kawasami, T. (2012). Immunocytochemical Colonization of Fibroblast Growth Factor-1 with Neurotrophin-3 in Mouse Alveolar Macrophages. *Acta Histochem. Cytochem*, 45, 131-137.
5. Wolff, H. (2011). Innate Immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles. *Int. J. Bio. Sci.*, 7, 261-264.
6. Lopez-LArrea, C., Gonzalez, S., González, A., Suárez, B., López, A., Huergo, L. (2011). Conceptual aspects of self and nonself discrimination. *LandesBioscience*, 19-24.

7. Turvey, S., Broide, D. (2010). Chapter 2: Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol*, 125, 24-32.
8. Hernández, J., Urcuqui, S. (2012). Activación y regulación del inflamasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia*, 380-386.
9. Valen, G. (2010). Innate immunity and remodeling. *Heart Fail Rev.*, 16, 71-78.
10. Roy, I., Evans, D., Dwinell, B.. (2014). Chemokines and chemokine receptors: Update on utility and challenges for the clinician. *Surgery*, 1-10.
11. Banda, N. K., Levitt, B., Glogowska, M. J., Thurman, J. M., Takahashi, K., Stahl, G. L., Tomlinson, S., Arend, W. P., Horles, V. M. (2009). Targeted inhibition of the complement alternative pathway with complement receptor 2 and factor H attenuates collagen antibody-induced arthritis in mice. *J Immunol.*, 183, 59928-37
12. Spentzas, T., Shapley, R., Acuna, C., Meals, E., Lazar, L., Rayburn, M., Walker, B., English, K. (2011). Ketamine inhibits tumor necrosis factor secretion by RAW264.7 murine macrophages stimulated with antibiotic-exposed, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Immunology*, 1-9.
13. DeNardo, D., Andreu, P., Coussens, M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.*, 29, 309-316.
14. Dong, C., Zhao, G., Zhong, M., Yue, Y., Wu, L., Xiong S. (2013). RNA sequencing and transcriptional analysis of human monocyte to macrophage differentiation. *Gene*, 519, 279-287.

15. Zhao, Zhi-Jun., Zhang, J., Wei, J., Li, Z., Wang, T., Yi, Si-Qi., Shen, Ji-Long., Yang, Ting-Bao., Hide, G., Lun, Zhao-Rong. (2009). Lower Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Higher Expression of Arginase in Rat Alveolar Macrophages Are Linked to Their Susceptibility to *Toxoplasma gondii* Infection. *PLoS ONE*, 8, 1-11.
16. Sarma, J., Ward, P. (2011). The complement system. *Cell Tissue Res.*, 343, 227-235.
17. Xue, Q., Hellberg, M., Schey, K., Itoh, N., Eytan, R., Cooper, R., La Peyre, J. (2010). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 1-17.
18. Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Saunders. 6th edition. Barcelona España. Elsevier Saunders, 2008, págs. 329-336.
19. Kalliolias, G., Ivashkiv, L. (2010). Overview of the biology of type 1 interferons. *Arthritis Research & Therapy*, 12, 1-9.
20. Halfhide, C., Flanagan, B., Brearey, S., Hunt, J., Fonceca, A., McNamara, P., Howarth, D., Edwards, S. Smyth, R. (2011). Respiratory Syncytial Virus Binds and Undergoes Transcription in Neutrophils From the Blood and Airways of Infants With Severe Bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 204, 451-458.
21. Shegarfi, H., Naddafi, F., Mirshafiey, A. Natural Killer Cells and Their Role in Rheumatoid Arthritis: Friend or Foe? (2011). *The Scientific World Journal*, 204, 451-458.
22. Kobayashi, T., Kouzaki, H., Kita, H. (2010). Human eosinophils recognize the endogenous danger signal crystalline uric acid and produce

- proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J. Immunol.*, 184, 6350-6358.
23. Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J. (2009). The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol*, 27, 229-265.
24. Iwasaki, A., Medzhitov, R., (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 10, 987-995.
25. Gyu K., Joong, L., Kagnoff, M. (2004). Nod1 Is an Essential Signal Transducer in Intestinal Epithelial Cells Infected with Bacteria That Avoid Recognition by Toll-Like Receptors. *Infection and Immunity*, 72, 1487-1495.
26. Juárez, E., Sullivan, J., Torres, M., Sada, E. (2009). Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Rev. Inst. Nat. Enf. Resp. MEx.*, 22. 366-378.
27. Li, J., Ye, L., Cook, D., Wang, X., Liu, J., Kolson, D., Persidsky, Y., Ho, Wen-Ze. (2011). Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages. *Journal of Neuroinflammation*. 8, 1-9.
28. Koch, L., Hofer, S., Weigand, M., Frommhold, D., Poeschl, J., Ruef, P. (2012). Inhibition of LPS-Induced Activation of Coagulation by p38 MAPK Inhibitor. *ISRN Hematology*, 2012, 1-5.
29. Figueroa, L., Xiong, Y., Song, C., Piao, W., Vogel, S., Medvedev, A. (2012). The Asp299Gly Polymorphism Alters TLR4 Signaling by Interfering with Recruitment of Myd88 and TIR domain-containing adapter inducing IFN- β . *J. Immunol.*, 188, 4506-4515.

30. Kawai, T., Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34, 637-650.
31. Liew, F., Xu, D., Brint, E., O'Neill, L. (2005). Negative regulation of Toll-Like Receptor-Mediated Immune Responses. *Nature*, 5, 446-458.
32. Kim, Min-Sun, Bae, Gi-Sang, Park, Kyoung-Chel, Soon, B., Kim, Byung-Jin, Lee, Hye-Jin, Seo, Sang-Wan, Kook, Y., Jung, Won-Seok, Cho, Jung-Hee, Kim, Youn-Chul, Song, Ho-Joon, Park, Sung-Joo. (2012). Myrr Inhibits LPS-Induced Inflammatory Response and Protects from Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
33. Kulberg, B., Ferweda, G., De Jong, D., Drenth, J., Joosten, L., Van der Meer, J., Netea, M. (2007). Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli. *Immunology*, 123, 600-6005.
34. Azzam, N., Nounou, H., Alharbi, O., Aljebreen, A., Shalaby, M. (2012). CARD15/NOD2, CD14 and Toll-like 4 Receptor Gene Polymorphisms in Saudi Patients with Crohn's Disease. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 4268-4280.
35. Hedl M. et al. Chronic stimulation of NOD2 mediates tolerance to bacterial products. (2007). *Proc Nat Acad Sci*, 49, 19440-19445.
36. Povovsky, C., Pfalzer, V., Lahr, G., Hendrik, J., Klaus, J., Mayer, B., Debatin, Klaus-Michael, Von Boyen, G. (2013). Age-of-onset-dependent influence of NOD2 gene variants on disease behavior and treatment in Crohn's disease. *BMC Gastroenterology*, 13, 1-10.

37. Strober, W., Murray, P., Kitani, A., Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Immunology*, 6, 9-19.
38. Hajishengallis, G., Lambris, J. (2011). Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Immunology*, 11, 187-198.
39. Underhill, D. (2007). Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunological Reviews*, 219, 75-87.
40. Bleuter, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.* 40, 845-859.
41. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
42. Creagh EM, O'Neill LA. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: A trinity of pathogen sensor that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.*, 27, 352-357.
43. O'Neil, L. A. J. (2006). Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 549-563.
44. Chen et al. 2010. Icaritin Derivate Inhibits Inflammation through Suppression of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B Pathways. *Biol. Pharm. Bull.* 33(8), 1307-1313.
45. Shen et al. 2010. Nuclear Factor- κ B/Signal Transducers and Activators of Transcription-1-Mediated Inflammatory Responses in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages Are a Major Inhibitory Target of kahweol, a coffee Diterpene. *Biol. Pharm. Bull.* 33(7), 1159-1164.
46. Wissinger et al. 2008 Manipulation of acute inflammatory lung disease. *Mucosal Immunol*, 1(4), 265-278.

47. Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J. & Strober, W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunol.* 2004, 5: 800-808.
48. Rosenstiel et al. Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in Intestinal Epithelial Cells Modulates Bacterial Recognition and Invasion. *J Immunol*, 2007, 178, 8203-8211.
49. Ferwerda, G., Giardin, S.E., Kullberg, B. J., Le Bourhis, L., de Jong, D. J., Langenberg, D. M., Van crevel, R., Adema, G. J., Ottenhoff, T. H., Van der Meer, J. W., and Netea, M. G. (2005) NOD2 and Toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.* 1, 279-285.
50. Hedl M. et al. Chronic stimulation of NOD2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2007, 49 (104), 19440-19445.
51. Kim, Y., (2007). The Cytosolic Sensors NOD1 and NOD2 Are Critical for Bacterial Recognition and Host Defense after Exposure to Toll-like Receptor Ligands. *Immunity* 28, 246-257.
52. García, P. (2008). Inflamación. *Rev. R. Acad. Cienc. Fís. Nat. (Esp)*., 102, 91-159.
53. Zhao, Zhi-Jun., Zhang J., Wei, J., Li, Z., Wang, T., Yi, S., Shen, J., Yang, T., Hide, G., Lun, Z. Lower Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Higher Expression of Arginase in Rat Alveolar Macrophages Are Linked to Their Susceptibility to *Toxoplasma gondii* Infection. *PLOS one*. 1-4.

54. Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J., Wyllie, D., Dower, S., Segal, D. (2001). Regulation of Toll-Like Receptor in Human Monocytes and Dendritic Cells. *J. Immunol.*, 166, 249-255.
55. Fukao, T. (2002). PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nature Immunol.*, 3, 875-881.
56. Yang, Chul-Su., Shin, Dong-Min., Jo, Eun-Kyeong. (2012). The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int. Neurol. J.*, 16, 2-12.
57. Beutler B, Jiang Z, Gerogel P, Crozat, K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu. Rev. Immunol* 2006;24:353-389.
58. Scumpia, P. O., M. J. Delano, et al 2007. Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptative immune dysfunction in sepsis. *Blood* 110: 3673-3681.
59. Cheadle, W. G., M. J. Hershman, S. R. Wellhausen, and H. C. Polk, Jr. 1991. HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection. *Am. J. Surg.* 161: 639-645.
60. Livingston, D. H., S. H. Appel, et al. 1998. Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch. Surg.* 123: 1309-1312.
61. West, M. A., and A. Koons. 2008. Endotoxin tolerance in sepsis: concentration-dependent augmentation or inhibition of LPS-stimulated macrophage TNF secretion by LPS pretreatment. *J. Trauma* 65: 893-898, discussion 898-900.

62. Monneret, G., F. Venet, A. Pachot, and A. Lepape. 2008. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med.* 14: 64-78.
63. Deleano, et al. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *The Journal of immunology*, 2011, 186: 195-202.
64. Tracey, K. J. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234, 470-474 (1986).
65. Delclaux, C., Azoulay, E., (2003). Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *European Respiratory Journal.*, 22, 10-14.
66. Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Publishing Group.*, 8, 675-680.
67. Windheim, M., Lang, C., Peggie, M., Plater, L., Cohen, P. (2008). Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem. J.*, 404, 179-190.
68. Wolfert, M., Murray, T., Boons, G., Moore, J. (2002). The Origin of Synergistic Effect of Muramyl Dipeptide with Endotoxin and Peptidoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 39179-39186.
69. Park, Jong-Hwan., Kim, Yun-Gi., Shaw, M., Kanneganti, T., Fujimoto, Y., Fukase, K., Inohara, N., Núñez, G. (2007). Nod1/RICK and TLR signaling Regulate Chemokine and Antimicrobial Innate Immune Responses in Mesothelial Cells. *The Journal of Immunology*, 179, 514-521.