



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación de TLR-2 como marcador de identificación de monocitos humanos clásicos y no-clásicos en ensayos funcionales y preeclampsia

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JULIO CÉSAR FLORES GONZÁLEZ



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

VOCAL: **Profesor: Julio César Martínez Álvarez**

SECRETARIO: **Profesor: Ismael Mancilla Herrera**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Mario Adán Moreno Eutimio**

2° SUPLENTE: **Profesor: Octavio Castro Escamilla**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA TORRE DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA “ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES”.

ASESOR DEL TEMA: DR. EN C. ISMAEL MANCILLA HERRERA

.....
(Nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): JULIO CÉSAR FLORES GONZÁLEZ

.....
(Nombre (s) y firma (s))

Dedicatoria

*A quien me medio la fortaleza para seguir adelante cuando al caer no podía levantarme,
a quien me enseñó a confiar en mí y construir caminos cuando el sendero terminaba,
a quien conociendo lo peor de mi naturaleza humana se quedó y creyó en todo lo que
podía lograr.*

*A mis padres Josefina y Rutilio por ese apoyo incomparable en mi formación profesional
y humana.*

A mis hermanos para que estén orgullosos y seguros de que nunca les fallare.

*Al Dr. Ismael a quien con toda la humildad de mi corazón doy gracias por la amistad y
confianza que ha depositado en mi persona. Como tutor y maestro me ha guiado en el
trayecto por el fascinante universo llamado Inmunología.*

Agradecimientos

Una persona puede realizar notables descubrimientos pero el trabajo en equipo enriquece las ideas y proyectos para convertirlos en avances científicos. La mayoría de las veces es notable que salte el humano egocentrismo que lleva a concentrar el reconocimiento del aporte realizado en una sola persona, sin embargo, es importante reconocer el mérito de las personas que trabajaron y aportaron nuevas ideas al proyecto a través de las críticas constructivas, el financiamiento de los recursos y en variadas ocasiones el esfuerzo conjunto para sacar adelante un propósito en particular. Por todo ello es para mí un privilegio agradecer a todas las personas e instituciones involucradas en el desarrollo de este proyecto que sin duda alguna aporta nuevas ideas al conocimiento de la ciencia en inmunología.

Al Dr. Ismael Mancilla por la oportunidad de pertenecer a su extraordinario equipo de investigación y participar directamente en los proyectos que realiza, su invaluable capacidad para desarrollar mis ideas no solo para concretar esta tesis sino también en mi formación como profesionista y futuro investigador.

Expreso mi sincera admiración y agradecimientos a los Dres. Enrique Ortega Soto y Julio César Martínez Álvarez que con sus aportaciones constructivas supervisaron el contenido temático de este escrito científico. Así mismo agradezco las atenciones cordiales recibidas por los Dres. Mario Adán Moreno y Octavio Castro.

A pQFB Jannett Romero y pBióloga Paulina Bautista, mis compañeras y amigas del laboratorio de Infectología e Inmunología del INPer, con quienes he crecido profesionalmente y me han ayudado a lo largo de este proyecto.

A pQFB Regina De La Cruz por haber estado conmigo en todo momento sin esperar nada a cambio, creyendo todo lo que puedo lograr al depositar su confianza en mí.

A los Dres. Héctor Flores y Shaik Castillo por su colaboración en la realización del proyecto inicial de preeclampsia.

RESUMEN

Los monocitos son células de origen hematopoyético pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear y son esenciales para iniciar, potenciar y limitar eventos inflamatorios. Estas células pueden ser identificadas por sus características morfológicas y, en humanos, por la expresión de moléculas en superficie como el Antígeno Leucocitario Humano (HLA)-DR, CD14 y CD16. A través de la técnica de citometría de flujo, se han descrito tres subpoblaciones de monocitos: clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermedios (CD14⁺CD16⁺) y no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺). Durante el análisis de muestras heterogéneas, la identificación puede ser difícil debido a que células como neutrófilos y/o células NK expresan marcadores en común. Además, en ensayos *in vitro* de células mononucleares estimuladas con inductores inflamatorios, así como en enfermedades que incluyen sepsis, aterosclerosis, obesidad, enfermedades cardiovasculares y preeclampsia, los leucocitos modifican la expresión de las moléculas en superficie, lo cual dificulta aún más su estudio. Por lo anterior, la búsqueda de marcadores cuya expresión sea estable y estrategias de análisis que permitan identificar y clasificar a los monocitos específicamente con mayor facilidad es crítico para su correcta interpretación, ya que estas células son un enfoque prometedor para la descripción de la fisiopatología, el diagnóstico y pronóstico de diversas enfermedades.

El Receptor Tipo Toll (TLR)-2 es una molécula cuya expresión es estable durante los eventos inflamatorios y permite distinguir a las células mieloides entre sí. Por ello, el objetivo de este trabajo fue establecer un algoritmo alternativo para la identificación de monocitos a través de TLR-2 y aplicarla en ensayos de estimulación *in vitro* y en la descripción de marcadores de activación de monocitos en una enfermedad inflamatoria. A través del inmunomarcaje multiparamétrico de los antígenos de superficie CD45, HLA-DR, CD14, CD16 y TLR-2 de células de sangre periférica comparamos la estrategia convencional de análisis (E1) con el alternativo (E2) en muestras de sangre periférica de individuos sanos, en células mononucleares activadas *in vitro*, y en la evaluación de la expresión de Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (TREM)-1 y CD11b de monocitos de mujeres con preeclampsia como enfermedad inflamatoria. La estrategia E2 presenta ventajas sobre E1 al incluir todas las células mononucleares

en el análisis y excluir a las células de origen linfoide, así como neutrófilos poco granulares, por la co-expresión de HLA-DR y TLR-2. De esta manera, las subpoblaciones se clasificaron como: clásicos “HLA-DR⁺TLR-2⁺CD16⁻”, intermedios HLA-DR⁺TLR-2⁺CD16⁺” y no-clásicos “HLA-DR⁺TLR-2⁺CD16⁺⁺”. Además, observamos que E2 permite identificar de manera más precisa a monocitos incluso en estados activados por inductores inflamatorios. En el caso de la descripción de los marcadores de activación de monocitos, encontramos que la expresión de TREM-1, CD11b, CD16, HLA-DR y TLR-2 es mayor en mujeres con preeclampsia en comparación con mujeres normotensas de la misma edad gestacional,

La determinación de monocitos por E2 permite identificar y caracterizar a las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en ensayos de activación celular “*in vitro*” y en preeclampsia de una manera más sencilla y más objetiva de la selección de las poblaciones encontrando resultados similares a los de la estrategia E1.

ABREVIATURAS

BFA-A	Brefeldina A, del ingles
CD	Cluster de diferenciación, del inglés.
CSMP	Células mononucleares de sangre periférica
HSC	Células madre hematopoyéticas, del inglés.
HLA	Antígeno leucocitario humano
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Protein-cinasas activadas por mitógenos
NF-KB	Factor nuclear kB, del inglés.
TLR	Receptores tipo Toll, del inglés.
PE	Preeclampsia
PMN	Polimorfonucleares
IMF	Intensidad media de fluorescencia

ÍNDICE

I.- Antecedentes	Paginas
Funciones y Caracterización	1
Perspectivas del modelo murino: Función y mecanismos en la respuesta inmune innata.....	6
II.- Identificación de Monocitos por Inmunomarcaje	
Citometría de flujo, una herramienta de trabajo	10
Inmunofenotipificación de monocitos	11
Dificultades para la identificación y caracterización de monocitos por citometría de flujo.....	16
III.- Preeclampsia como enfermedad inflamatoria	
Un problema de salud publica	21
La participación de los monocitos durante el embarazo.....	22
Monocitos y Preeclampsia.....	25
Justificación.....	27
Planteamiento del problema.....	27
Hipótesis	27
Objetivos	
Objetivo general	28
Objetivos particulares.....	28
Material y métodos	
Esquema general de trabajo	29
Sujetos de estudio.....	29
Obtención de la muestra.....	30
Estrategia de análisis clásica (E1) por citometría de flujo	30
Inmunofenotipificación por citometría de flujo.....	31
Descripción de variables.....	32
Especificación de los equipos utilizados	33

Procedimiento experimental

Titulación de anticuerpos y controles de compensación34

Aislamiento de CMSP y recuento celular35

Estimulación de CMSP.....37

Detección de citocinas intracelulares37

Detección de fosfoproteínas.....38

Protocolo para evaluar capacidad fagocítica usando
“pHrodo bioparticles phagocytosis kit for flow cytometer”39

Análisis estadístico40

Resultados41

Discusión de resultados.....61

Conclusión71

Perspectivas71

Referencias73

ÍNDICE DE FIGURAS

	Paginas
Figura 1.0 Origen hematopoyético en la diferenciación de los monocitos	2
Figura 2.0 Marcadores fenotípicos asociados a la diferenciación de monocitos-macrófagos	3
Figura 3.0 Diferencias fenotípicas y funcionales entre las subpoblaciones de monocitos humanos.....	9
Figura 4.0 Inmunofluorescencia en citometría de flujo	10
Figura 5.0 Nomenclatura de monocitos	13
Figura 6.0 Algoritmo de análisis convencional (E1) para la identificación y caracterización de monocitos de sangre periférica en humanos por citometría de flujo	15
Figura 7.0 Expresión diferencial de receptores en la superficie de las subpoblaciones de monocitos.....	19
Figura 8.0 Esquema general de trabajo.....	29
Figura 9.0 Estrategia de análisis E1 para la identificación de subpoblaciones de monocitos	32
Figura 10.0 Protocolo para generar controles de compensación.....	35
Figura 11.0 Representación de un gradiente celular	36
Figura 12.0 Protocolo experimental para la estimulación de CMSP	37
Figura 13.0 Protocolo experimental para la detección de citocinas intracelulares.....	38
Figura 14.0 Protocolo experimental para la detección de fosfoproteínas	39
Figura 15.0 Protocolo experimental para la evaluación de la capacidad fagocítica	39
Figura 16.0 Patrones de expresión en poblaciones de Leucocitos de sangre periférica de moléculas para la identificación de monocitos	42
Figura 17.0 TLR-2 como molécula de identificación y caracterización para monocitos	43
Figura 18.0 Comparación en las estrategias de análisis para la identificación de las subpoblaciones de monocitos	44
Figura 19.0 Análisis por E1 y E2 de las subpoblaciones de monocitos estimuladas con LPS	47
Figura 20.0 Comparación de las estrategias E1 y E2 para el seguimiento de la distribución porcentual de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS.....	48

Figura 21.0 Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS.	49
Figura 22.0 Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS	50
Figura 23.0 Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS.	51
Figura 24.0 Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos en la expresión de moléculas intracelulares	53
Figura 25.0 Comparación en la expresión de citocinas intracelulares por E1 y E2.....	54
Figura 26.0 Comparación en la expresión de fosfoproteínas por ambas estrategias...	55
Figura 27.0 Comparación de ambas estrategias en procesos de fagocitosis.....	56
Figura 28.0 Expresión de CD14, CD16 DR, y TLR-2 en las subpoblaciones de monocitos en mujeres con y sin preeclampsia.	59
Figura 29.0 Expresión de moléculas asociadas a activación de monocitos en mujeres con preeclampsia.	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Paginas
Tabla 1.0 Células de sangre periférica humana en un adulto normal.....	12
Tabla 2.0 Mabs empleados para la identificación y caracterización de los Monocitos	34
Tabla 3.0 Correlación de las subpoblaciones de monocitos evaluadas por ambos algoritmos de análisis	45
Tabla 4.0 Correlación entre marcadores para las estrategias de análisis	46
Tabla 5.0 Correlación entre citocinas para las estrategias de análisis	54
Tabla 6.0 Correlación entre fosfoproteínas para las estrategias de análisis.....	55
Tabla 7.0 Correlación de las estrategias de análisis en procesos de fagocitosis	56
Tabla 8.0 Datos demográficos y obstétricos de las pacientes incorporadas al estudio..	57
Tabla 9.0 Subpoblaciones de monocitos analizadas por ambas estrategias.....	57

I. Antecedentes

Funciones y caracterización

Los monocitos son células esenciales de los vertebrados que juegan un papel trascendental en las respuestas inmunes. Como parte del sistema inmune innato, el progenitor de los monocitos se origina en la medula ósea derivado de una célula troncal hematopoyética (HSC, del inglés *hematopoietic stem cell*)¹. Las HSC se autorenewan, porque cada vez que se dividen, al menos una célula hija mantiene las propiedades de la célula troncal, mientras que la otra puede diferenciarse a lo largo de una línea comprometida (división asimétrica)^{2, 3} (Figura 1.0). Estas células se mantienen dentro de nichos anatómicos microscópicos especializados en medula ósea donde originan células progenitoras pluripotentes (MPP) que tienen la capacidad de comprometerse en células de linaje mielóide (CMP, del inglés *common myeloid progenitor*) como la célula CFU-M que origina en orden creciente de madurez: monoblastos, promonocitos, monocitos medulares, monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares^{4, 5}. El proceso anterior descrito se conoce como monocitopoyesis y depende de los factores estimulantes: GM-CSF (del inglés *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*); M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*); la monocitopoyetina y la interleucina 3 (IL-3) para lograr la diferenciación completa hacia monocitos^{1, 6, 7}. Durante este estado de maduración los monocitos constituyen aproximadamente el 10% de todos los leucocitos que se encuentran en sangre periférica en humanos⁸. El tiempo de vida media de los monocitos en circulación se ha estimado en alrededor de 3 días en humanos^{9, 10}. De hecho, esta corta vida llevó a pensar que la sangre actuaba como un depósito general de precursores mieloides que permitía la población continua de los macrófagos de tejido y en particular de las células dendríticas¹¹. Sin embargo recientemente se ha demostrado que la población continua de macrófagos tisulares se debe a fenómenos de auto renovación que es inicialmente llevada a cabo por macrófagos embrionarios antes que monocitos circulantes^{12, 13}, por lo que el estudio de los monocitos incluye un campo totalmente diferente como células que responden a fenómenos inflamatorios y de homeostasis.

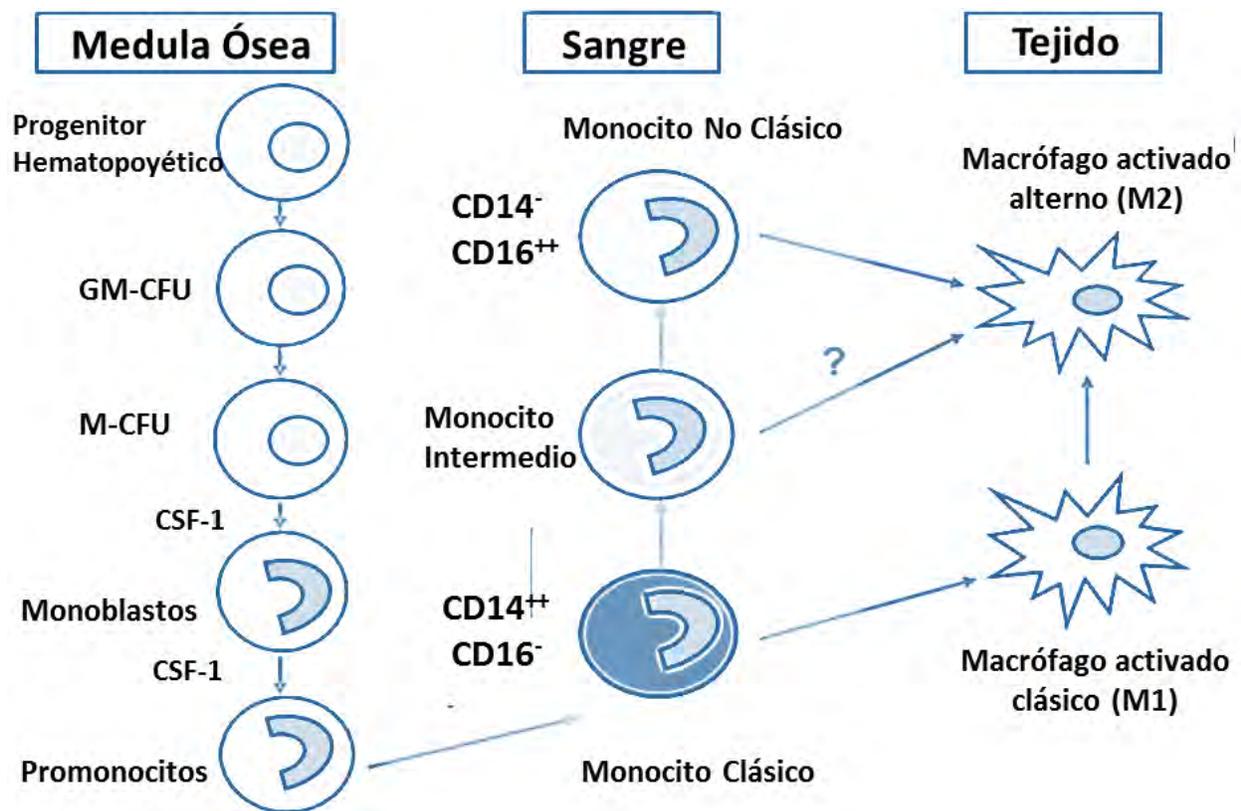


Figura 1.0 Origen hematopoyético en la diferenciación de los monocitos. Los monocitos derivan de células madre hematopoyéticas (HPC) residentes de la medula ósea que se diferencian para dar origen a unidades formadoras de colonias granulocítica/macrófagos (GM-CFU) hasta la formación de colonias de monocitos (M-CFU) (vía monocitopoyética) cuyos estadios de diferenciación son: monoblastos y pro monocitos bajo la regulación del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1). Los pro-monocitos se convierten adicionalmente en monocitos en sangre periférica, donde basados en la expresión de CD14 y CD16 se pueden agrupar en tres subpoblaciones funcionalmente distintas. En tejido los monocitos se diferencian a macrófagos M1 o M2 y en células dendríticas. Modificado de Lee, H.W., et al. Biochim. Biophys.2013

Un aspecto importante durante el proceso de diferenciación de los monocitos es la regulación de las moléculas de superficie que nos permiten diferenciar los estados de maduración de los monoblastos, células que no podrían identificarse de los precursores de granulocitos o de un precursor común. En términos generales, las células identificadas como $CD34^+CD117^+CD45^{dim}CD13.33^+$ representan los mieloblastos/monoblastos que se diferencian de precursores para células B que en su mayoría son células $CD34^+CD117^-CD45^{dim}CD13.33^+$. Cabe destacar que dichas moléculas no son específicas de la línea de diferenciación monocítica, pues también definen la diferenciación de otros precursores hematopoyéticos, destacando principalmente la vía granulocítica cuyos niveles de expresión son heterogéneos a lo largo de los estados de maduración.

La progresión en la maduración de los monoblastos origina una regulación en la expresión de los marcadores de superficie, ejemplo de ello es CD33, molécula que incrementa su expresión durante el paso a promonocitos. Caso contrario ocurre con CD34, la cual desaparece gradualmente. Otras moléculas se expresan de forma pautada como CD15 o CD16 y la progresión hacia monocitos incrementa la expresión de CD14. HLA-DR es una molécula que se conserva a lo largo de todos los estadios de maduración de células monocíticas, caso contrario a lo que sucede en la diferenciación de neutrófilos¹⁴ (Figura 2.0).

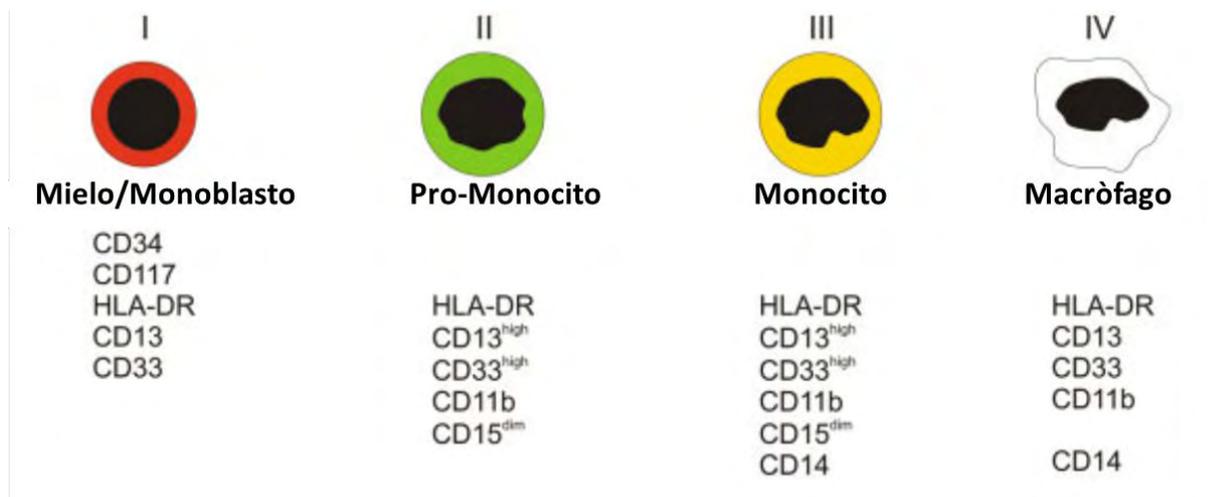


Figura 2.0 Marcadores fenotípicos asociados a la diferenciación de monocitos-macrófagos. Este esquema para el desarrollo monocítico normal en médula ósea, representa las etapas de diferenciación (de I a IV en orden progresivo) que pueden ser identificadas evaluando la expresión en superficie de marcadores celulares considerados de vital importancia en la identificación de un estado de maduración. Modificada de E.G. van Lochem et al. Cytometry Part B. 2004

Los receptores Toll-like (TLR), por su parte, son responsables del reconocimiento de componentes microbianos y víricos, por ejemplo TLR-2 reconoce peptidoglicano y ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas¹⁵, manteniendo un papel trascendental en la supervivencia de un organismo¹⁶, sin embargo poco se conoce sobre la expresión de TLR-2¹⁷ durante el proceso de maduración en progenitores mieloides y linfoides en médula ósea y el momento en el cual adquieren un TLR funcional y si estos receptores influyen en el desarrollo hematopoyético. Se conoce que los monocitos y macrófagos expresan RNAm para todo el grupo de TLR excepto TLR-3¹⁸, aunque de manera diferencial expresan TLR-2, TLR-4 y TLR-5 en precursores mielo/monocítico¹⁸, pero algunos estudios han caracterizado una nula participación de los TLR en la

hematopoyesis, con una participación directa en HSC donde están implicados en la reposición / reclutamiento de células mieloides en respuestas de carácter inflamatorio¹⁷. En un inicio el estudio de los monocitos llevó a los científicos a clasificarlos con base en la morfología y su densidad^{19, 20}. En general, desde que se caracterizó a los monocitos en sangre periférica humana y debido a la heterogeneidad que presentan difiriendo en su fenotipo y función, los parámetros para definir las subpoblaciones de monocitos así como las técnicas de separación fueron amplios. Una de las primeras técnicas que permitió el aislamiento de diferentes subpoblaciones de monocitos fue utilizar gradiente de centrifugación y el método denominado “Counterflow centrifugation” o mejor conocido como elutriación, con lo cual permitió la separación de subpoblaciones de monocitos por tamaño y densidad²¹. Estas técnicas permitieron a diversos investigadores distinguir entre dos diferentes subpoblaciones de monocitos.

Así por ejemplo, Akiyama et al., definieron una subpoblación más frecuente a la cual denominaron “monocitos regulares” y otra de menor frecuencia denominada “monocitos intermedios”.^{22, 23}. Los primeros los caracterizaron por ser de mayor tamaño y por su alta expresión del antígeno de superficie OKM1, así como una elevada actividad de la enzima peroxidasa, la inducción de células T y por tener una respuesta alta en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, del inglés antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). En contraste, los monocitos intermedios podían movilizarse más fácilmente desde reservorios extravasculares. También se encontraron diferencias en la expresión de citocinas inducida por poli (I-C). Con estas características se relacionó a los monocitos regulares con la expresión de la interleucina 1 (IL-1), el factor estimulante de colonias (CSF) y la prostaglandina E₂ (PGE₂); los monocitos intermedios se asociaron a la producción de interferón alfa (IFN- α). De forma similar con la identificación de dos subpoblaciones de monocitos, Weiner et al., caracterizó una población de gran tamaño con alta actividad de la mieloperoxidasa (MPO), una alta producción de superóxido en respuesta a zymosan, y alta producción de CSF comparado con una subpoblación de menor tamaño cuya característica principal es mediar respuesta citotóxica frente a tumores²⁴. Un ejemplo más sobre las diferentes descripciones que los autores publicaban acerca de la caracterización de monocitos fue la realizada por Figdor et al., que describió dos subpoblaciones; una de mayor densidad

que posteriormente caracterizo como positivos a la producción de esterasas y con alta actividad de la enzima peroxidasa, ADCC, y una actividad mayor a la reacción leucocitaria mixta (MLR) comparada con la subpoblación de menor densidad²⁵. En contraste a lo reportado, Akiyama^{22, 23} reporto actividad fagocítica, elevada expresión de la molécula HLA-DR y la expresión regular e intermedia del receptor Fcγ (FcγR) para monocitos de baja densidad. Algunos autores asociaron la alta actividad fagocítica con la subpoblación de alta densidad y la menor capacidad fagocítica con la subpoblación de menor densidad con base a la técnica de elutriación²⁶. Sin embargo, Fernández,^{27, 28} también reporto la elevada expresión de HLA-DR en células de baja densidad y Schreiber²⁹ asocio la alta expresión de FcγR y el receptor C3 de complemento con la población de alta densidad. También se describieron diferencias con base en la actividad mediada por quimiotaxis, encontrándose elevada en los monocitos de mayor tamaño y densidad³⁰.

Una diferencia importante fue demostrar la función como células presentadoras de antígeno profesionales (APPC) ya que se encontró que los monocitos de menor tamaño presentaban de manera eficiente antígenos solubles del toxoide tetánico (TT) y partículas generadas por la infección de fibroblastos con citomegalovirus, mientras que la población de mayor tamaño expresaban fuertemente la molécula CD14 y presentaban baja capacidad en la presentación antigénica pero una elevada actividad en la supresión de la función linfocitaria³¹. En conjunto, con los estudios anteriores se distinguieron dos subpoblaciones de monocitos con diferencias fenotípicas y funcionales: una subpoblación importante de monocitos de gran tamaño, de alta densidad, CD14⁺ / FcγR⁺ que exhiben actividad fagocítica, alta producción de citocinas y especies reactivas de oxígeno, ADCC elevado y actividad supresora de linfocitos activados por antígeno y una subpoblación de células HLA-DR⁺ menor tamaño y menor densidad y poco adherentes con alta capacidad de producción de IFN-α exhibiendo una potente capacidad como APPC.

Perspectivas del modelo murino; Funciones y mecanismos en la respuesta inmune innata

Los monocitos son la piedra angular del sistema inmunológico innato y adaptativo, son factor crítico en muchas enfermedades inflamatorias. Se pensaba que su origen a partir de un precursor mieloide común en la medula ósea daba lugar a macrófagos tisulares y células dendríticas^{32, 33} ya que dentro del sistema fagocítico mononuclear comparten similitudes pero con funciones y orígenes totalmente diferentes. Tan diverso como lo es su función es su inmunofenotipo, al grado que en 2003 Ancuta et al. informaron que los monocitos CD16⁺ pueden subdividirse en grupos fenotípicamente distintos CD14⁺⁺CD16⁺ y CD14⁺ CD16⁺⁺³⁴. Con lo revisado recientemente, la subpoblación de monocitos intermedios permanece mal caracterizada debido a que la mayoría de los estudios clínicos y experimentales ignoran estas células o analizan monocitos intermedios y no clásicos como una sola subpoblación³⁵. Los monocitos intermedios son de importancia clínica trascendental: primero por tener recuentos elevados de monocitos CD14⁺⁺ CD16⁺ que predicen de forma independiente los resultados adversos en pacientes con alto riesgo cardiovascular^{36, 37}. Además, una serie de datos sugiere que los monocitos intermedios son importantes en la infección por VIH-1³⁸, dado que a diferencia de los monocitos clásicos y no clásicos, expresan selectivamente CCR5, el correceptor para HIV-1. Aunque los monocitos CD14⁺⁺CD16⁺ muestran un fenotipo intermedio en muchos receptores de quimiocinas (por ejemplo, CCR2 y CX3CR1), se pueden identificar de los monocitos CD14⁺⁺ CD16⁻ y CD14⁺ CD16⁺⁺, a través de la expresión superficial específica de CCR5^{34, 37} y de la enzima angiotensina (ACE, CD143)³⁹. Aunque cabe resaltar que la prueba de la existencia de esta subpoblación de monocitos deriva principalmente del análisis de expresión superficial por citometría de flujo, lo cual es limitada en su capacidad analítica, esperando obtener más datos de un perfil de expresión génica, el cual proporciona una caracterización mucho más profunda^{40, 41, 42}, ya que no se tiene actualmente un forma confiable de separar a esta subpoblación de otro monocitos para realizar estudios ex vivo.

Un paso importante para entender las funciones de las subpoblaciones de monocitos fue representado por la descripción de dos poblaciones distintas de monocitos "inflamatorios" y "patrulleros" en ratones⁴³.

Los monocitos inflamatorios murinos, caracterizados por la expresión del marcador de antígeno-1 (Gr1 +) y especializados en la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF α), las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de óxido nítrico (NO). Estos monocitos están implicados en defensa del huésped durante las infecciones. Por el contrario, los monocitos Gr1 (-) murinos patrullan los vasos sanguíneos y se asocian principalmente con la reparación de tejidos, mientras que su papel en respuesta a infecciones no ha sido esclarecido totalmente. De igual forma como ya se ha mencionado fue vital la comparación de estas subpoblaciones con las reportadas en humanos. Cabe destacar que la contribución importante de los estudio de Cros et al. fue la descripción de una nueva función inmunológica de los monocitos CD14^{dim}CD16⁺, ya que a pesar de la tolerancia de los monocitos CD14^{dim}CD16⁺ hacia los estímulos bacterianos, se observó que la estimulación de monocitos intermedios con antígenos virales generaba altas cantidades de citocinas proinflamatorias dependientes de las vías de señalización de TLR7 y TLR8 y de MyD88⁴⁴. También se han descifrado las vías moleculares intracelulares diferenciales de los monocitos CD14⁺CD16⁻ y CD14^{dim}CD16⁺ en humanos, donde la producción de citocinas inducida por estímulos bacterianos y virales está mediada por la proteína Cinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) en monocitos inflamatorios CD14⁺, mientras que la fosforilación de la cinasa meiótica 1, (MEK1, Erk) mediante TLR7 y TLR8 induce la producción de citocinas en monocitos CD14^{dim}CD16⁺ (Figura 3.0). Una contribución importante para la caracterización de monocitos intermedios es el caso de una respuesta inmune de memoria, donde el aumento del número de fagocitos reclutados y su activación permiten procesos optimizados contra patógenos intracelulares. Esta opinión se basa en la suposición de que los fagocitos suelen presentar una respuesta cualitativa y cuantitativamente más rápida cada vez que se encuentran al mismo patógeno. Sin embargo, no se conoce totalmente la modulación de las actividades antimicrobianas de los fagocitos innatos que se expresan durante una respuesta inmune primaria en infecciones que desarrollan memoria inmunológica⁴⁵.

Los macrófagos, los neutrófilos y los monocitos juegan un papel crítico durante las infecciones primarias para combatir los patógenos intracelulares. Los neutrófilos y macrófagos están bien establecidos como importantes efectores celulares de la defensa

inmune innata, y está claro que los monocitos en circulación también contribuyen significativamente a la defensa contra una serie de patógenos microbianos^{46, 47}. Como podría predecirse a partir de sus patrones de expresión génica diferencial, donde las subpoblaciones de monocitos no clásicos demuestran un comportamiento de patrullaje a lo largo de las paredes de los vasos sanguíneos y se acumulan en tejidos periféricos como el bazo, los pulmones y el hígado⁴⁸.

Aunque estudios sugieren que es poco probable que los monocitos no clásicos contribuyan a la generación de células dendríticas en los órganos periféricos, es posible que contribuyan a las poblaciones de macrófagos residentes durante procesos inflamatorios^{43, 49}. No se ha alcanzado el consenso sobre las funciones de las subpoblaciones de monocitos, pero existe una evidencia abrumadora de que el reclutamiento de monocitos clásicos domina de forma primaria en las respuestas inflamatorias. Por ejemplo, los monocitos clásicos infiltran tejidos inflamados, tales como se prueba en modelos de peritonitis y se incrementan específicamente en la circulación durante la infección sistémica o crónica^{43, 50, 51, 52}.

En un modelo murino se ha observado que los monocitos clásicos migran a la piel de los ratones que reciben una inyección intercutánea de microesferas de látex⁵³, y en un modelo de lesión del músculo esquelético, sólo los monocitos clásicos migran al tejido lesionado⁵⁴. Después del infarto al miocardio, monocitos clásicos y no clásicos parecían tener funciones semejantes. Específicamente los monocitos clásicos llegan primero al corazón infartado y exhibe funciones inflamatorias, los monocitos no clásicos se reclutan en una etapa posterior y promueven la cicatrización del tejido mediante la expresión de grandes cantidades de factor de crecimiento endotelial vascular. Las dos subpoblaciones están bajo el control de distintos mecanismos, los monocitos clásicos se reclutan a través de CCR2 y los monocitos no clásicos utilizan una vía dependiente de CX3CR1⁵⁵ la cual se ha sugerido promueve la supervivencia y auto renovación en lugar del reclutamiento^{56, 57}.

En otro modelo los monocitos no clásicos son reclutados antes que los monocitos clásicos, o incluso neutrófilos, datos soportados por experimentos realizados después de la inyección intraperitoneal de *Listeria monocytogenes*⁴⁸.

En concreto algunos estudios sugieren que las subpoblaciones de monocitos representan las mismas células en diferentes etapas de maduración^{50, 58, 59}. De hecho, en ausencia de inflamación, los monocitos clásicos pueden regresar a medula ósea, diferenciarse en monocitos no clásicos y regresar al torrente sanguíneo en ratones. Una mayor comprensión de las vías que gobiernan la conversión de subpoblaciones de monocitos es crucial para avanzar en los esfuerzos para atenuar la inflamación y / o mejorar la reparación de tejidos.

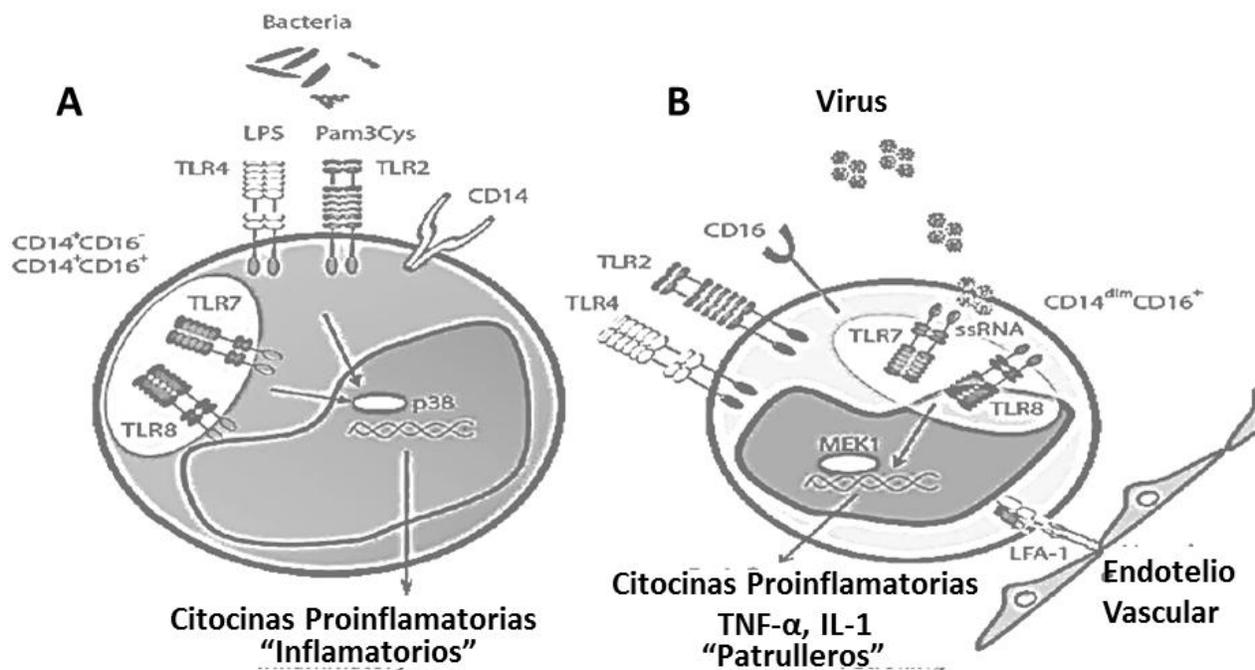


Figura 3.0 Diferencias fenotípicas y funcionales entre las subpoblaciones de monocitos humanos. (A) Los monocitos CD14⁺CD16⁺ y CD14⁺CD16⁻ producen citoquinas proinflamatorias en respuesta a estímulos que son reconocidos por TLR4 y TLR2 a través de p38 dependiente de MAPK. CD14 es un correceptor de TLR4. Por otro lado, los monocitos CD14^{dim}CD16⁺ (B) carecen de CD14, y la estimulación de TLR2 y TLR4 por ligandos bacterianos no resulta en la producción de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, los monocitos CD14^{dim}CD16⁺ producen citoquinas proinflamatorias en respuesta a virus en una vía TLR7 y TLR8 dependiente de MEK1. En contraste con los monocitos CD14⁺, los monocitos CD14^{dim}CD16⁺ patrullan el endotelio vascular de una manera dependiente de LFA-1. LPS, lipopolisacárido; TLR, Receptor tipo Toll; LFA-1, antígeno asociado a la función linfocitaria 1; TNF, factor de necrosis tumoral; IL, Interleucina; ARNsc, ARN monocatenario.

II. Identificación de Monocitos por Inmunomarcaje

Citometría de flujo, una herramienta de trabajo

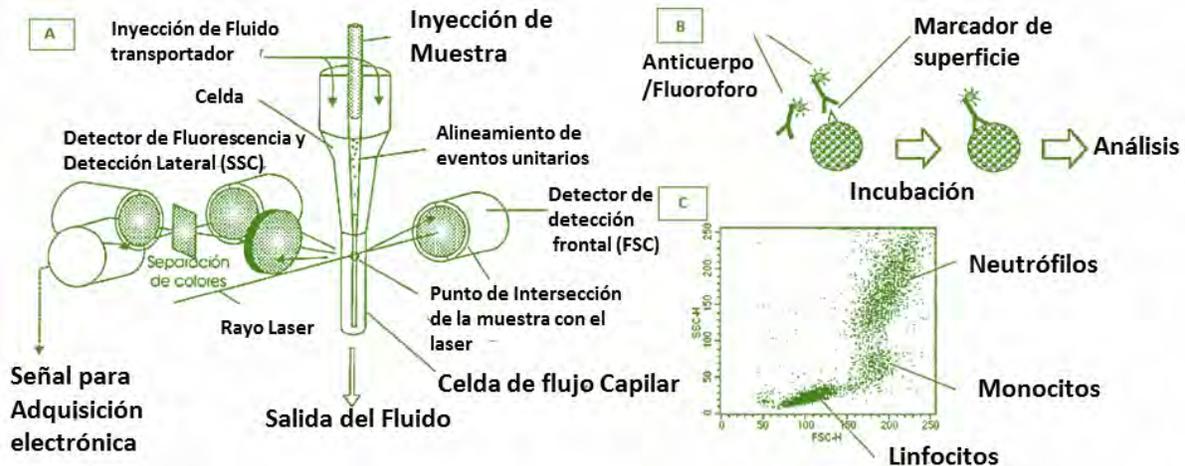


Figura 4.0 Inmunofluorescencia en citometría de flujo. La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz (A). Una de las características importantes es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares como el tamaño, forma y complejidad (C) y, por supuesto, cualquier componente celular que pueda ser marcada con fluorocromos (B).

Históricamente, los monocitos se describían basándose en la morfología y la densidad principalmente, sin embargo con el arribo de la citometría de flujo y la producción de anticuerpos monoclonales iniciada por Kohler y Milstein en 1975⁶⁰, los monocitos humanos fueron identificados y caracterizados en subpoblaciones con base a marcadores asociados a membrana celular, pero cabe destacar que recientemente se han identificado subpoblaciones de monocitos y macrófagos siguiendo el transcriptoma de ambas células⁶¹. La citometría de flujo, basándose en leyes de la física de fluidos, óptica y electrónica, detecta células o partículas suspendidas a medida que se pasan por un flujo laminar de tal forma que se haga pasar solo un evento en el momento que se les haga incidir con un haz de luz, fenómeno que genera una señal relativa por la dispersión natural de la luz y una fluorescencia asociada a las partículas o fluorocromos que son excitados al interaccionar con el haz de luz, estas señales luminosas detectadas se transforman en pulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un servidor de datos.

Por tanto, la citometría nos permite analizar y diferenciar a las células con base en el tamaño, complejidad y discriminando entre el tipo de fluorocromos asociados con anticuerpos dirigidos contra moléculas expresadas en la membrana celular⁶². Las señales de luz generadas a medida que a una célula se le incide un rayo láser en un flujo laminar se convierten en señales electrónicas (voltajes) por fotodetectores (fotodiodos y tubos fotomultiplicadores (PMT)), donde un fotodiodo es menos sensible a las señales luminosas que los PMT y, por lo tanto, se utiliza para detectar la señal del parámetro tamaño (FSC). Los PMT se utilizan para detectar las señales más débiles generadas por el parámetro complejidad (SSC) y fluorescencia (Figura 4.0)⁶³.

La dupla que forman la citometría y los anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos permite tener una técnica flexible con la cual podemos medir parámetros de superficie, extracelulares, citoplasmáticos y nucleares⁶⁴.

Inmunofenotipificación de Monocitos

Desde hace aproximadamente 30 años, la identificación de dos poblaciones de monocitos en sangre humana, caracterizadas por su morfología, proporcionaron las primeras pistas sobre las diferentes funciones fisiológicas de estos subconjuntos de monocitos. La tecnología que representan los anticuerpos monoclonales ha proporcionado a la citometría de flujo una gran variedad de anticuerpos que son específicos para varias proteínas (antígenos) en la membrana de la superficie de los leucocitos principalmente. Aunque se investigan otras técnicas de fenotipificación de las células del sistema inmune, la inmunofenotipificación por citometría de flujo sigue siendo una herramienta, ahora indispensable, para caracterizar, por ejemplo, a los fagocitos mononucleares cuya identificación presenta importantes desafíos cuando se desea evaluar a los monocitos en sangre periférica durante patologías inflamatorias o bien cuando lo que se requiere es distinguir a todos los miembros del sistema fagocítico mononuclear en el bazo o en otro compartimento del sistema inmune. Llegado a este punto, el diseño de paneles de anticuerpos fluorocromados tiene una vital importancia y una valiosa información, lo cual nos ha permitido discriminar entre los esplenocitos mieloides empleando un panel específico de anticuerpos⁶⁵, solo por mencionar uno de tantos ejemplos.

En un ambiente donde por cm^3 de sangre humana hay en promedio 5×10^9 eritrocitos (glóbulos rojos), 7×10^6 leucocitos y que microscópicamente pueden parecer homogéneos, existen los monocitos cuya concentración es aproximadamente 0.5×10^6 por cada cm^3 , los linfocitos (T y B) cuya concentración 2×10^6 por cada cm^3 y la tercera población más frecuente denominada como los polimorfonucleares o granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) cuya concentración oscila alrededor de 5×10^6 por cada cm^3 (Tabla 1.0)^{66, 67}.

Bajo este panorama, se ha logrado tener un fenotipo para la población de monocitos humanos basándose en la expresión diferencial del receptor para Lipopolisacárido (CD14) y el receptor FcγIII (CD16); como monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermedios (CD14⁺CD16⁺) y monocitos no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺)⁶⁸, las cuales fueron aceptadas en 2010 bajo una nomenclatura oficial para estas células, la cual ha sido aprobada por el *Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas* (NC-IUIS)⁶⁹ en la cual se definen tres tipos de monocitos basándose en un análisis por citometría de flujo (Figura 5.0).

Tabla 1.0 Células de sangre periférica humana en un adulto normal

Células	No. por cm^3	Porcentaje de leucocitos	Diámetro (μm)
Plaquetas (Trombocitos)	$1-3 \times 10^8$		2-3
Eritrocitos	$4-6 \times 10^9$		6-8
Leucocitos	$3-10 \times 10^6$	100	
Granulocitos			
Neutrófilos	$2-7 \times 10^6$	50-70	10-12
Eosinófilos	$0.01-0.5 \times 10^6$	1-3	10-12
Basófilos	$0-0.1 \times 10^6$	0-1	8-10
Linfocitos	$1-4 \times 10^6$	20-40	6-12
Monocitos	$0.2-1.0 \times 10^6$	1-6	12-15

Lentner C, ed. (1984). Geigy Scientific Tables, 8th edition. CIBA-Geigy, Basle; and from Diggs LW, et al. (1970). The Morphology of Human Blood Cells, 5th edition. Abbott Laboratories, Abbott Park, IL.

Enfatizando las diferencias entre estas células, indiscutiblemente existe una heterogeneidad en muchos aspectos, desde la expresión diferencial de marcadores entre las subpoblaciones de monocitos humanos hasta sus características

morfológicas, por lo cual, la discriminación de esta población es cuestión de investigación. Dicha heterogeneidad actualmente se considera un tema al cual se debe profundizar por las subpoblaciones observadas y conservadas entre los mamíferos como se ha reportado en vacas^{70, 71}, cerdos^{72, 73}, ratas^{74, 75} y ratones⁴³.

Por ejemplo, los monocitos de ratón se han definido principalmente por la expresión de CD115 (CSF-1R o M-CSFR), F4/80 (EMR1 o Ly71), CD11b (integrina α M, Mac-1, Mo1, CR3, Ly-40, C3biR, ITGAM) y CX₃CR1^{76, 77}, aunque existen una caracterización fenotípica basada en la expresión de CX₃CR1 y Ly6C que permite identificar dos subpoblaciones cuyo fenotipo se describe como Ly6C^{hi} CX₃CR1^{low}CCR2⁺ CD62L⁺ y Ly6C^{low} CX₃CR1^{hi} CCR2⁻ CD62L⁻^{43, 78}. Los fenotipos mencionados básicamente se reportan empleando los marcadores CX₃CR1 y Ly6C, donde el primero también se puede identificar como un marcador discriminatorio en monocitos humanos y cuyas funciones en monocitos clásicos y no clásicos de distintas especies son bastantes parecidas. Este tipo de semejanzas ha dado una validación muy fuerte al hecho de tener un modelo animal en el cual podamos explorar las funciones de cada subpoblación en un contexto fisiológico.

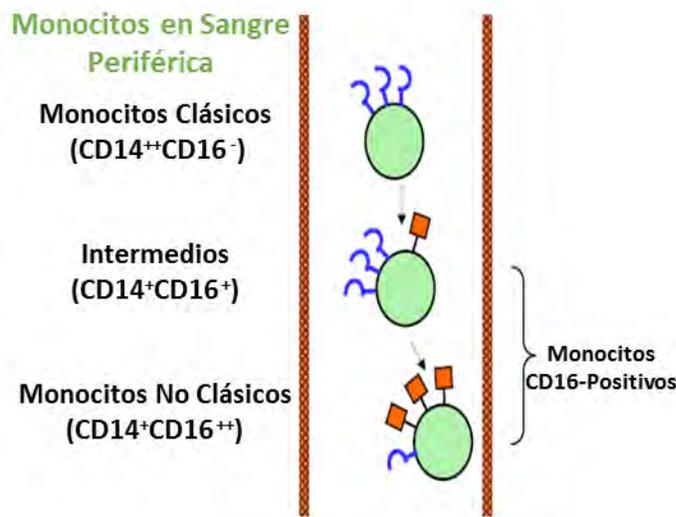


Figura 5.0 Nomenclatura de monocitos. Se muestran los tres subtipos de monocitos descritos con los marcadores de identificación. El gancho azul indica CD14 y la bandera en color naranja, CD16. Un número más alto del símbolo dado indica una densidad más alta del receptor en cuestión. Las flechas indican el desarrollo, lo cual no señala necesariamente que dichos estadios ocurran en el torrente sanguíneo. La localización de los monocitos más cerca de la pared vascular es un concepto soportado por datos de tinción supravitales en el homólogo de ratón y que tienen que ver con las funciones que soporta dicha subpoblación. Modificado de Ziegler-Heitbrock et al, Blood. 2010

Desde 1996 cuando Ziegler-Heitbrock sugirió que la expresión diferencial de CD14 y CD16 en monocitos humanos podría definir al menos dos subpoblaciones de monocitos con diferentes funciones y propiedades, se aportaron nuevos conocimientos sobre la fisiopatología durante las enfermedades inflamatorias y se iniciaron investigaciones para poder caracterizar el fenotipo de cada subpoblación. Los primeros trabajos

demonstraron que el porcentaje de monocitos que expresan CD14 y CD16, en contraste con aquellos que expresan únicamente CD14, fue mayor en pacientes con sepsis y cáncer⁷⁹, lo que llevó a la necesidad de entender el papel de estas subpoblaciones de monocitos en la salud y la enfermedad. Un paso trascendental hacia la comprensión de la función de las subpoblaciones de monocitos fue la descripción de dos poblaciones distintas de monocitos: "inflamatorios" y "patrulleros (patrolling)" en ratones⁴³. Los monocitos inflamatorios en ratones están caracterizados por la expresión del antígeno de diferenciación granulocítica (GR1⁺) y están especializados en la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), con lo cual están implicados en la defensa del hospedero contra infecciones⁶⁹. Los monocitos patrulleros (GR1⁻) están asociados a reparación de tejido dañado⁴³ y aunque se sabe que tienen un papel importante en la respuestas contra infecciones no se ha dilucidado los mecanismos moleculares que participan en la respuesta. Estas descripciones de subpoblaciones abrieron nuevas vías en la comprensión de la heterogeneidad de los monocitos y su función tan diferencial ha planteado nuevas investigaciones con enfoques terapéuticos, más específicos contra infecciones o en el proceso inflamatorio. Con estas homologías en humanos presentes en ratones como modelos de investigación se debe conocer las estrategias que permitan caracterizar fenotípicamente y funcionalmente a los monocitos de ambas especies.

El primer paso hacia resolver este problema fue la contribución de los estudios realizados por Cros et al. que representan la descripción de los monocitos homólogos de ratones en humano, demostrando que los monocitos humanos CD14⁺CD16⁻ y CD14⁺CD16⁺ tienen funciones inflamatorias semejantes a los monocitos GR1⁺, y que los monocitos CD14^{dim}CD16⁺ (monocitos no clásicos de acuerdo a la nomenclatura internacional) tienen propiedades similares a los monocitos GR1⁻ o patrulleros en ratón⁴⁴. Sin embargo, dentro de las poblaciones de monocitos descritas en humanos el algoritmo de análisis que usualmente se sigue (Figura 6.0) presenta la problemática de seleccionar a monocitos no clásicos por la confusión entre algunos polimorfonucleares, los cuales bajo ciertas patologías inflamatorias presentan procesos de degranulación celular y tienden a cambiar su morfología, por solo mencionar uno de los problemas

más importantes en la identificación actual de las subpoblaciones correctas de monocitos en humanos. Por tanto se ha planteado utilizar otras moléculas de superficie como marcadores de identificación y caracterización de monocitos bajo análisis en la expresión diferencial en superficie celular.

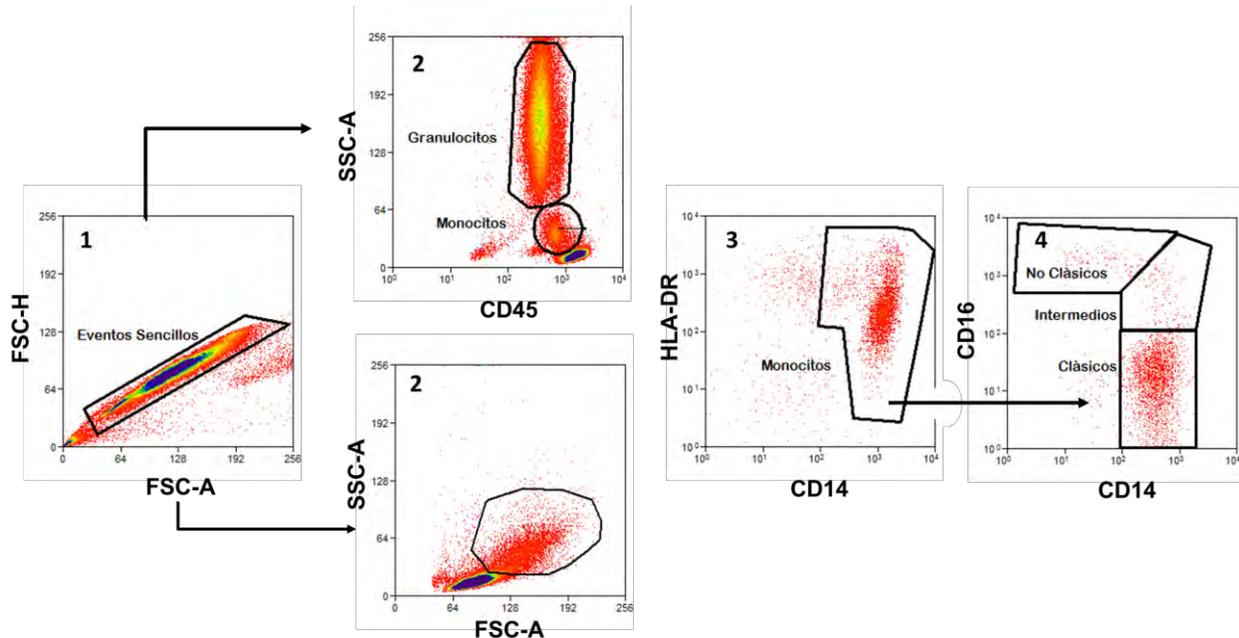


Figura 6.0 Algoritmo de análisis convencional (E1) para la identificación y caracterización de monocitos de sangre periférica en humanos por citometría de flujo. Con un panel de anticuerpos que involucra las moléculas CD45, HLA-DR, CD14 y CD16 algunos investigadores consideran suficiente estas moléculas para evaluar la expresión en poblaciones de monocitos. Partiendo de la detección de células sencillas (1) se genera un diagrama de puntos CD45 versus SSC-A (2) para la identificación de leucocitos en sangre periférica, realizando una selección de las células mononucleares mediante un diagrama de puntos FSC-A versus SSC-A. De acuerdo con las características morfológicas de las células mononucleares suele seleccionarse la población característica los monocitos (tamaño y complejidad media) o bien algunos investigadores abarcan una selección que traslapa con la región de linfocitos considerando similitud con la morfología de la subpoblación de monocitos no clásicos e intermedios. Posteriormente con un diagrama CD14 versus HLA-DR (3) se seleccionan las células altas en la expresión de los dos marcadores considerados como Monocitos en su mayoría para finalmente identificar las subpoblaciones con base en la expresión diferencial de CD14 versus CD16 (4).

Dificultades para la identificación y caracterización de monocitos por citometría de flujo

Los monocitos, al ser una población tan heterogénea entre subpoblaciones, son difícilmente identificados. En el caso de los monocitos intermedios se pasan por alto fácilmente debido a su pequeño número y naturaleza de transición (inherente), ya que todavía se desconoce si los monocitos intermedios tienen un papel discreto,

biológicamente significativo o si son los intermedios inevitables en una diferenciación por lo demás continua de los monocitos clásicos en no clásicos. Aunque la función de los monocitos intermedios no se conoce, podrían ser importantes para adaptar la respuesta inmune en diferentes patologías, ya que se han encontrado monocitos intermedios en ciertas condiciones: en la artritis reumatoide⁸⁰ y en los pacientes con asma severa⁸¹ por lo que se piensa que los monocitos intermedios son responsables del aumento de los monocitos que expresan CD16. Recientemente, se ha publicado que los monocitos intermedios en la sangre también están aumentados en la sarcoidosis⁸². Ante este panorama el empleo de la molécula del MHC de clase II (HLA-DR) cuya participación en la presentación antigénica a células T CD4⁺ es crucial, en un panel de análisis ha ayudado para discriminar entre células B y T, células NK o bien de células presentadoras de antígenos profesionales (APC)^{37, 42, 83}.

El empleo de un tercer marcador de diferenciación se hace obligatorio para la correcta identificación de los monocitos ya que los protocolos de tinción que sólo analizan la expresión de CD14 y CD16 no distinguen correctamente monocitos de otras poblaciones de leucocitos. Estos protocolos usualmente se basan en características físicas celulares para definir monocitos evaluando los parámetros [FSC] y [SSC]⁶⁸. Una dificultad que presenta la evaluación en la expresión de marcadores de superficie celular de los monocitos CD16⁺ es que no pueden separarse adecuadamente de otros leucocitos que expresan CD16, como los granulocitos- neutrófilos (NG) y células NK, lo que conduce a una evaluación inexacta de las subpoblaciones de monocitos. Cuando se emplea la molécula HLA-DR, esta no permite excluir las células NK (CD16⁺) en un diagrama de puntos HLA-DR versus CD14 que emplea el análisis clásico, con lo cual esta estrategia no se ha establecido por completo, de igual manera, por la conocida reducción de HLA-DR en ciertas enfermedades inflamatorias como sepsis⁸⁴, pancreatitis⁸⁵ o durante enfermedades hepáticas⁸⁶. En individuos sanos los neutrófilos CD16⁺ se separan de los monocitos en un análisis FSC versus SSC adecuadamente, sin embargo, hay que considerar que en ciertas patologías o estudios in vitro llega a presentarse degranulación de neutrófilos y/o diferencia en las características físicas de los monocitos la que ocasiona un fenómeno denominado “spill-over”, donde existe confusión sobre el tipo de población que se esté evaluando^{87, 88}.

Los monocitos también son una población bastante sensible a estímulos como el ejercicio, actividad que moviliza gran cantidad de monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ principalmente⁸⁹. Por otro lado terapias con glucocorticoides eliminan a esta misma población de monocitos en individuos sanos, con esclerosis múltiple, bronquitis y artritis reumatoide^{90, 91, 92, 93}. Cabe destacar que se ha observado la eliminación de monocitos CD14⁺CD16⁺ durante terapias que involucran hemodiálisis⁹⁴.

En muchos de estos estudios, los resultados obtenidos después de la identificación y la caracterización de subpoblaciones de monocitos no permiten tener un enfoque de análisis correcto ya que se emplean algoritmos de análisis con una imprecisión inherente. Para los ensayos en el laboratorio clínico, un ensayo preciso es sin embargo un requisito importante. Por lo tanto, se han desarrollado algoritmos de análisis que reducen al mismo tiempo el solapamiento de los monocitos CD14⁺ CD16⁺⁺ con las células CD16⁺ (NK y los granulocitos), demostrando que estos ensayos tienen un bajo coeficiente de variación, lo cual permite detectar fácilmente aumentos y disminuciones de las subpoblaciones de monocitos CD14⁺CD16⁺⁺ (no clásicos) resultantes de ejercicio excesivo y de la terapia con glucocorticoides, respectivamente. Algunos algoritmos de análisis han demostrado, incluso, por primera vez que las mujeres tienen un menor recuento absoluto de los monocitos no clásicos en comparación con los hombres⁸³. También se han reportado algoritmos de análisis que involucran no solo arreglos de los marcadores ya conocidos si no también adicionan al panel anticuerpos nuevos que no habían sido explorados en la superficie de monocitos y cuya expresión en cada subpoblación sugiere que dichas moléculas puedan ser utilizadas como un tercer marcador de discriminación. Tal es el caso de los estudios realizados con la lipoproteína de baja densidad LRP1 (CD69), receptor endocítico que realiza importantes funciones como son la activación de α_2 -microglobulina (α_2 -M), el reconocimiento de la endotoxina A de *Pseudomonas*, funciones como lipasa y apolipoproteína⁹⁵. LRP1 ha sido propuesta como una molécula que permite identificar aisladamente a la población de monocitos por su alta expresión característica con lo cual la caracterización de subpoblaciones está restringida a la evaluación de monocitos y no de otras poblaciones de leucocitos⁸⁷.

Otros algoritmos de análisis han explorado la expresión del receptor para el factor de necrosis tumoral (TNFR1 y TNFR2) en conjunto con HLA-DR, los receptores para quimiocinas CCR2 y CCR5 en subpoblaciones de monocitos y han caracterizado 10 subpoblaciones de monocitos basados en la expresión gradual de CD16 y la escisión de membrana de CD14⁸².

Pocas investigaciones se han realizado para tener un panel de anticuerpos que nos permita identificar apropiadamente a las subpoblaciones de monocitos en sujetos sanos y cada panel que se diseña está pensado en la evaluación hacia una patología en particular. Respondiendo si con el panel que involucra las moléculas mostradas en la Figura 6 es suficiente para el análisis de esta población, la respuesta es no. Una desventaja más que se tiene y que no debe pasarse por alto es la pérdida de la membrana celular del marcador más empleado en diagnóstico clínico que es CD14, el cual en estudios ex vivo se ha monitoreado la pérdida gradual del marcador, encontrando una concentración más alta de la molécula en suspensión que en las membranas de los monocitos de poblaciones debidamente separadas de monocitos al ser expuestas con su inductor nato que es el LPS⁹⁶, lo cual sin duda introduce una problemática más a la detección correcta de los monocitos clásicos e intermedios en estudios de investigación básica.

En último lugar hay que enfatizar algunas investigaciones que se han realizado sobre la relación de los patrones de reconocimiento asociados a patógenos (PRR) como son los receptores tipo Toll-Like (TLR-2 / TLR-4) y los mecanismos de respuesta inmune innata que inducen sobre los monocitos, donde, TLR4, junto con CD14, están bien caracterizados como los receptores del lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas. TLR2 se ha demostrado que actúa como un receptor de los componentes de las bacterias Gram positivas como peptidoglicano (PGN) y ácido lipoteicoico⁹⁷. La activación de ambos receptores por sus ligando puede conducir a la producción de citocinas proinflamatorias (incluido el factor de necrosis tumoral (TNF- α y la interleucina 6) que son características de la sepsis bacteriana⁹⁸.

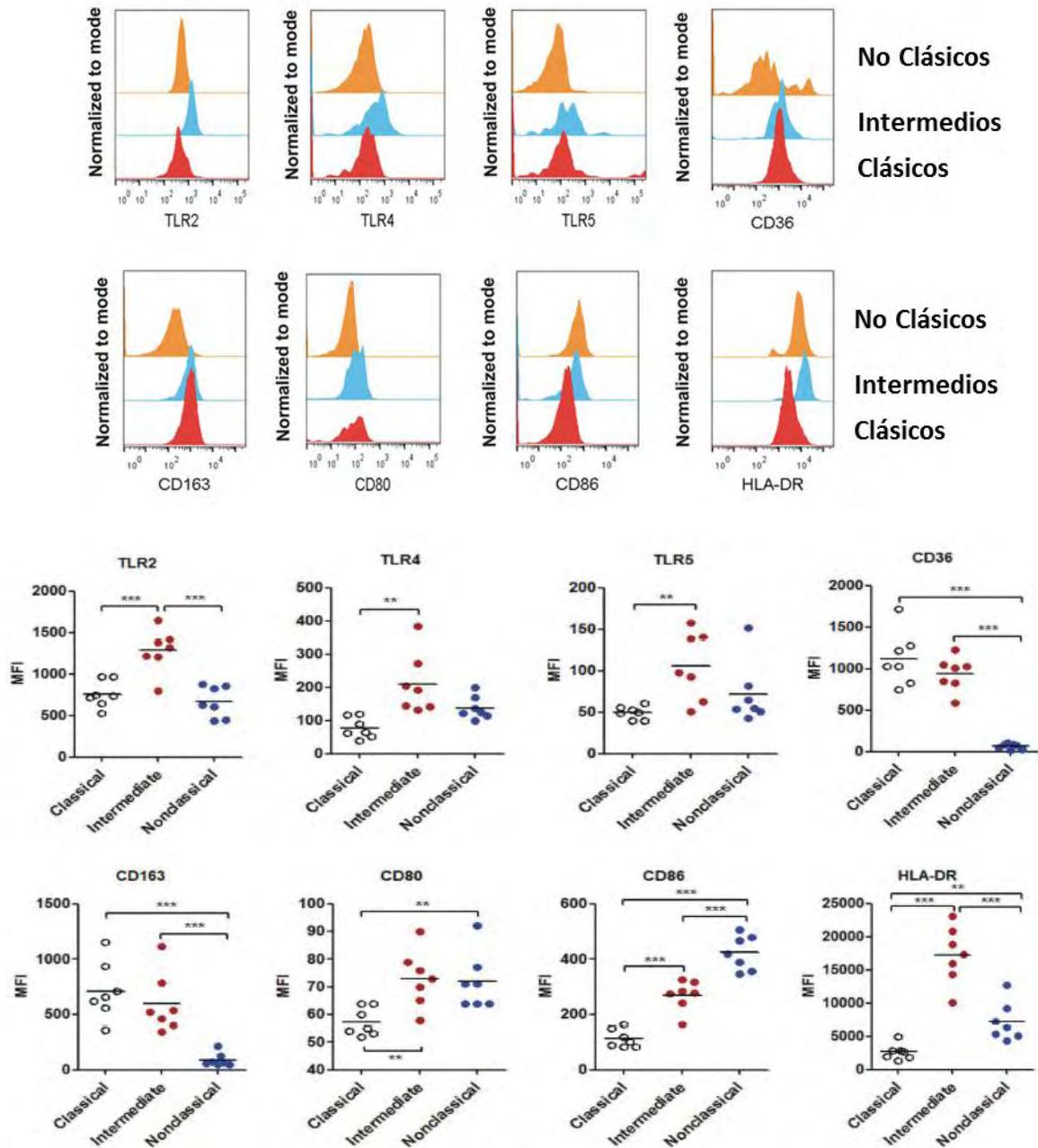


Figura 7.0 Expresión diferencial de receptores en la superficie de las subpoblaciones de monocitos. Representación en histogramas de cada uno de los marcadores que diferencian entre subpoblaciones de monocitos (Arriba). Entre las subpoblaciones de monocitos se tienen diferentes grados de expresión de los antígenos reportados en superficie celular (Abajo). MFI: Intensidad Media de Fluorescencia. Modificado de Mukherjee, Ratnadeep et al. 2015

Por otro lado, se conoce que los organismos gram-positivos y gram-negativos juegan un papel patogénico en la sepsis, por ejemplo, el LPS como contribuyente a la sepsis gram-negativa y las exotoxinas estafilocócicas y estreptocócicas (superantígenos) así como los peptidoglicanos son importantes en la sepsis por gram-positivos⁹⁷, (los superantígenos con la capacidad específica de activar a las células T, al unir APC a los linfocitos T a través del complejo HLA-DR y la región V β de los receptores de células T). Esta activación produce grandes cantidades de citocinas las cuales se han demostrado que regulan las vías de señalización de TLR. Se sabe que las interacciones sinérgicas que se producen entre superantígenos y otros componentes bacterianos como LPS conducen a un aumento de la mortalidad en modelos animales de choque séptico^{99, 100}.

Análisis de moléculas en superficie celular han revelado una expresión diferencial de algunos TLR, receptores tipo scavenger y moléculas co-estimuladoras, las cuales pueden llegar a emplearse como marcadores en la diferenciación de células hematopoyéticas¹⁷, lo cual ha llevado a estudiar su expresión en la superficie de células mononucleares para la identificación y caracterización de poblaciones mieloides. En todas las moléculas propuestas se observan diferencias en los grados de expresión sobre las subpoblaciones de monocitos (Figura 7.0), con lo cual también se puede describir la función de cada una de las subpoblaciones¹⁰¹. Sin embargo la expresión homogénea de TLR-2 en las tres subpoblaciones de monocitos lleva a pensar que dicha molécula puede emplearse como marcador en la identificación de la población monocítica ya que de todas las moléculas que se evalúan, esta presenta gran homología en la expresión en superficie celular, manteniendo poca dispersión en las subpoblaciones con poca variabilidad.

III. Preeclampsia como enfermedad Inflamatoria

Un problema de salud pública

La mortalidad materna en nuestro país, como en muchas partes del mundo en desarrollo, constituye un problema de salud pública, motivo de gran preocupación para los gobiernos, las instituciones y la sociedad. La generación de conocimiento para entender las enfermedades que actualmente atentan contra la salud materna contribuyen de manera directa con uno de los ocho Objetivos de Desarrollo del milenio (ODM) que a comienzos del siglo XXI los Estados Miembros de las Naciones Unidas se comprometieron a trabajar para combatir la pobreza en sus múltiples dimensiones: “ODM5-Mejorar la Salud Materna”.

Actualmente la mortalidad materna sigue siendo tema de discusión a nivel mundial para no escatimar recursos dirigidos a la resolución de las enfermedades que conciernen a este eje temático. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) registran la muerte de 830 mujeres aproximadamente cada día por causas prevenibles relacionadas al embarazo y parto, del cual, un 99% de la mortalidad materna corresponde a los países en desarrollo y aunque se ha reducido en alrededor del 44% entre el periodo 1990-2015, el alto número de muertes maternas en diversas zonas del mundo se originan durante el embarazo y el parto o después de ellos provocados por complicaciones que aparecen durante la gestación o problemas de salud presentes antes del embarazo, aunque la mayoría son prevenibles o tratables, otras se agravan con la gestación si no son tratadas como parte de la asistencia sanitaria a la mujer: hemorragias graves (en su mayoría tras el parto), infecciones (generalmente tras el parto), la hipertensión gestacional (Preeclampsia y eclampsia) y enfermedades como paludismo o la infección por VIH en el embarazo. En numerosos países la mortalidad materna y neonatal son dos de los indicadores más importantes de desigualdad social y de inequidad de género que afectan particularmente a la población con mayor rezago socioeconómico. Países como México cuentan con leyes tal es el caso de la NOM-007-SSA2-1993 “Atención de la mujer durante el embarazo, parto y posparto y del recién nacido” que tiene por objetivo establecer los criterios para atender y vigilar la salud de la mujer durante el embarazo y reducir la mortalidad materna, aunque existen factores

que impiden que las mujeres reciban o busquen atención durante el embarazo (pobreza, distancia y principalmente la falta de información acerca del padecimiento), la falta de generación de conocimiento en este tema de salud pública continua siendo un obstáculo para el tratamiento y diagnóstico oportuno.

En preeclampsia, cuya causa sigue desconocida, se asocian problemas de salud importantes como un trastorno hipertensivo inducido por el embarazo que se manifiesta clínicamente después de las 20 semanas de gestación cuya falta de manejo oportuno conduce a eclampsia¹⁰², donde las manifestaciones clínicas incluyen la hipertensión y proteinuria, además de edema¹⁰³. Aunque numerosos ensayos clínicos y bioquímicos se han propuesto para la predicción o la detección temprana de la preeclampsia, la mayoría siguen siendo poco realistas para su uso general. En la actualidad, no existe una sola prueba de detección fiable y rentable para la preeclampsia, que pueda ser recomendada para su uso^{104, 105}.

La participación de los monocitos durante el embarazo

Durante el embarazo, el sistema inmune materno es desafiado constantemente por un feto semi-alogénico lo que lleva a la adaptación del sistema inmune materno de manera sistémica y local. En la sangre periférica, la alteración del sistema inmune innato es evidente por la activación de células inmunes innatas, especialmente monocitos. A partir del segundo trimestre, estas células muestran fenotipos activados comparables con los observados en la sepsis sistémica sin las manifestaciones clínicas. Se considera que el embarazo normal, particularmente desde el segundo trimestre hasta el parto, está en estado de inflamación controlada. En contraste, los fenotipos inflamatorios severos no controlados se asocian con frecuencia a complicaciones obstétricas como la preeclampsia (PE) y el parto prematuro (PTL)¹⁰⁶. En la interfaz materno-fetal, desde el comienzo del embarazo normal, hay un aumento en las células inmunes innatas, como macrófagos y células NK. Estas células parecen jugar un papel crítico en la invasión del trofoblasto, remodelado vascular y placentación¹⁰⁷. La creciente evidencia sugiere que los monocitos en circulación periférica se infiltran específicamente en la decidua al inicio del embarazo y se desarrollan en macrófagos o células dendríticas¹⁰⁸, por lo tanto, la composición de monocitos de sangre periférica

puede afectar el desarrollo de efectores inmunes deciduales. Durante el embarazo normal, la mayoría de los macrófagos deciduales se caracterizan por un fenotipo inmunosupresor con polarización M2, lo que apoya la idea de que estas células desempeñan un papel importante en la tolerancia inmune materno-fetal¹⁰⁹. Por el contrario, en las complicaciones del embarazo como la PE, parece haber un mayor número de macrófagos M1, lo que contribuye a un desarrollo placentario deficiente¹¹⁰. Los macrófagos también representan un subconjunto importante de células presentadoras de antígeno (APC) en la decidua humana, y las APC deciduales están implicadas en la regulación de la homeostasis inmunológica local, que parece ser esencial para un embarazo exitoso¹¹¹.

Dentro de las tres subpoblaciones de monocitos reportadas se muestran diferencias en fenotipos, función y potencial inflamatorio¹¹²; los monocitos clásicos (que comprenden aproximadamente el 90% de los monocitos totales) se especializan en fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y secreción de citocinas inflamatorias en respuesta a la unión de ligandos, tales como el reconocimiento de LPS a receptores extracelulares TLR¹¹³. En comparación con los monocitos clásicos, los monocitos intermedios (aproximadamente el 5%) muestran las características de células activadas, como el aumento de las expresiones de los antígenos del MHC de clase II (HLA-DR) y el TNF en citoplasma celular⁸⁰. Por el contrario, los monocitos no clásicos (aproximadamente 5% de los monocitos) no generan ROS y poseen una actividad fagocítica débil, aunque segregan altas cantidades de citocinas proinflamatorias (TNF- e IL1) tras la activación de TLR por LPS, virus o ácidos nucleicos¹¹⁴. Estas células patrullan el endotelio vascular y eliminan fácilmente las células infectadas o dañadas por virus. De hecho, los monocitos CD16⁺ (monocitos intermedios / no clásicos) están implicados en la patogénesis de enfermedades inflamatorias¹¹². Las subpoblaciones de monocitos muestran activación fenotípica, como se caracteriza por la regulación de los marcadores de activación celular, tales como CD11b y CD14. Sus funciones también cambian durante el embarazo, como se refleja en el aumento de la producción de radicales libre de oxígeno y citocinas *in vitro*. Contrariamente a estos cambios, la función fagocítica de los monocitos está bastante disminuida, lo que puede proporcionar un mecanismo para proteger fetos alogénicos¹¹⁵.

En la sangre periférica, la activación aumentada de la inmunidad innata puede ser un mecanismo compensatorio necesario para mantener la inmunidad protectora frente a la infección, ya que la inmunidad adaptativa se suprime durante el embarazo¹¹⁶. El mecanismo que explica la activación de los monocitos durante el embarazo sigue siendo desconocido, aunque es aceptado que la placenta puede desempeñar un papel importante. En particular, los monocitos de sangre periférica circulan a través de la placenta y entran en contacto cercano con el trofoblasto viloso, que puede activar a los monocitos. Adicionalmente, diversos factores solubles, tales como micropartículas placentarias, restos de células fetales, citocinas y quimiocinas liberadas por los trofoblastos, pueden activar los monocitos adicionalmente¹¹⁷.

Los cambios en las subpoblaciones de monocitos durante el embarazo normal registran disminución en el número de monocitos clásicos, mientras que el número de monocitos intermedios aumenta. Estos resultados están de acuerdo con la visión general de que el embarazo se asemeja a una condición proinflamatoria¹¹⁸. Los datos de otras enfermedades inflamatorias también confirman que la subpoblación de monocitos intermedios está específicamente presente en números altos. En contraste se ha reportado un mayor número de monocitos clásicos y una disminución del número de monocitos no clásicos en mujeres embarazadas en comparación con las mujeres no embarazadas¹¹⁹. Estas discrepancias pueden deberse a diferencias en los métodos experimentales y en las poblaciones estudiadas. En el momento del parto, los leucocitos maternos circulantes son reclutados en el cuello del útero, miometrio y decidua, y desarrollando un estado pro-inflamatorio que induce al trabajo de parto. Estas células muestran una activación fenotípica adicional justo antes del parto. Se ha informado que en la sangre placentaria al término de la gestación, y particularmente durante el trabajo de parto, el número de leucocitos CD14 + y la producción de citocinas pro-inflamatorias por los monocitos aumentan significativamente, lo que indica el importante papel de los monocitos en el parto¹²⁰.

Monocitos y Preeclampsia

La preeclampsia es un trastorno asociado al embarazo que amenaza la vida y se caracteriza por el inicio de la hipertensión y la proteinuria después de las 20 semanas de gestación. Durante la PE los monocitos circulantes se activan aún más, incluyendo el aumento de la expresión de moléculas asociadas con la inflamación, tales como CD11b, ICAM1 y CD14, y el aumento de la producción de IL-1, IL-6 así como radicales libres de oxígeno; sin embargo, la función fagocítica de los monocitos se reduce aún más¹¹⁵. Además, los monocitos pueden inducir la activación del sistema inmune innato a través de la vía TLR4, lo que induce el aumento de la producción de citocinas proinflamatorias en PE. Por una parte existen datos de modelos experimentales de ratas que han proporcionado evidencia del papel central de los monocitos periféricos en la patogénesis de la PE. En las ratas embarazadas, la activación de los monocitos, por trifosfato de adenosina (ATP) o LPS, puede inducir signos característicos de la enfermedad, como hipertensión y proteinuria¹²¹, lo cual demostró que la activación de los monocitos puede inducir signos similares a la preeclampsia sólo en ratas embarazadas, pero no en las no embarazadas, lo cual sugiere que la activación de los monocitos periféricos durante el embarazo tiende a ser un desencadenante de PE¹¹⁹.

Por otro lado, en la preeclampsia humana, una mala placentación ha sido considerada como un factor clave para desarrollar PE¹²². La placenta en este estado de estrés produce varios factores, incluyendo ATP¹²³, micropartículas de membrana sincitiotrofoblástica placentaria (STBM)¹²⁴ y citocinas proinflamatorias¹²⁵, con lo cual se pueden activar directamente los monocitos periféricos, lo que a su vez puede provocar la secreción elevada de citocinas proinflamatorias.

Con esta caracterización inflamatoria durante la preeclampsia, la participación de TLR juega un papel importante para desencadenar respuestas de carácter innato. Recientemente la descripción de la familia de receptores TREM y su interacción con receptores TLR para inducir y prolongar respuestas inflamatorias¹²⁶ pueda explicar la participación de los monocitos bajo estas condiciones en la preeclampsia ya que se han descrito dos funciones dentro de los receptores de la familia TREM, potencialización o inhibición de las respuestas inflamatorias; el primer caso contrasta con las funciones

que desencadena el receptor TREM-1 actuando de forma sinérgica con receptores tipo Toll-Like involucrando enfermedades infecciosas y no infecciosas^{126, 127}. Otro receptor de relevancia en enfermedades inflamatorias y que caracteriza la movilidad de subpoblaciones de leucocitos es CD11b, que es complemento de un complejo (MAC-1) expresado principalmente por fagocitos (principalmente neutrófilos y monocitos)¹²⁸. El daño a epitelio vascular durante la PE también provoca movilización leucocitaria¹²⁹., siendo los monocitos los primeros en responder a daño endotelial al ser reclutados en los sitios para la remodelación vascular debido a que moléculas de adhesión son expresadas en la superficie del endotelio activado (ECs) permitiendo el reclutamiento de monocitos circulantes a sitios de lesión para generar procesos de reparación y propiciar la homeostasis vascular¹³⁰. Sin embargo diferentes investigaciones no logran identificar la subpoblación de monocitos que expresa de forma diferencial CD11b en la superficie celular incluso se ha concluido que no hay una expresión diferencial durante la PE¹³¹ .

Debido a las dificultades de estudiar el papel de los monocitos en sujetos humanos con PE in vivo, aún no está claro si las características expuestas anteriormente son los factores causales o el resultado de la PE. Algunos experimentos in vivo inhibiendo la activación de monocitos o el agotamiento de monocitos han observado si la manifestación de la PE inducida por ATP o LPS en modelos experimentales podría ser capaz de explicar mejor la causa, sin embargo se requieren mejores alternativas para el análisis de estas subpoblaciones.

Planteamiento del problema

Es claro que la identificación y caracterización de los monocitos conlleva una dificultad al momento de su detección mediante un inmunofenotipo ya que las moléculas o receptores de los cuales nos valemos para identificar una célula sufren diferentes procesos durante una respuesta inmune que llevan a la regulación de los principales marcadores de identificación de los monocitos (CD14 y CD16) durante las respuestas inflamatorias. Por su parte la confusión con otras células (PMN y linfocitos) por la morfología homologa que presentan y la expresión de los marcadores clásicos (HLA-DR y CD16) dificulta el análisis aislado de las subpoblaciones de monocitos. Evidencias recientes muestran que otras moléculas expresadas en la superficie de los monocitos podrían emplearse como un tercer marcador de identificación aunque hasta ahora no se ha estudiado la expresión diferencial en estas células en los diferentes procesos que evalúan las funciones celulares *in vitro* o *in vivo*.

Justificación

Investigaciones recientes sobre fisiopatologías involucran a los monocitos en enfermedades inflamatorias llegando a la conclusión que para poder observar detalladamente las funciones de cada una de las subpoblaciones de monocitos se debe contar con algoritmos de análisis que puedan distinguir esta población de otras células en ambientes heterogéneos ya que representan una herramienta para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias que hasta hoy en día no se han caracterizado de forma satisfactoria.

Hipótesis

TLR-2 al variar mínimamente su expresión y presentarse exclusivamente entre las subpoblaciones de monocitos permitirá identificarlas con mayor objetividad y facilidad en ensayos de activación celular y en enfermedades inflamatorias.

Objetivo

General:

- Evaluar la expresión del receptor tipo Toll-2 (TLR-2) como marcador de identificación y caracterización de monocitos clásicos y no-clásicos y compararla con la estrategia de análisis convencional.

Específicos:

- Diseñar un panel de anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos que permita, a través de TLR-2, HLA-DR y CD16, la identificación y caracterización de monocitos clásicos y no clásicos de muestras de sangre periférica.
- Ajustar las condiciones óptimas de inmunomarcaje para la adquisición de las muestras por citometría de flujo.
- Establecer la mejor estrategia de análisis para la identificación y caracterización de los leucocitos de sangre periférica.
- Comparar la estrategia planteada con la estrategia convencional que involucra CD14 y CD16.
- Aplicar el análisis de las células en conjunto con la detección de marcadores fenotípicos (de superficie e intracelulares) bajo condiciones de estimulación celular.
- Aplicar el análisis de las células en ensayos de fagocitosis.
- Como modelo, aplicar el panel de anticuerpos y la estrategia de análisis a muestras clínicas de mujeres embarazadas diagnosticadas con Preeclampsia.

Materiales y metodología

Esquema general de trabajo

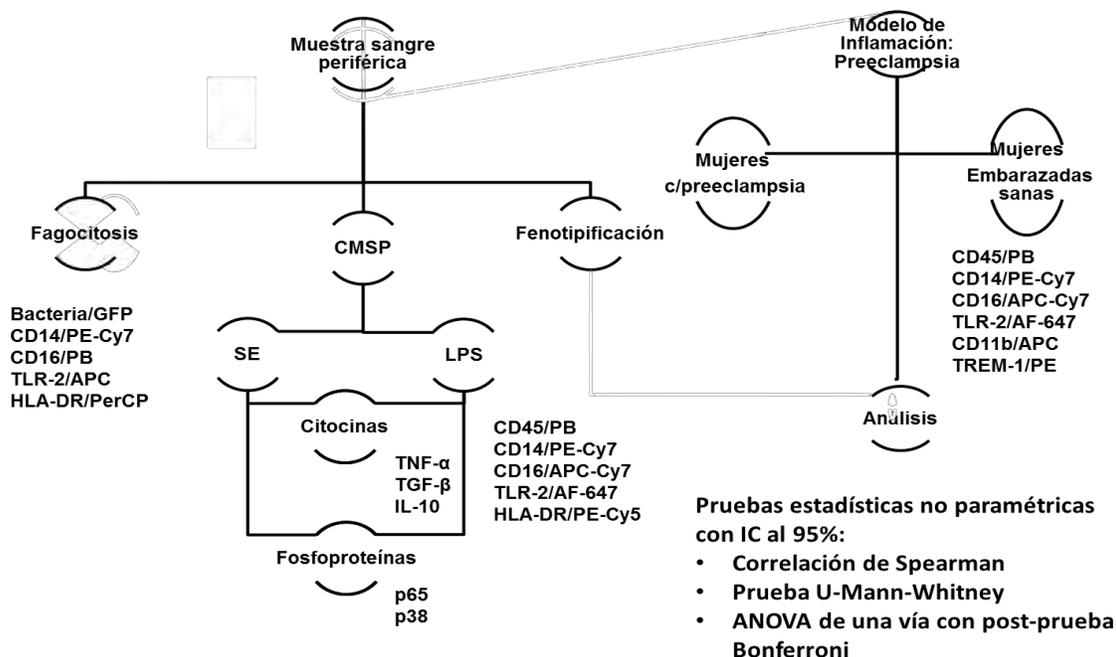


Figura 8.0 Esquema general de trabajo.

Sujetos de estudio

Los sujetos seleccionados para el presente estudio se distribuyeron en dos grupos: un grupo control (GC) para estimulación celular, seguido de la comparación entre un grupo de mujeres embarazadas normotensas (MES) y otro de mujeres embarazadas diagnosticadas con preeclampsia (MEP), ambas situadas en el tercer trimestre de embarazo.

✓ Criterio de selección de sujetos

Los sujetos GC fueron tomados al azar de los integrantes de la Torre de Investigación dentro del departamento de Inmunología e Infectología del Instituto Nacional De Perinatología (INPer). Los sujetos del grupo MEP y MES fueron diagnosticados y seleccionados en la misma Institución de Salud, cuyo protocolo fue aprobado por el comité de ética del Instituto.

Obtención de la muestra

Las muestras sanguíneas se recolectaron con previa asepsia del área de toma de muestra, obteniendo 5mL de sangre periférica por venopunción humeral en tubos vacutainer con EDTA K₂ y con heparina de sodio/Litio, utilizando el primer tubo para la inmunofenotipificación directa y el segundo para protocolos que involucraron el manejo de CMSP y evaluaciones de activación celular.

Estrategia de Análisis clásica (E1) por citometría de flujo

Con el programa DIVA (BD), se capturaron los resultados de cada protocolo siendo analizados bajo el programa Summit v4.3 con base en el algoritmo convencional “E1”, cuyo panel constituido por los antígenos CD45, HLA-DR, CD14, CD16 y con el uso de la herramienta en línea “BD Fluorescence spectrum viewer”, (<http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer>) se seleccionaron los fluorocromos acoplados a los anticuerpos que tenían el menor grado de traslape de sus espectros de emisión. El arreglo se muestra en la tabla 2.0. Para la identificación de subpoblaciones de monocitos por E1, se siguió el siguiente algoritmo de análisis: mediante un diagrama de puntos *FSC-H versus FSC-A*, se hizo la selección de los eventos sencillos (células no agregadas o singlets) para visualizar la distribución de todos los leucocitos de circulación periférica en un diagrama de puntos *SSC versus CD45*, donde la selección de los monocitos de las células mononucleares se extendió ligeramente sobre la región linfóide por el empalme de las dos poblaciones. Esta última selección se visualiza con un diagrama de puntos *HLA-DR versus CD14*, para discriminar las células cuyo fenotipo CD14⁻HLA-DR⁻ no corresponden al fenotipo establecido para los monocitos y la selección de las células CD14⁺HLA-DR^{high} permita la identificación de las tres subpoblaciones de monocitos con base en la expresión diferencial que se sigue un diagrama de puntos *CD14 versus CD16* (Figura 8.0).

Inmunofenotipificación por citometría de flujo

A fin de verificar la expresión relativa de las moléculas de identificación y caracterización en monocitos se partió de un banco de anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos que en conjunto con una herramienta en línea como *spectral*

viewer (BD) para el diseño de un panel multiparamétrico de 9 marcadores que permite la identificación y caracterización de leucocitos de sangre periférica con las moléculas de superficie CD45, CD16, HLA-DR, TLR-2, CD14, TREM-1, CD14 y CD11b. Dicho panel se probó en muestras de sangre periférica del grupo control, mujeres embarazadas sanas y mujeres con preeclampsia del 3er mes de gestación para determinar el porcentaje de monocitos y la expresión de marcadores de activación celular posteriormente.

Para ello, 50 μ L de las muestras colectadas en tubos vacutainer con EDTA K₂ como anticoagulante fueron incubadas con una cantidad especificada de los anticuerpos anti-HLA-DR conjugado con ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5), anti-CD14 conjugado con ficoeritrina-Cy7 (PE-Cy7), anti-CD16 conjugado con alofococianina (APC), anti-CD282 (TLR-2) conjugado con Alexa Fluor 488 (AF-488) y anti-CD45 conjugado con Azul pacifico (PB).

Por cada muestra se rotularon dos tubos, uno para medir la autofluorescencia de las células y el otro tubo correspondiente a la tinción al cual se adicionó la cantidad especificada de los anticuerpos fluorocromados, asegurándonos que dichos anticuerpos fueron titulados. Nota: Con más de tres tinciones, se realizó un "cocktel" de anticuerpos calculando un exceso del 10%, para más de 5 tinciones, se calculó un exceso del 15%. Se adicionaron 50 μ L de sangre o 1×10^6 cell/100 μ L a cada tubo correspondiente, agitando los tubos mínimo 3 segundos en vortex, para su posterior incubación 15'/temp.ambiente/oscuridad. Posteriormente se adicionó 450 μ L de la solución BFS-BD (solución preparada al instante 1:10 con H₂O destilada o miliQ) con "agitación" vigorosa y se incubo bajo las siguientes condiciones: 10'/temp.ambiente/oscuridad. Pasado el tiempo, se agregaron 1000 μ L de solución salina o BFS o Facs Flow y se "lavarón" las células centrifugando 400g/5' para posteriormente decantar el sobrenadante por inversión, cuidando el precipitado formado. Las muestras fueron procesadas y adquiridas en el citómetro de flujo o almacenadas a 4°C protegidos de la Luz.

Descripción de variables

- ✓ Variables controladas
 - Condiciones de Estimulación
 - Lipopolisacárido
 - Tiempo de incubación
- ✓ Variables de respuesta
 - Porcentajes en las subpoblaciones de Monocitos
 - Expresión relativa de marcadores de superficie: CD45, TLR-2, HLA-DR, CD14, CD16, CD11b y TREM-1.
 - Secreción de citocinas intracelulares
 - Expresión relativa de p65, p38, TNF- α , TGF- β , IL-10, p65 y p38

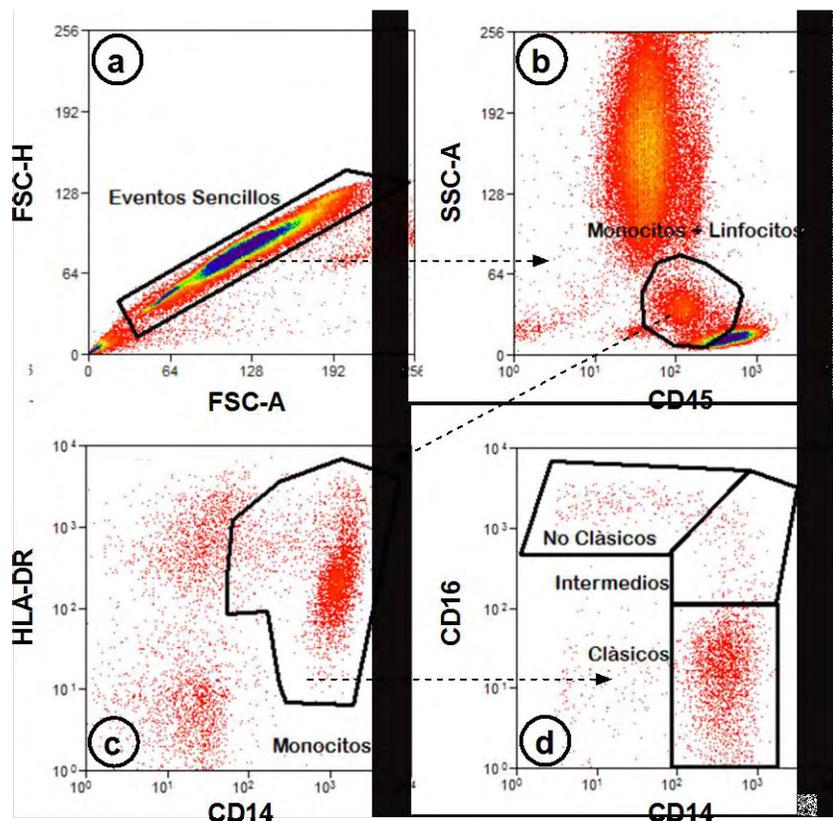


Figura 9.0 Estrategia de análisis E1 para la identificación de subpoblaciones de monocitos.

Los monocitos son identificados a partir de la expresión de CD45 (b) provenientes de seleccionar eventos sencillos (a). La selección de células CD14⁺HLA-DR^{high} pertenecen al fenotipo de los monocitos (c), permitiendo identificar las subpoblaciones de monocitos bajo el fenotipo establecido por la nomenclatura convencional: Clásicos (CD14⁺CD16⁻), intermedios (CD14⁺CD16⁺) y no clásicos (CD14⁻CD16⁺) (d).

Especificaciones de los equipos utilizados

- Todas las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSAria™ III cell sorter (BD Biosciences, San José, CA).
- Centrifuga eppendorf 5804R utilizando un modelo de rotor A-4-44 para tubos de citometría y tubos vacutainer para gradientes de densidad y un modelo de rotor GE-008 para microtubos eppendorf o en su caso una centrifuga eppendorf 5702 no refrigerada.
- La viabilidad y densidad celular fueron obtenidas empleando un contador automatizado “Countess™ Automated Cell Counter de Invitrogen™”: placas de conteo celular de “Countess® Cell Counting Chamber Slides, Lot:2C07151”
- El aislamiento de CMSP así como las estimulaciones se llevaron a cabo es un equipo “Heraeus Holten HV Laminar Airflow Workstations 2436”.
- Las incubaciones para las cinéticas realizadas en todo el proyecto se realizaron en un equipo “Thermo Scientific Forma Series II Water. Jacketed CO₂ Incubators” bajo las siguientes condiciones de incubación: 37°C//5%CO₂

Tabla 2.0 Mabs empleados para la identificación y caracterización de los Monocitos

Marcador	Clona	Fluorocromo	Detector (BP)	Proveedor
CD11b (Mac1-a)	CBRM1/5	APC	660/20	BioLegend
CD14 (LPS-R)	63D3	APC H7	780/60	BioLegend
	HCD14	PE-Cy7	780/60	BDbiosciences
CD16 (Fc-gamma RIII)	3G8	PE-Cy5	695/40	BDbiosciences
	-	FITC	530/30	Immunotech
	3G8	APC-Cy7	780/60	BDbiosciences
	3G8	Pacific Blue	450/40	BDbiosciences
CD45 (LCA)	H130	Pacific Blue	450/40	BDbiosciences
HLA-DR (MHC class II)	G46-6	PE-Cy7	780/60	BDbiosciences
	L243	PE-Cy5	695/40	BDbiosciences
	L243	PerCP	695/40	BDbiosciences
IL-10 (CSIF)	JES3-9D7	BV421	450/40	BDbiosciences
NF-kB p65 (pS529)	K10-895.12.50	PE-Cy7	780/60	BDbiosciences
p38 MAPK (pT180/pY182)	36/p38 (pT180/pY182)	PE	585/42	BDbiosciences
TGF-β1	CH6-17E5.1	PE	585/42	MACS
TLR-2 (CD282)	T2.5	AF-488	530/30	BDbiosciences
	11G7	AF-647	660/20	BioLegend
	TL2.1	FITC	530/30	eBiosciences
TNF-a	MAb11	APC	660/20	BioLegend
TREM-1	TREM-26	PE	585/42	BioLegend

*Mabs: anticuerpos monoclonales

El panel de anticuerpos para las estrategias de análisis fueron construido con apoyo del programa en línea *BD Fluorescence spectrum viewer*.

Procedimiento experimental

Titulación de anticuerpos y generación de controles de compensación

Los anticuerpos se titularon como parte de la estandarización para encontrar las concentraciones optimas de uso en muestras de sujetos sanos. Una vez establecidas las concentraciones de los anticuerpos se realizó la prueba de la utilidad de todos los anticuerpos en conjunto y se estableció la mejor estrategia de análisis (E2) que se aplicó a las muestras del protocolo. Por otra parte se generaron controles compensación para el fluorocromo que estaba acoplado al anticuerpo en estudio a fin de conocer su fluorescencia y evitar que está interfiera en un detector del equipo que no fuera el propio.

Para cada Fluorocromo a analizar se realizó una tinción, para lo cual se preparó un mix con 1 gota de perlas de detección + 50µL de Facs Flow /Fluorocromo + 50µL Facs Flow/autofluorescencia, se mezcló vigorosamente y se repartió un volumen de 50µL de la solución por cada tubo etiquetado para un fluorocromo diferente. Posteriormente se adicionaron 0.5µL del anticuerpo correspondiente y luego de mezclar en vortex, se incubaron bajo las siguientes condiciones 15'/temp.ambiente/oscuridad. Posteriormente se “lavarón” con 500µL de solución salina o FACS Flow y centrifugaron a 400g/5min. Pasado el tiempo se decantaron y re suspendieron en un volumen remanente para ser leídas en el citómetro de Flujo.

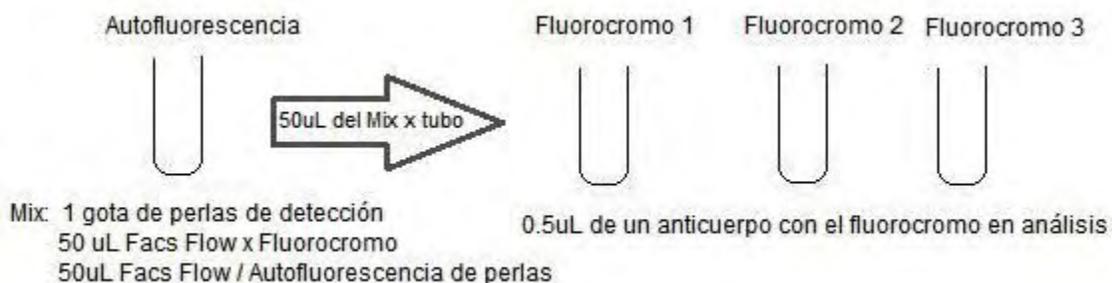


Figura 10.0 Protocolo para generar controles de compensación

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y recuento celular

De cada sujeto se obtuvieron de 5-7 mL de sangre periférica por venopunción con previa asepsia de la zona de trabajo. La sangre se colectó en tubos estériles que contenían 100 UI totales de heparina de sodio/Litio como anticoagulante.

El volumen de sangre obtenido se diluyó en una relación 1:1 con solución salina estéril. La suspensión obtenida se colocó en tubos de polipropileno a los cuales se les adicionó previamente Lymphoprep™ (Isolation of human mononuclear cell) a temperatura ambiente en una relación 1:2 cuidadosa y lentamente con una pipeta de 10 mL cuidando de no mezclar las fases dejando caer la sangre por las paredes del tubo sin introducir la punta de la pipeta. Los tubos se centrifugaron bajo las siguientes condiciones: 600g/temp.ambiente/15 min/Accel: 0, Brake: 0 en una centrifuga. Después del tiempo de centrifugación, en condiciones estériles, se extrajo en un tubo nuevo

previamente etiquetado el concentrado de CMSP sin arrastrar otras poblaciones, tal como se muestra en la figura 11.0

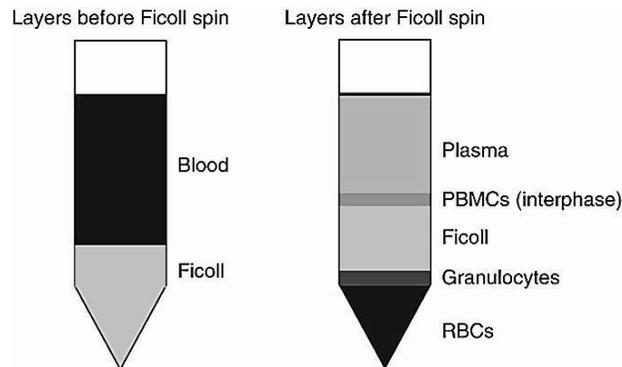


Figura 11.0 Representación al realizar un gradiente celular por Ficoll

Después de recuperar todas las CMSP se lavó adicionando 2 mL de Solución salina estéril (PBS) y centrifugando a 400g/5 min. Posteriormente se decantó por gravedad, repitiendo el proceso si aún se conservaba suciedad (eritrocitos).

Finalmente se apreció la formación de un concentrado de CMSP “lavados” y se resuspendió en un volumen conocido de medio RPMI o PBS y se procedió a la verificación de la viabilidad y densidad celular utilizando azul de tripano como colorante de tinción, el cual consistió en adicionar 5µL de la suspensión de CMSP en 45µL de azul de tripano con una homogenización en agitador tipo vortex durante 5 segundos. De la mezcla anterior se tomaron 10µL y se colocaron en una placa de conteo celular automatizada para finalmente evaluar la viabilidad y densidad celular con los datos que el equipo arrojaba:

Número total de células: # x 10⁶/mL

Células vivas: # x 10⁶/mL

Células muertas: # x 10⁶/mL

Viabilidad celular: #%

De acuerdo al número obtenido de células vivas se adiciono 1 x 10⁶ células a placas de cultivo con 500µL de medio de cultivo Gibco™ RPMI 1640. La viabilidad promedio de las CMSP enriquecidas fue del 87.9%

Estimulación de CMSP

En la campana de flujo laminar se trabajaron cajas de cultivo celular en condiciones sin estímulo (SE) y con LPS de E.coli cepa O111:B4 [10 ng/μL] homogenizado por 15 minutos, con 250 a 500 μL de sangre o en su caso 1 x 10⁶ células, agregando 1 μL de BD GolgiPlug™ y 0.5 μL de BD GolgiStop™ para las determinaciones intracelulares de citocinas. Las incubaciones se realizaron por 24 horas (37°C/5% Humedad/5% CO₂), muestreando cada condición a tiempos especificados para realizar un inmunofenotipo.

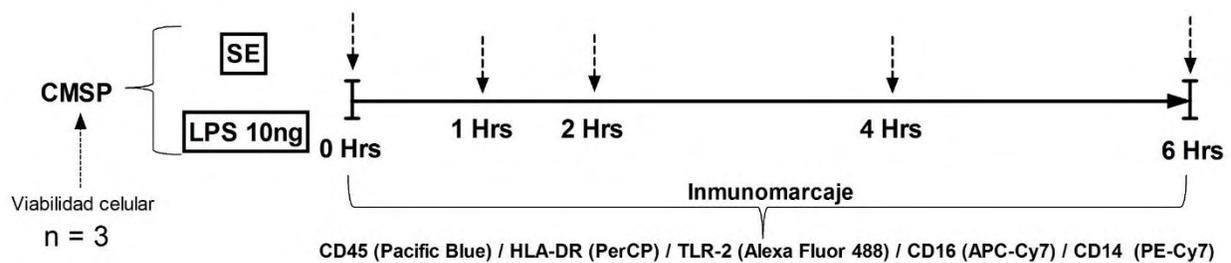


Figura 12.0 Protocolo experimental para la estimulación de CMSP.

Detección de citocinas intracelulares

Después del tiempo de incubación, se obtuvieron 50 μL de cada condición y se realizó un “lavado” con 500 μL de PBS centrifugándose a 400g/5min. Después de homogenizar el botón celular se realizó el inmunomarcaje de superficie con el panel de anticuerpos propuesto incubándose durante 15 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo, las células se lavaron con PBS a 400g/5min y de nuevo se resuspendió el botón celular para fijar y permeabilizar adicionando 100 μL de una solución BDCytofix/Cytoperm en una proporción 1:5 con agua miliQ. Se incubaron 20min/4°C y se lavaron con 450 μL de una disolución de buffer Perm/wash™ 1:10 con agua miliQ. Después de centrifugar 400g/10min las células se resuspendieron en 50 μL de la disolución buffer Perm/wash™ 1:10 con agua miliQ y se adicionaron 5 μL de cada anticuerpo para la detección de citocinas para ser incubadas después de homogeneizar el medio durante 30min/4°C/oscuridad.

Pasado tiempo se lavaron las células con 450µL del buffer Perm/wash™ 1:10 con agua miliQ y se centrifugaron 400g/10min. Al final se decantaron por inversión y se adquirieron los datos en el citómetro de flujo o fueron almacenados a 4°C/oscuridad.

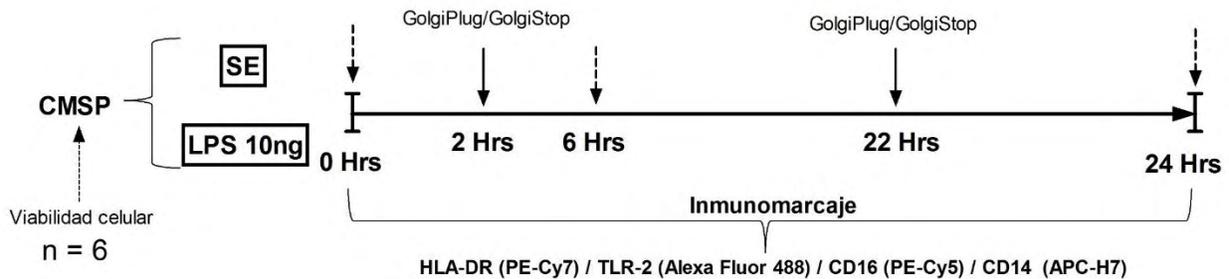


Figura 13.0 Protocolo experimental para la detección de citocinas intracelulares

Detección de fosfoproteínas

Después del tiempo de incubación se obtuvieron 50µL de cada condición y se realizó un “lavado” con 500µL de PBS centrifugándose a 400g/5min. Después de homogeneizar el botón celular se realizó el inmunomarcaje de superficie con el panel de anticuerpos propuesto incubándose durante 15 minutos en oscuridad. Posteriormente se adiciono por cada volumen de CMSP 20 partes de una solución BD phosflow™ 1:5 con agua miliQ mezclando vigorosamente por inversión de 8-10 veces e incubando a temp.ambiente/10min./oscuridad. Se centrifugaron las muestras 400g/5min para después realizar un lavado de las células con 500µLy centrifugación a 400g/5min. Decantando la muestra por inversión se adiciono 1 mL de un agente permeabilizador, metanol frio, cuidadosamente y se incubo durante 20minutos a 4°C.

Posteriormente se lavaron con PBS 500µL/400g/5min. El volumen resuspendido fue incubado con 5µL del anticuerpo seleccionado para la detección de fosfoproteínas durante 30min/temp.ambiente/oscuridad. Finalmente se lavaron con 500µL de PBS centrifugándose a 400g/5min para ser analizadas en el citómetro de flujo o almacenadas a 4°C protegidos de la luz.

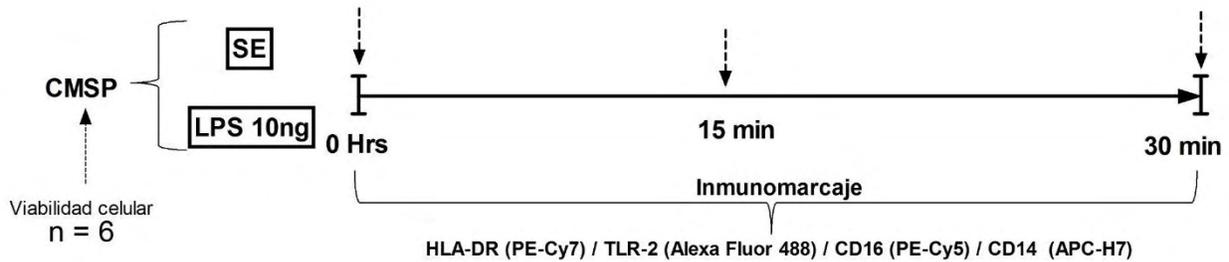


Figura 14.0 Protocolo experimental para la detección de fosfoproteínas

Protocolo para evaluar capacidad fagocítica usando el “pHrodo Bioparticles Phagocytosis Kit for Flow Cytometry”

Se generaron 3 tubos por cada muestra previamente identificados: Control negativo en hielo, control negativo 37°C y control positivo a 37°C. A cada tubo se le adiciono 50µl de sangre y solo al control positivo 10µl de pHrodo Bioparticles. Posteriormente se colocaron en las temperaturas de incubación marcadas por 15 minutos. Posteriormente se adicionaron 50µL de Lysis Buffer A (Component A) a todos los tubos, se vortexeo brevemente e incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalizado este tiempo se adicionaron 500 µL de Buffer B a las muestras, se vortexeo brevemente, e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos más para luego centrifugar a 400g/5min/Tem.Amb. Se decantó el sobrenadante y resuspendio el botón celular en 500 µL de Buffer de lavado (Component C). Finalmente se adiciono el mix de anticuerpos y se incubó 30-45 min a 4°C en oscuridad. Se realizó un lavado adicionando 1 mL de PBS y se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo.

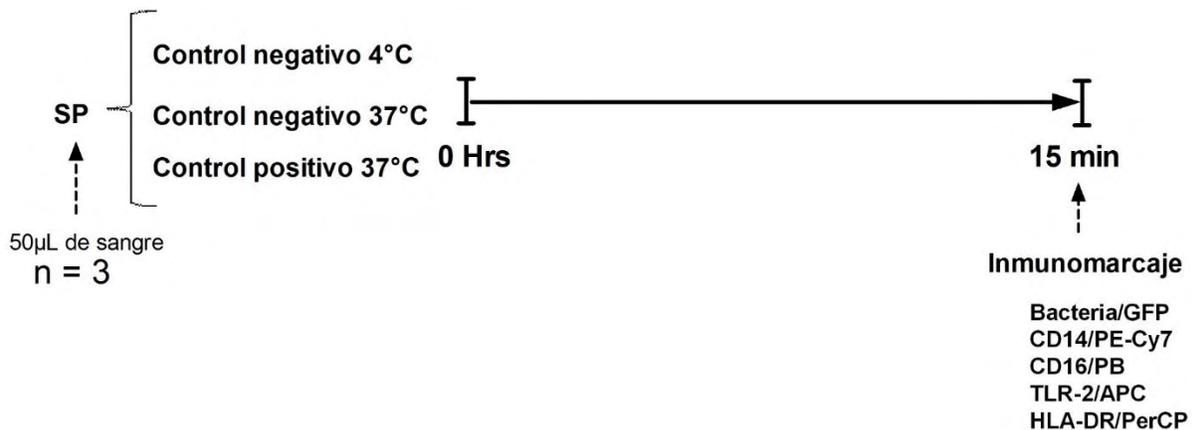


Figura 15.0 Protocolo experimental para la evaluación de la capacidad fagocítica

Análisis estadístico

Los porcentajes celulares y la expresión en superficie de los marcadores celulares obtenidos por ambas estrategias se analizaron por medio de una correlación de Spearman por tratarse de un conjunto de datos no paramétricos. Los valores obtenidos para la IMF de las tinciones intracelulares y los datos obtenidos de la prueba de fagocitosis se analizaron mediante una prueba U-Mann-Whitney que es una prueba modificada t-student para datos no paramétricos. Así mismo, con la prueba de U-Mann-Whitney se compararon las muestras de mujeres embarazadas sanas vs las mujeres con preeclampsia.

Resultados

Expresión diferencial de las moléculas CD45, HLA-DR, CD14 y CD16 en leucocitos de sangre periférica para la identificación de monocitos

La evaluación de las moléculas CD45, HLA-DR, CD14 y CD16 permite identificar las poblaciones celulares en sangre periférica en base a sus propiedades de granularidad (SSC-A) y la expresión diferencial de las mismas. De esta manera, la expresión de CD45 de las células mononucleares totales (monocitos y linfocitos con baja e intermedia complejidad) es mayor a la de granulocitos (intermedia-alta complejidad) (Figura 16-a). Así mismo, la expresión de HLA-DR de monocitos y una población de linfocitos es alta, mientras que para las poblaciones de granulocitos y otros linfocitos es baja o cercana a la autofluorescencia (Figura 16-b). Particularmente, en la región de monocitos, se observa una extensión de la misma (población cometa) con mayor expresión de HLA-DR, pero de menor complejidad. Por otra parte, de la región correspondiente a monocitos la expresión de CD14 es heterogénea, observándose otra población cometa, cuyos eventos que componen la cola incluyen células de nula a intermedia expresión de CD14 y de baja complejidad (Figura 16-c). Finalmente, el marcador CD16 lo encontramos en la región de linfocitos (media expresión) y granulocitos (alta expresión), siendo en el caso de los monocitos heterogénea (baja a nula expresión) (Figura 16-d). Por lo anterior, es de notar que utilizando individualmente CD45, HLA-DR, CD14 o CD16 no se pueden delimitar tan fácilmente los monocitos debido a la expresión similar de cada molécula con otros leucocitos en sangre periférica ya sea de la población total o con las poblaciones menos frecuentes.

Expresión de TLR-2 en leucocitos de sangre periférica

TLR-2 ha sido utilizado como molécula de caracterización en diferentes células. Empleándola como molécula de identificación, en conjunto con las propiedades de complejidad de los leucocitos, observamos que su expresión en linfocitos es baja-nula y la de granulocitos baja, mientras que para los monocitos, su expresión es mayor respecto a los demás leucocitos (Figura 17-a). Además, podemos observar que la expresión de TLR-2 en monocitos es homogénea y la selección de estas células en diagramas de puntos, no traslapa con otras poblaciones, lo cual permite distinguirlas de

los demás leucocitos con mayor facilidad que con las moléculas CD45, HLA-DR y CD14. Así mismo, en la selección de monocitos, si bien, se observa una población cometa cuya cola es de menor expresión de TLR-2 y menor complejidad, no se superpone en la región de otros leucocitos. Es de resaltar que bajo esta previa selección a través de TLR-2, el patrón en la expresión diferencial de CD14 y CD16 corresponde al descrito para la identificación de las subpoblaciones de monocitos (Figura 17-b).

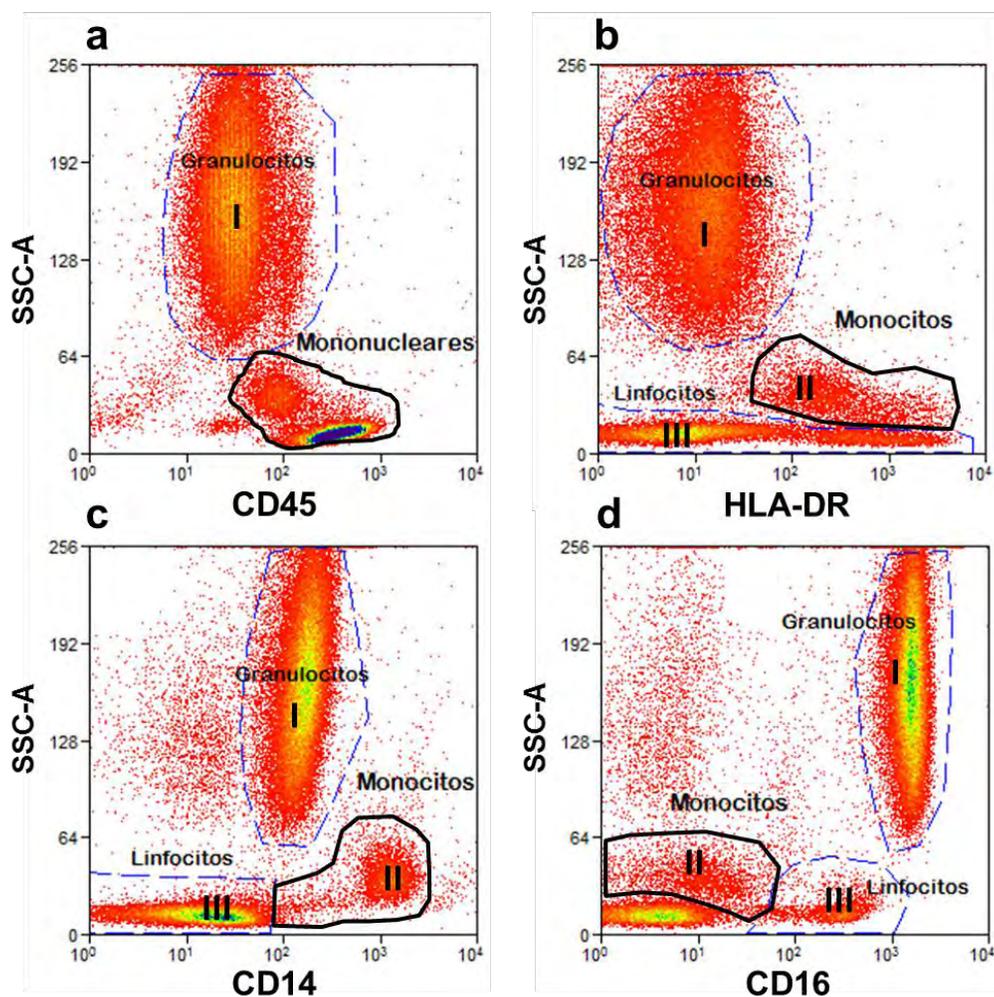


Figura 16. Patrones de expresión en poblaciones de Leucocitos de sangre periférica de moléculas para la identificación de monocitos. A partir de evaluar eventos sencillos delimitados por los parámetros FSC-A versus FSC-H se generaron diagramas de puntos con una estrategia de análisis del parámetro SSC-A contra cada una de las moléculas de identificación, permitiendo observar la expresión individual en las diferentes poblaciones de leucocitos de sangre periférica: granulocitos (I), monocitos (II) y linfocitos (III) para CD45 (a), HLA-DR (b), CD14 (c) y CD16 (d).

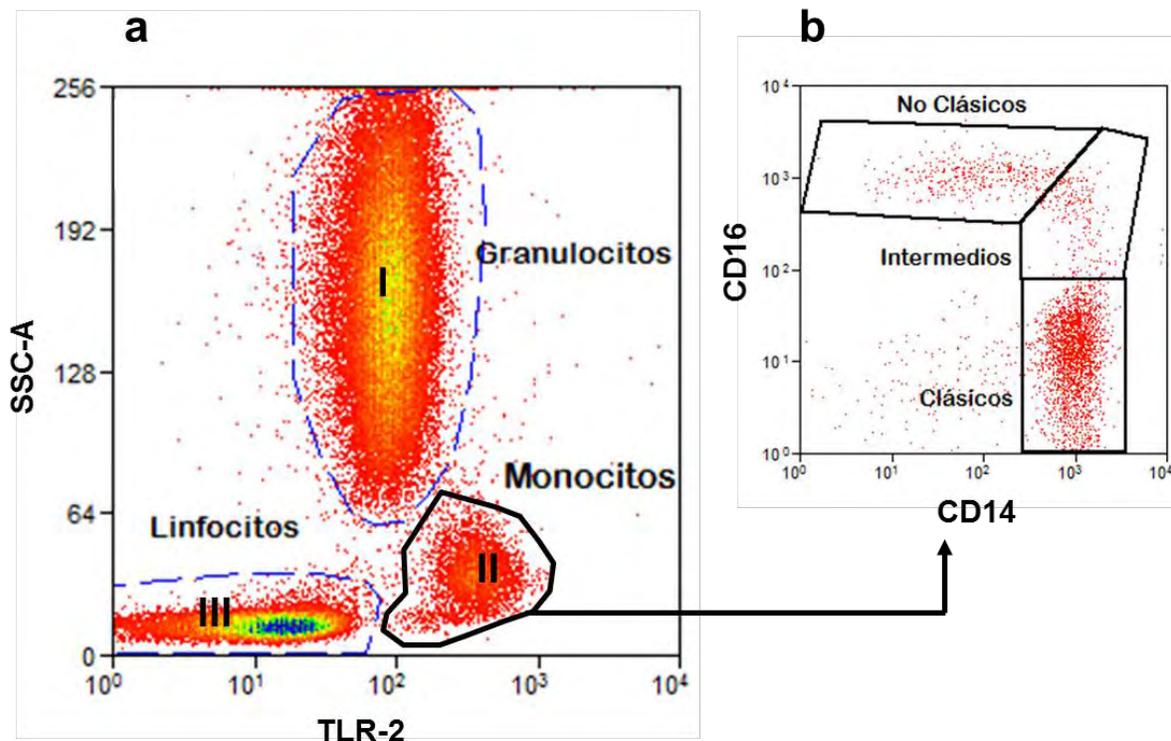


Figura 17. Uso de TLR-2 como molécula de identificación y caracterización para Monocitos. a: diagrama de puntos SSC-A versus TLR-2, donde los Monocitos (II) identificados como TLR-2⁺ son seleccionados respecto a la expresión diferencial alta que mantienen sobre los Granulocitos (I) y Linfocitos (III). b: Diagrama de puntos CD14 versus CD16, donde son identificadas las tres subpoblaciones de monocitos reportadas como Clásicos (CD14⁺CD16⁻), Intermedios (CD14⁺CD16⁺) y No Clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) y cuyos eventos son la representación de la selección de los Monocitos TLR-2⁺ (II).

Selección de monocitos TLR-2⁺ como parte del algoritmo de análisis para la identificación de subpoblaciones de monocitos

En el panel multiparamétrico que incluyó los marcadores para la identificación de subpoblaciones de monocitos por la estrategia E1 (Figura 9.0) también se introdujo a TLR-2. Considerando este último, junto con HLA-DR, en el algoritmo de análisis para diferenciar a los monocitos dentro de las células mononucleares totales (Figura 18-e), observamos que las poblaciones de monocitos se separan con mayor resolución de las demás células que lo que hacen CD14 y HLA-DR en la estrategia E1 (Figura 18-b). Tomando en cuenta este algoritmo de identificación denominado E2, observamos que los monocitos, si son explorados por la expresión de CD16 se pueden distinguir

claramente las tres subpoblaciones (Figura 18-f). Además, si exploramos la distribución porcentual de las mismas, observamos que los valores entre ambas estrategias de análisis son similares. Aplicando la estrategia de análisis a 5 sujetos controles, observamos, que los porcentajes de las subpoblaciones de monocitos correlacionan entre ambas estrategias, sin ninguna diferencia significativa entre ambas, indicando que ambas estrategias son comparables (Tabla 3.0).

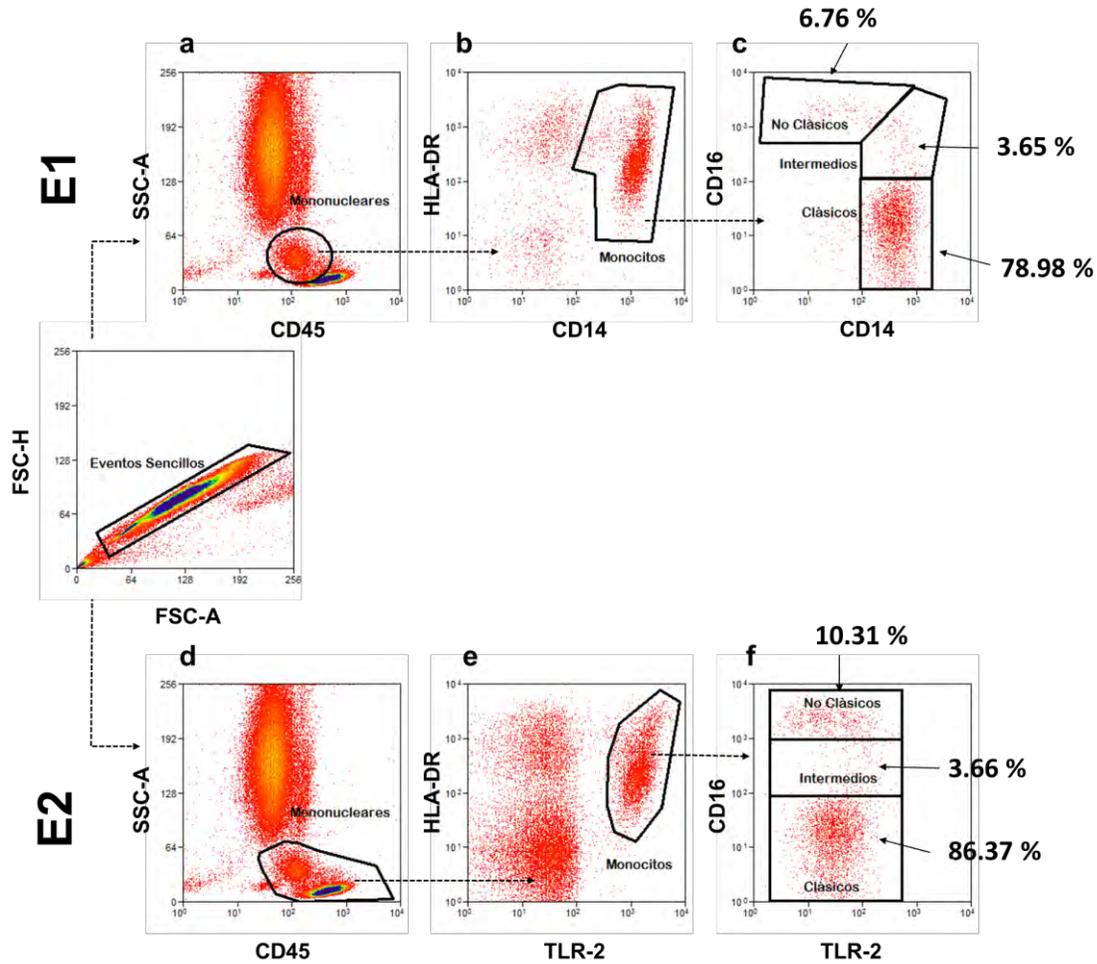


Figura 18. Comparación en las estrategias de análisis para la identificación de las subpoblaciones de monocitos. Ambas estrategias evaluadas (E1 y E2) parten de un análisis de eventos sencillos seleccionados a partir del diagrama de puntos FSC-A versus FSC-H, realizando un gate para ubicar a través de un diagrama de puntos CD45 versus SSC-A a las poblaciones de leucocitos. Mientras una estrategia realiza una selección parcial de las células mononucleares que incluye principalmente los monocitos y cierta región de linfocitos (E1) para generar un gate HLA-DR versus CD14 donde la selección de los eventos excepto las células dobles negativas para ambos parámetros se representa finalmente en un diagrama de puntos CD14 versus CD16 para ubicar de forma diferencial las tres subpoblaciones reportadas; la estrategia E2 incluye un diagrama de puntos empleando las moléculas TLR-2 versus HLA-DR y generar un gate de los eventos positivos a TLR-2 mediante un diagrama TLR-2 versus CD14 que distingue de forma diferencial las tres subpoblaciones de monocitos generando una identificación uniforme y excluyente de otras poblaciones de leucocitos. Para ambas estrategias se identificó el porcentaje respectivo a cada subpoblación.

Para constatar si la expresión de las moléculas de identificación (HLA-DR, CD14, CD16 y TLR-2) en monocitos se mantenía semejante ante ambas estrategias de análisis, se determinó la expresión relativa (IMF) de cada marcador de cada subpoblación de monocitos usando E1 y E2, los cuales tienen correlación aceptable para cada subpoblación (Tabla 4.0) sobresaliendo los valores de correlación obtenidos para TLR-2 (clásicos:1, intermedios: 0.9, no clásico: 0.9) considerados como de correlación fuerte. Estos datos nos sugieren que ambas estrategias de análisis son comparables entre sí.

Tabla 3.0. Correlación de las subpoblaciones de monocitos evaluadas por ambos algoritmos de análisis.

Subpoblación	Estrategia		P	Coef. Correlación
	E1	E2		
Clásicos	59.03 ± 3.438	86.37 ± 2.114	>0.05	0.7
Intermedios	3.654 ± 0.6435	3.644 ± 0.5655	>0.05	0.7
No Clásicos	6.758 ± 0.9358	10.31 ± 2.081	>0.05	0.9

Correlación de Spearman con intervalo de confianza al 95%, $\alpha = 0.05$; *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$

La estrategia E2 es mejor que E1 para identificar a los monocitos en ensayos de activación celular

Estimulando monocitos con LPS como inductor de la respuesta inflamatoria, observamos que la disminución en la expresión de las moléculas CD14 y CD16 es desde la primera hora de estimulación (Figura 19). Es de notar, que mientras se analizan los resultados, las poblaciones derivadas de la selección de los eventos CD14+HLA-DR+ de E1 que se muestran en gráficas CD14 vs CD16, después de la primera hora de incubación hasta las 6 horas, se observan gran cantidad de eventos de los cuales su pertenencia es incierta (eventos CD14^{low}/-CD16⁻). Si bien la población de monocitos no clásicos ya no se distingue desde las dos horas de estímulo con E1, los monocitos totales que se muestran en una gráfica de CD14 vs CD16 derivados de la previa selección por E2 muestra reducidos eventos con fenotipo CD14^{low}/-CD16⁻. Este resultado fortalece el uso de E2 para el análisis de resultados cuando las células se encuentran en estados de activación.

Tabla 4.0 Correlación entre marcadores para las estrategias de análisis

	Marcador		Expresión del Marcador		
	Subpoblación	E1	E2	P	Coef. Correlación
CD14	Clásicos	734 +/- 60.5	713.2 +/- 48.0	<0.05	1
	Intermedios	1049 +/- 76.8	1129 +/- 88.4	>0.05	0,7
	No Clásicos	278.2 +/- 22.7	406 +/- 34.1	>0.05	-0,4
CD16	Clásicos	8148 +/- 0.49	8338 +/- 0.46	>0.05	0,3
	Intermedios	80.73 +/- 7.8	83.41 +/- 3.1	>0.05	0,6
	No Clásicos	411.5 +/- 37.0	398.8 +/- 37.0	<0.001	0,9
HLA-DR	Clásicos	179.5 +/-6.4	176.2 +/- 5.4	>0.05	0,9
	Intermedios	1075 +/- 183.9	704.2 +/- 117.8	>0.05	0,9
	No Clásicos	524.4 +/- 8.5	499.3 +/- 32.7	<0.05	1
TLR-2	Clásicos	151.7 +/- 9.4	150.5 +/- 7.5	<0.05	1
	Intermedios	211.4 +/- 7.7	189.1 +/- 6.3	>0.05	0,9
	No Clásicos	148.5 +/- 12.7	151.5 +/- 6.6	>0.05	0,9

Correlación de Spearman con intervalo de confianza al 95%, $\alpha = 0.05$; *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$

El comportamiento de las subpoblaciones analizadas por una estrategia que involucra las molécula HLA-DR versus CD14 (E1) mantiene homología al comportamiento de las subpoblaciones evaluadas mediante una estrategia E2 durante las primeras 6 horas de observación en cultivo sin estímulo observando una disminución gradual, por la antigüedad del cultivo, en el porcentaje de células identificadas para las tres subpoblaciones (Figura 20-a, -b y -c). El comportamiento de las subpoblaciones evaluadas por las dos estrategias en cultivo celular con LPS como inductor de la respuesta inmune innata en los monocitos, mantiene de igual forma la homología, con la observación de que la estrategia planteada (E2) permite observar mejor el fenómeno presentado en la población de monocitos clásicos e intermedios, poblaciones que tienden a conservar el porcentaje de células e incluso después de las 2 horas de estímulo manteniendo una tendencia al incremento de estas subpoblaciones respecto a las células CD14⁺CD16⁺ cuya tendencia a disminuir se observa desde la primera hora de estimulación (Figura 20-d, -e y -f).

Evaluando la regulación de las moléculas de identificación bajo las dos condiciones del cultivo celular de CMSP se observaron variaciones importantes en la expresión de

CD14 y CD16 en las tres subpoblaciones, generando cambios en los porcentajes celulares para cada una de ellas (Figura 20) asociado a la regulación de las moléculas de identificación (Figura 21-c y -d). TLR-2 y HLA-DR por su parte, conservan patrones de expresión poco modificables ante la condición sin estímulo y LPS en cultivo celular durante las primeras 24 horas, lo cual, plantea la posibilidad de tener un algoritmo alternativo para la identificación de las subpoblaciones de monocitos (Figura 21-a y -b).

Lo anterior resulta importante dado que las disminuciones en las poblaciones de monocitos CD14⁺ y la interpretación de los monocitos no clásicos como monocitos clásicos por la disminución del marcador CD16 en superficie son de difícil seguimiento, fenómeno que disminuye con la estrategia E2.

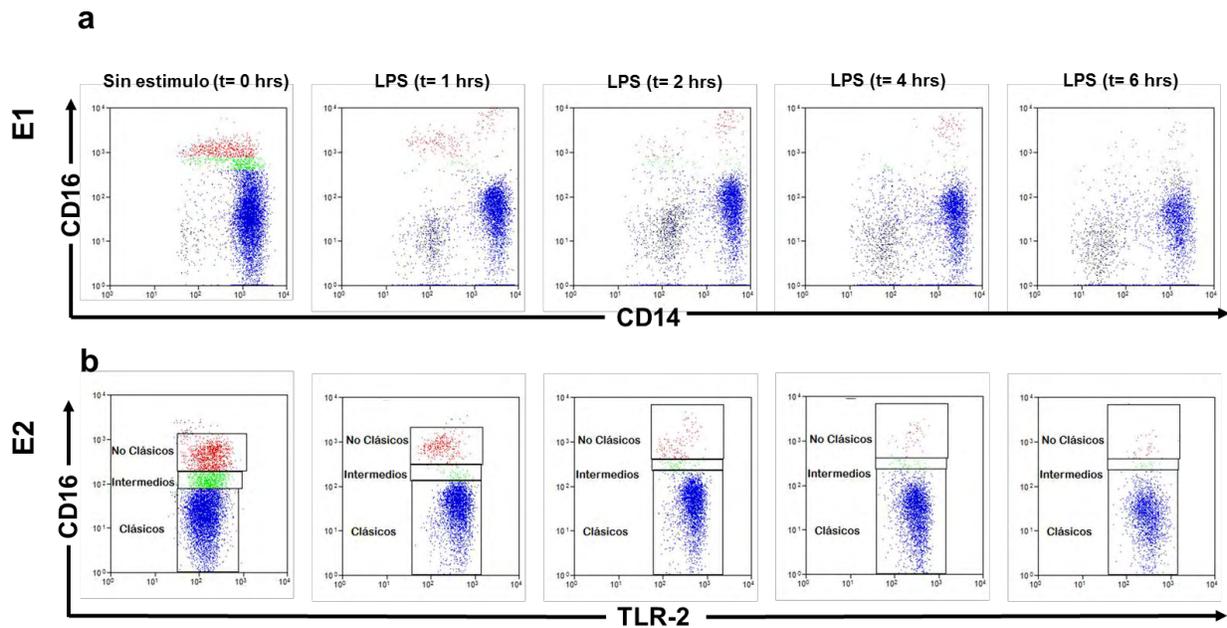


Figura 19. Análisis por E1 y E2 de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS. CMSP obtenidas de individuos sanos fueron estimuladas con LPS (10 ng/mL) durante 0, 1, 2, 4 y 6 horas. Posterior al tiempo de incubación con el estímulo las células fueron inmunomarcadas con los anticuerpos anti-CD45, anti-HLA-DR, anti-CD14, anti-TLR2 y anti-CD16 y analizadas por citometría de flujo. En a se muestra la estrategia de análisis E1 y b la E2. Las imágenes mostradas provienen de la misma muestra.

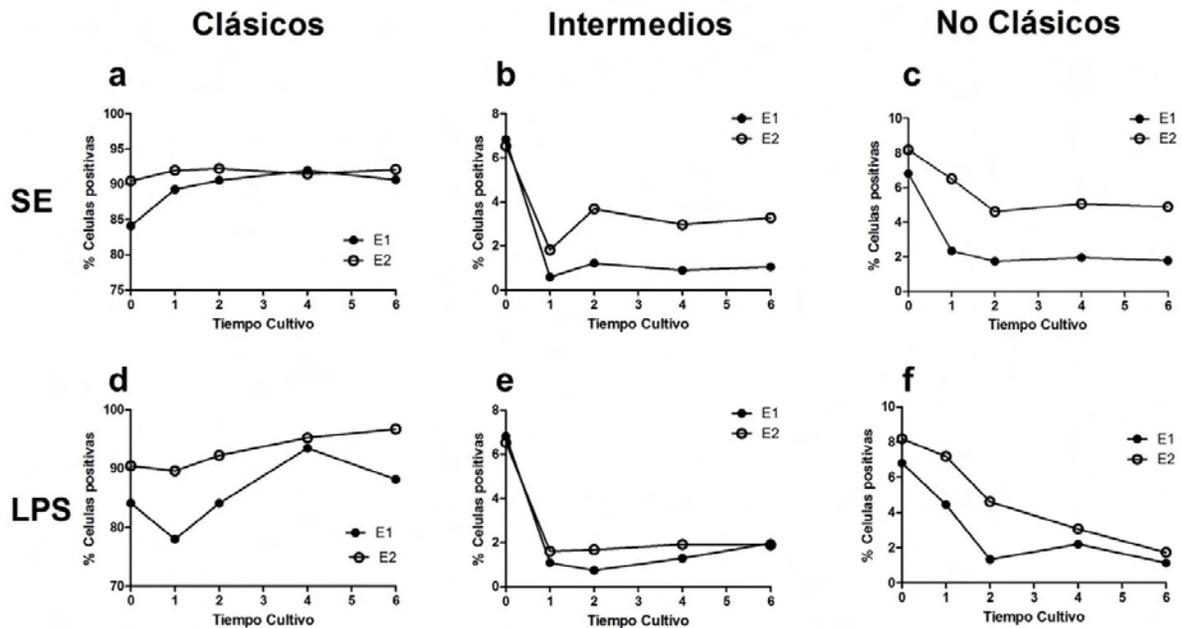


Figura 20. Comparación de las estrategias E1 y E2 para el seguimiento de la distribución porcentual de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS. Cultivos de CMSP sin estímulo (SE) y en presencia de LPS (10ng/mL) evaluadas por E1 y E2 durante 0, 1, 2, 4 y 6 horas. Las gráficas evalúan el porcentaje de las subpoblaciones de monocitos clásicos (-a y -d), intermedios (-b y -e) y no clásicos (-c y -f) de las mismas muestras cuyos inmunofenotipos fueron evaluados a la 1, 2, 4 y 6 horas de iniciado el cultivo con los anticuerpos anti-CD45, anti-HLA-DR, anti-CD14, anti-TLR2 y anti-CD16 y analizadas por citómetro de flujo. Los análisis se realizaron con el programa Summti v4.3

E2 es mejor estrategia para identificar a los monocitos en ensayos de inmunomarcajes intracelulares

Los protocolos utilizados para inmunomarcajes intracelulares que involucran métodos de fijación diferentes a los de superficie y permeabilización de las células habitualmente dificultan la identificación de los leucocitos en muestras heterogéneas debido a que los marcadores no se logran distinguir con facilidad. En los ensayos de citocinas intracelulares encontramos que la expresión de los marcadores CD14 y CD16 disminuye conforme las células son expuestas al LPS en una manera tiempo-dependiente (Figura 22-a y 22-a), lo cual dificulta la discriminación de las subpoblaciones. De manera particular con la estrategia E1 se observan gran cantidad de eventos de los cuales su pertenencia es incierta (eventos CD14^{low}/-CD16⁻) y se involucra con la región de los monocitos clásicos, sin un punto de corte visible para el análisis de cada subpoblación. El análisis por la estrategia E2 mejora de forma visible la identificación de las subpoblaciones (Figura 22-b y 23-b). Esta estrategia permite seguir el comportamiento de los marcadores hasta las 24 horas de análisis en las

subpoblaciones con similar comportamiento observado mediante un diagrama CD14 versus CD16 (Figura 22-c y 23-c).

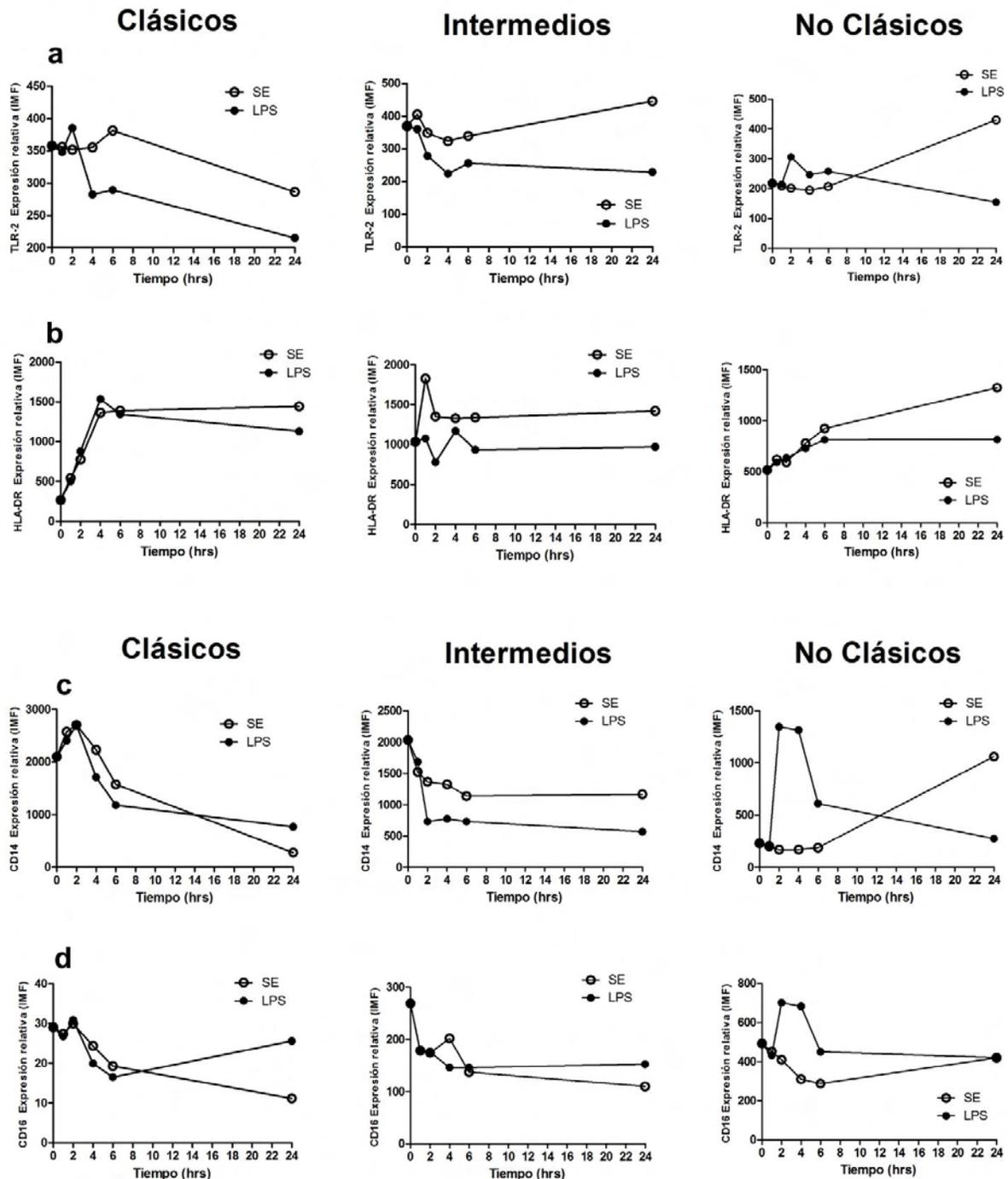


Figura 21. Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS. Cultivos de CMSP sin estímulo (SE) y en presencia de LPS (10ng/mL) durante 1, 2, 4, 6 y 24 horas. Después del tiempo de incubación, las células fueron inmunomarcadas con los anticuerpos anti-TLR2, anti-HLA-DR, anti-CD14 y anti-CD16 y analizadas por citometría de flujo. Las gráficas representan muestran la expresión relativa (medida como la IMF) de las moléculas TLR-2 (a), HLA-DR (b), CD14 (c) y CD16 (d) de las diferentes poblaciones de monocitos seleccionados por E2.

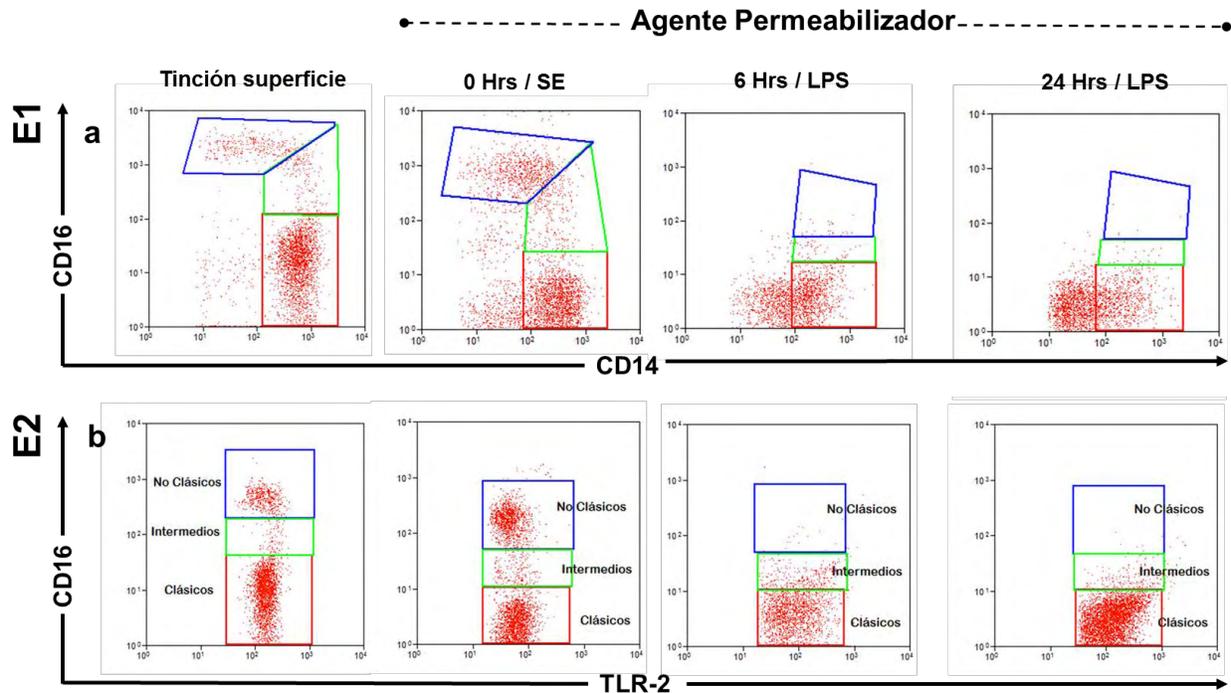


Figura 22. Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS. Diagramas de puntos por citometría de flujo obtenidas a partir del cultivo de CMSP sin estímulo a tiempo inicial del cultivo (0 Hrs) y con LPS como inductor de respuestas inmunes innatas a una concentración de 10ng/mL con evaluaciones a las 6 y 24 Hrs para realizar un inmunomarcaje con los anticuerpos que señalan las dos estrategias analizadas (E1 y E2) y un proceso de tinción que involucro el uso de soluciones para permeabilizar y fijar las células propias de un protocolo para la evaluación en la expresión de citocinas intracelulares. Para cada muestra se realizó una tinción de superficie a tiempo 0 Hrs que solo involucro el inmunomarcaje con los anticuerpos anti-HLA-DR, anti-TLR2, anti-CD14 y anti-CD16 con la lisis de eritrocitos. Datos representativos de una misma muestra de un total de 6 muestras examinadas. Se muestra con un polígono en rojo la región donde se ubican los monocitos clásicos, en verde la región de los monocitos intermedios y en azul la de los monocitos no clásicos.

Similitud en la evaluación de moléculas intracelulares entre la estrategia E1 y E2

Cultivos de CMSP estimuladas con LPS generan la expresión de diferentes citocinas como parte de la respuesta inmune innata, sin embargo, dicha expresión es controversial entre los investigadores, fenómeno principalmente atribuido a las técnicas de análisis de los monocitos y dentro de ello las diferentes estrategias de análisis para la identificación de las tres subpoblaciones.

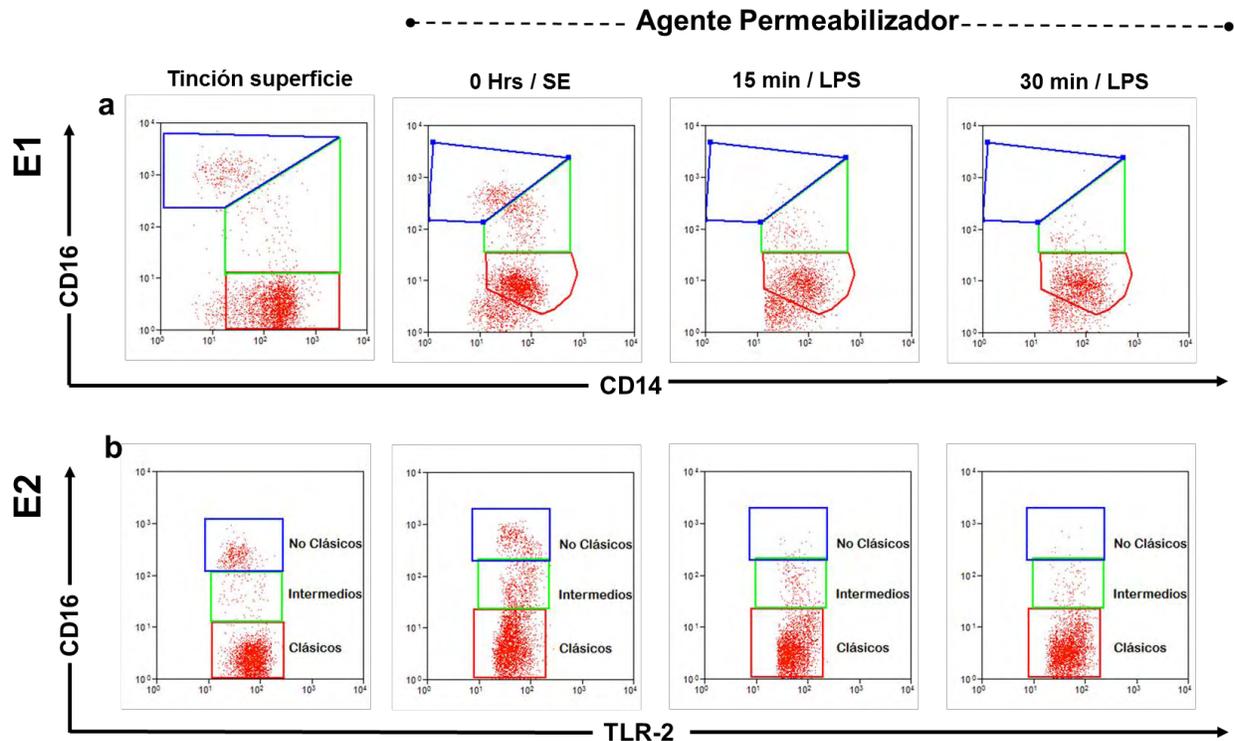


Figura 23. Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos estimulados con LPS. Diagramas de puntos por citometría de flujo obtenidas a partir del cultivo de CMSP sin estímulo a tiempo inicial del cultivo (0 Hrs) y con LPS como inductor de respuestas inmunes innatas a una concentración de 10ng/mL con evaluaciones a los 15 y 30 mins para realizar un inmunomarcaje con los anticuerpos que señalan las dos estrategias analizadas (E1 y E2) y un proceso de tinción que involucro el uso de soluciones para permeabilizar y fijar las células propios de un protocolo de detección en la expresión de fosfoproteínas. Para cada muestra se realizó una tinción de superficie a tiempo 0 Hrs que solo involucro el inmunomarcaje con los anticuerpos anti-HLA-DR, anti-TLR2, anti-CD14 y anti-CD16 con la lisis de eritrocitos. Datos representativos de una misma muestra de un total de 6 muestras examinadas. Se muestra con un polígono en rojo la región donde se ubican los monocitos clásicos, en verde la región de los monocitos intermedios y en azul la de los monocitos no clásicos.

Los ensayos intracelulares aquí presentados reflejan que los monocitos no clásicos son los principales productores de citocinas proinflamatorias como TNF- α y TGF- β 1 (Figura 24) y también en tiempos largos de estimulación con LPS (10ng/mL) son los principales productores de IL-10 (Figura 24-e y-f), resultados análogos para las dos estrategias de análisis estudiadas donde los datos de correlación no muestran una diferencia entre las dos estrategias (Tabla 5.0). No obstante, la identificación de los monocitos empleando las moléculas CD14 y HLA-DR de la estrategia E1 genera una difícil selección (Figura 22-a y 23-a), fenómeno disminuido al emplear una detección de los monocitos como células HLA-DR⁺TLR-2⁺ como lo describe el algoritmo E2.

La evaluación de una enzima clave en las vías de señalización celular para la síntesis de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α , p38, mantiene una expresión equivalente por ambas estrategias de análisis (Figura 26-a,b), con niveles incrementados frente a una respuesta con LPS para monocitos intermedios y no clásicos. Por su parte el factor NF-kB se mantuvo expresado en monocitos no clásicos e intermedios (Figura 26-c,d) y dicha expresión fue recíproca por ambas estrategias de análisis. Sin embargo lo observado en la figura 24-a en comparación con la figura 24-b genera que la identificación de los monocitos por TLR-2 y HLA-DR presente una alternativa cuyo análisis excluyente de otras células mononucleares como linfocitos NK y B presentan interferencia en la evaluación de las moléculas de señalización intracelular.

TLR-2 como marcador de identificación, dificulta el análisis en ensayos de fagocitosis

La función fagocítica “in vitro” usando *E.coli* – GFP revela que la subpoblación de monocitos clásicos mantienen funciones fagocíticas efectivas más que los no-clásicos. Sin embargo, los resultados presentados en la figura 27 muestran el patrón de eventos CD14/HLA-DR modificada. Por otro lado la estrategia E2 presenta los eventos HLA-DR+ TLR-2+ modificados, lo cual dificulta la identificación de estas células.

Dado que las dos estrategias presentan el mismo grado de dificultad con las dos moléculas que principalmente sirven en la identificación de monocitos se procedió al análisis en la identificación de los monocitos y aunque TLR-2 presenta una desventaja como marcador, su expresión relativa permite por un diagrama de puntos TLR-2 versus CD16 la identificación de las subpoblaciones, de tal forma que las dos estrategias son comparables (Tabla 7.0) encontrando buena correlación en las tres subpoblaciones.

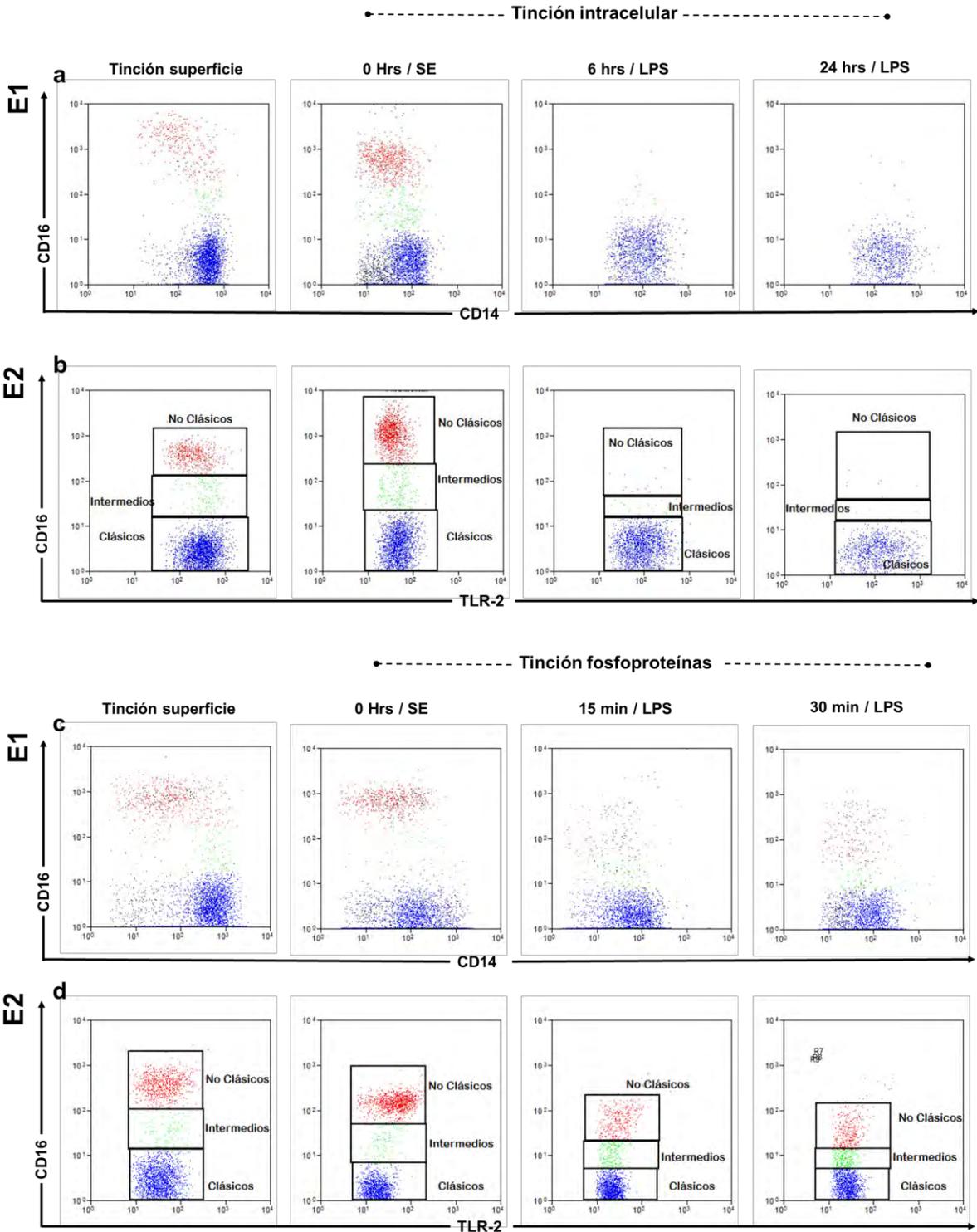


Figura 24. Comparación de la E1 y E2 para el seguimiento de las subpoblaciones de monocitos en la expresión de moléculas intracelulares. Análisis de CMSP estimuladas con LPS (10ng/mL) mediante la E1 y E2 para la evaluación en la expresión de citocinas (a y b) a las 0, 6 y 24 horas, así como de fosfoproteínas (c y d) a los 0, 15 y 30 minutos, cabe destacar que 4 horas antes de la evaluación de citocinas se adiciono un inhibidor del transporte de proteínas. Para cada muestra se realizó el inmunomarcaje con los anticuerpos anti-HLA-DR, anti-TLR2, anti-CD14 y anti-CD16 y como citocinas anti-TNF- α , anti-TGF- β y anti-IL-10 o fosfoproteínas anti-p38 y anti-p65. La tinción de superficie se empleó como referencia en la identificación de las subpoblaciones y solo incluyo el inmunomarcaje de superficie.

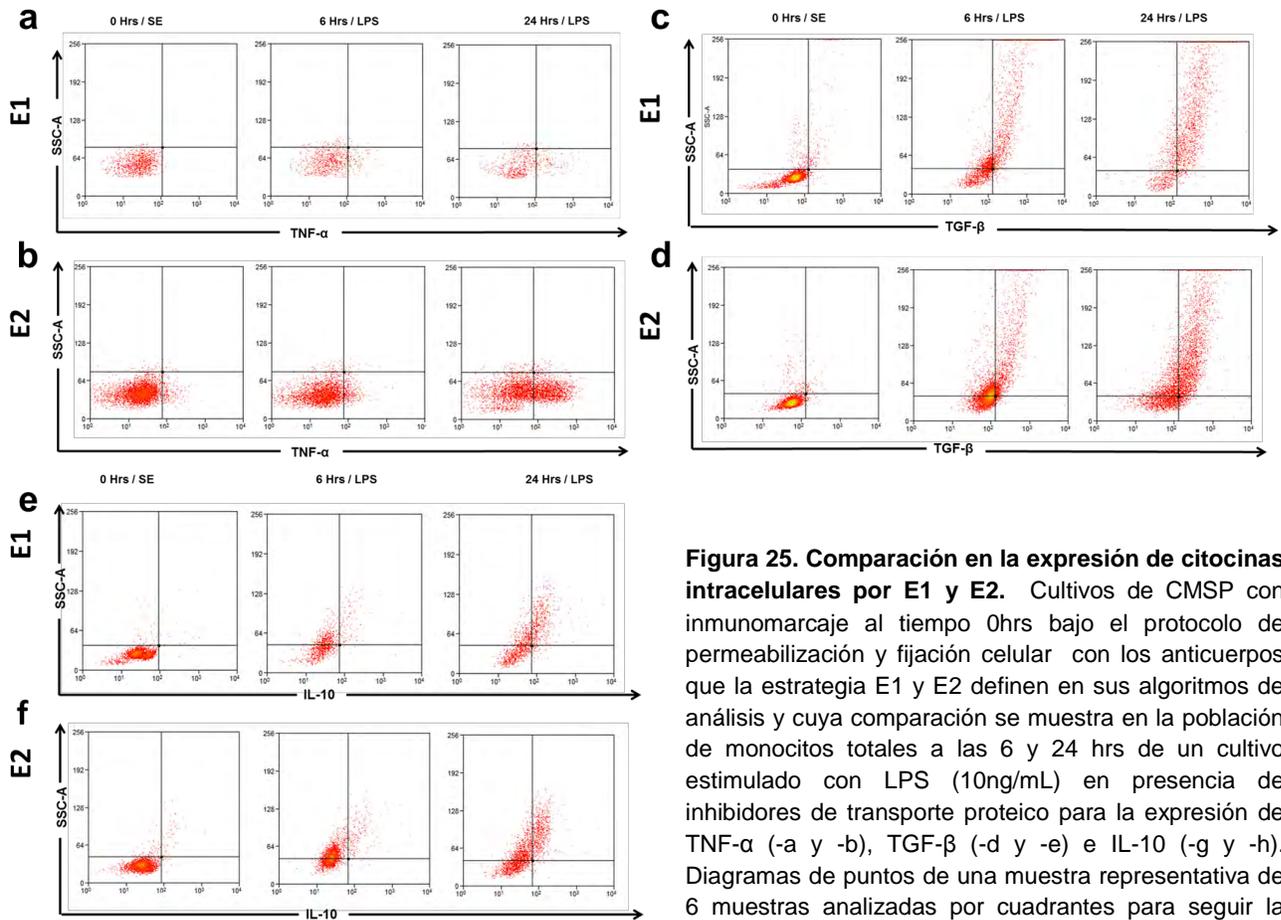


Figura 25. Comparación en la expresión de citocinas intracelulares por E1 y E2. Cultivos de CMSP con inmunomarcaje al tiempo 0hrs bajo el protocolo de permeabilización y fijación celular con los anticuerpos que la estrategia E1 y E2 definen en sus algoritmos de análisis y cuya comparación se muestra en la población de monocitos totales a las 6 y 24 hrs de un cultivo estimulado con LPS (10ng/mL) en presencia de inhibidores de transporte proteico para la expresión de TNF- α (-a y -b), TGF- β (-d y -e) e IL-10 (-g y -h). Diagramas de puntos de una muestra representativa de 6 muestras analizadas por cuadrantes para seguir la expresión de las citocinas involucradas.

Tabla 5.0 Correlación entre citocinas para las estrategias de análisis

Marcador		Expresión del Marcador					
	Subpoblación	P			Coef. Correlación		
		0	6	24	0	6	24
TNF- α	Clásicos	>0.05	<0.05	>0.05	0,6	0,88	-0,086
	Intermedios	>0.05	>0.05	>0.05	0,6	0,257	0,314
	No Clásicos	>0.05	>0.05	>0.05	0,486	0,029	0,029
TGF- β	Clásicos	>0.05	<0.05	>0.05	-0,6	0,886	0,257
	Intermedios	>0.05	>0.05	>0.05	0,429	0,829	-0,086
	No Clásicos	<0.05	<0.05	>0.05	0,943	0,943	0,143
IL-10	Clásicos	>0.05	>0.05	>0.05	-0,143	-0,714	0,371
	Intermedios	>0.05	>0.05	>0.05	0,486	0,486	0,257
	No Clásicos	>0.05	>0.05	>0.05	0,543	-0,486	0,429

Correlación de Spearman con intervalo de confianza al 95%, $\alpha = 0.05$; *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$

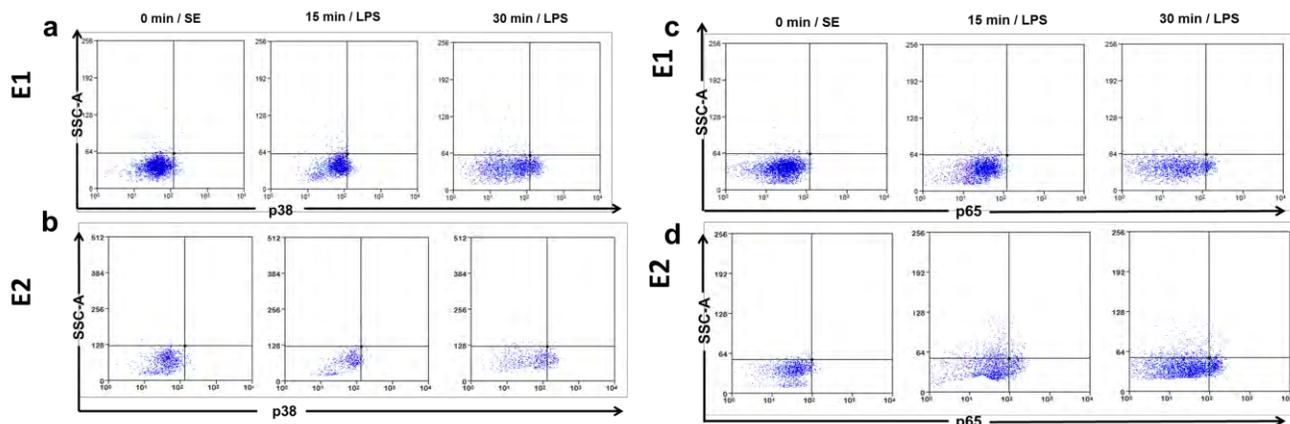


Figura 26. Comparación en la expresión de fosfoproteínas por ambas estrategias. Cultivos de CMSP con LPS (10ng/mL) como inductor de la respuesta inmune para la estimulación de monocitos con evaluaciones de la expresión relativa de p38 (-a y -b) y p65 (-c y -d) al tiempo inicial y a los 15 y 30 minutos de adicionar el estímulo. El protocolo de inmunomarcaje conllevó la permeabilización y fijación celular para la detección de fosfoproteínas con los anticuerpos que la estrategia E1 y E2 definen en sus algoritmos de análisis. Diagramas de puntos de una muestra representativa cuyo análisis por cuadrantes permite evaluar la expresión de las citocinas involucradas.

Tabla 6.0 Correlación entre fosfoproteínas para las estrategias de análisis

Marcador		Expresión del Marcador					
Subpoblación	P	P			Coef. Correlación		
		0	6	24	0	6	24
p38	Clásicos	>0.05	>0.05	<0.05	0,086	0,029	0,943
	Intermedios	>0.05	>0.05	>0.05	0,771	0,143	0,771
	No Clásicos	<0.001	>0.05	>0.05	1	0,257	0,714
p65	Clásicos	>0.05	>0.05	>0.05	0,2	-0,543	0,2
	Intermedios	>0.05	>0.05	>0.05	-0,6	0,257	0,143
	No Clásicos	>0.05	>0.05	>0.05	0,464	0,464	0,725

Correlación de Spearman con intervalo de confianza al 95%, $\alpha = 0.05$; *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$

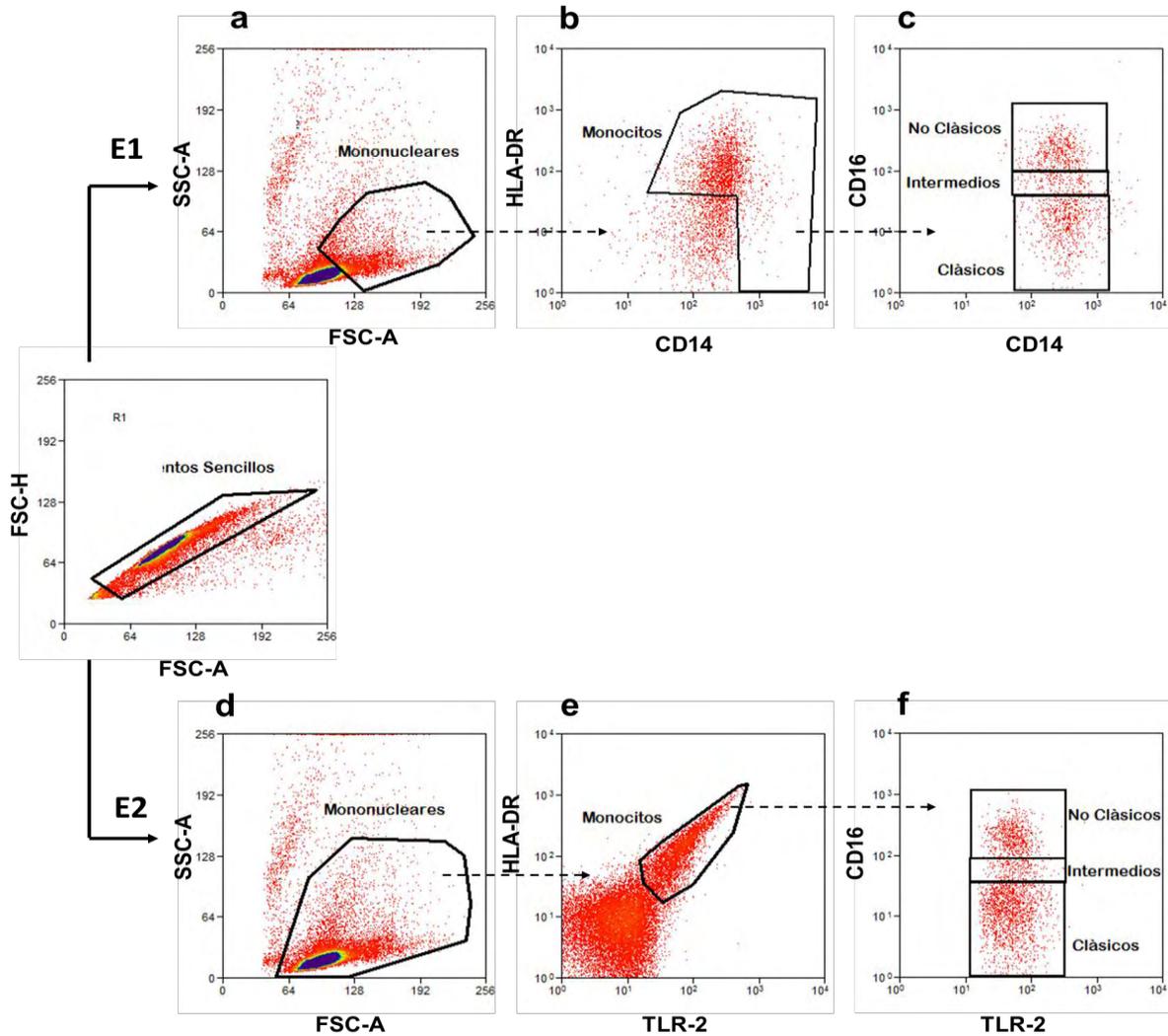


Figura 27. Comparación de algoritmos de análisis en ensayos de fagocitosis. 10^6 CMSP fueron expuestas a $10\mu\text{L}$ de una suspensión de *E. coli* GFP+ durante 15 min a 37°C . Después de la incubación, las células fueron inmunomarcadas con anticuerpos anti-HLADR, anti-CD14, anti-CD16 y anti-TLR2, analizadas por citometría de flujo. Los datos generados se analizaron con las estrategias E1 (a-c) y E2 (d-f).

Tabla 7.0 Correlación de las estrategias de análisis en procesos de fagocitosis

Ensayo de fagocitosis		
Subpoblación	P	Coef. Correlación
Clásicos	>0.05	0.5
Intermedios	>0.05	1.0
No Clásicos	>0.05	1.0

Correlación de Spearman con intervalo de confianza al 95%, $\alpha = 0.05$; *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$

E2 permite caracterizar las subpoblaciones de monocitos en mujeres con preeclampsia

En la tabla 8.0 se muestran los datos demográficos y obstétricos de 10 mujeres durante el tercer trimestre del embarazo, de las cuales, 5 fueron mujeres embarazadas normotensas (Presión sistólica 124 +/- 12.6 mmHg), cuyos datos fueron usados como referencia, y 5 cursaban con preeclampsia (presión sistólica 163.8 +/- 12.6 mmHg). En los grupos de estudio, observamos que las mujeres que cursaban con preeclampsia tenían IMC mayores al grupo control (24.4 +/- 2.5 vs 28.9 +/- 6.4 Kg/m², P=0.008), lo cual se reflejó en que el 60% del grupo de estudio curso con obesidad.

Tabla 8.0 Datos demográficos y obstétricos de las pacientes incorporadas al estudio

Datos demográficos y obstétricos	Control (n=5)	Preeclampsia (n=5)	P
Edad (años)	31.1 +/- 6.7	32.4 +/- 6.9	>0.05
SDG	34.1 +/- 13.5	33.6 +/- 4.6	>0.05
IMC (Kg/m ²)	24.4 +/- 2.5	28.9 +/- 6.4	0.008
Presión sistólica (mmHg)	124+/-12.6	163.8+/-12.6	0.014
Comorbilidades			
Obesidad	0%	60%	>0.05
DM-II y DMG	0%	0%	>0.05

Datos promedio +/- SD analizados mediante la prueba U-Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01

Tabla 9.0 Subpoblaciones de monocitos analizadas por las estrategias E1 y E2

E1

Monocitos (%)	Control	Preeclampsia	P (value)
Clásicos	80.6 +/- 3.4	78.9 +/- 4.3	ns
Intermedios	3.2 +/- 0.5	4.5 +/- 0.9	ns
No Clásicos	7.0 +/- 1.1	7.4 +/- 1.6	ns

E2

Monocitos (%)	Control	Preeclampsia	P (value)
Clásicos	83.2 +/-2.8	86.9 +/- 0.9	ns
Intermedios	2.5+/- 0.2	4.5 +/- 0.2	**
No Clásicos	6.0 +/- 0.7	12.2 +/- 0.2	**

Datos promedio +/- SD analizados mediante la prueba U-Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01

Aplicando la estrategia de análisis E1 no encontramos diferencias en la distribución de las tres subpoblaciones de monocitos descritos con el algoritmo convencional, no obstante, usando E2 se observó que el porcentaje de monocitos intermedios y no clásicos es mayor en mujeres con preeclampsia (Tabla 9.0).

La expresión de CD16, HLA-DR y TLR-2 es mayor en monocitos intermedios y no clásicos de mujeres con preeclampsia

Sumado a la distribución porcentual de las subpoblaciones de monocitos, evaluamos la expresión de las moléculas utilizadas para identificarlos. Encontramos que la expresión de CD16 de las mujeres con preeclampsia es mayor en monocitos intermedios (83.4 +/- 6.0 vs 163.4 +/- 21.5, P=0.0159) y no clásicos (398.8 +/- 15.1 vs 524.7 +/- 77.26, P=0.0395) (Figura 28-a). Por su parte, la expresión de CD14 fue igual en ambos grupos, mientras que la expresión de HLA-DR en monocitos no clásicos es mayor en mujeres con preeclampsia (499.3 +/- 149.3 vs 1175 +/- 142.2, P=0.0159) (Figura 28-c). TLR-2 también es mayor en monocitos intermedios (189.1 +/- 9.99 vs 256.5 +/- 21.04, P=0.0317) y no clásicos (151.5 +/- 8.02 vs 202.3 +/- 11.7, P=0.0317) del grupo de preeclampsia (Figura 28-d).

Los monocitos de mujeres con preeclampsia tienen mayor expresión de TREM-1 y CD11b

La expresión de TREM-1 de las mujeres con preeclampsia es mayor en las tres subpoblaciones de monocitos: clásicos (133.5 +/- 8.4 vs 221.5 +/- 24.3, P=0.079), intermedios (169.8 +/- 11.1 vs 283.6 +/- 47.0, P=0.0317) y no clásicos (77.1 +/- 6.3 vs 132.1 +/- 22.0, P=0.0317) (Figura 29-a). Por su parte, la expresión de CD11b en los monocitos clásicos es mayor en mujeres con preeclampsia (22.3 +/- 1.4 vs 61.7 +/- 11.50, P=0.0079) al igual que los monocitos intermedios (90.5 +/- 10.6 vs 142.4 +/- 22.6) y no clásicos (34.6 +/- 20.08 vs 78.04 +/- 16.0) (Figura 29-b).

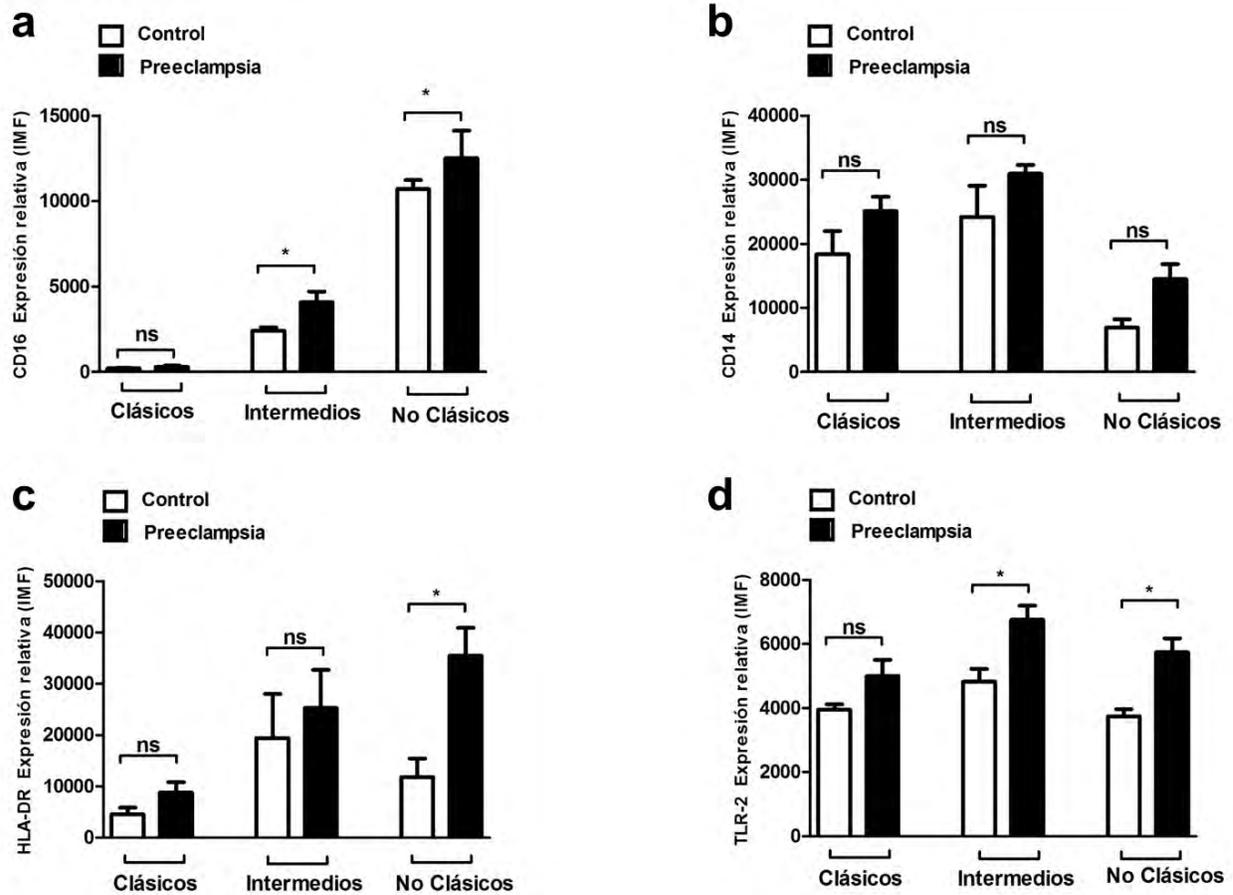


Figura 28.0 Expresión de CD14, CD16 DR, y TLR-2 en las subpoblaciones de monocitos en mujeres con y sin preeclampsia. Evaluación de la expresión de CD16 (a), CD14 (b), HLA-DR (c) y TLR-2 (d) como marcadores de identificación de monocitos en mujeres embarazadas sana (control- blanco) y en mujeres con PE (preeclampsia-negro), ambas durante el tercer trimestre del embarazo. Las muestra obtenidas por venopunción fueron inmunomarcadas con los anticuerpos anti-CD45, anti-CD16, anti-CD14, anti-HLA-DR y anti-TLR2 con la posterior lisis de eritrocitos y analizadas por citometría de flujo bajo la estrategia E2 para la identificación de subpoblaciones de monocitos, aplicando una prueba estadística de U-Mann-Whitney con valores significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ entre ambas muestras.

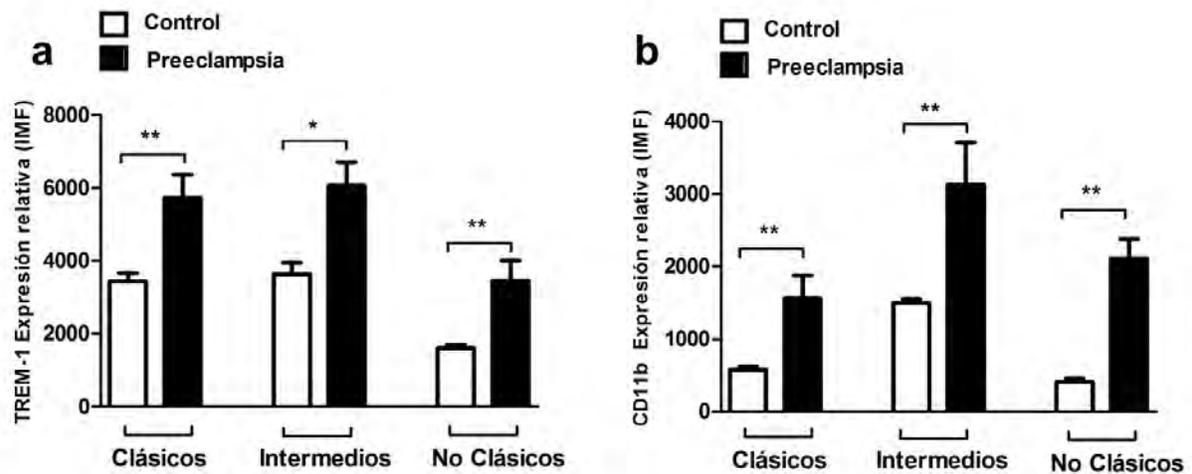


Figura 29.0 Expresión de moléculas asociadas a activación de monocitos en mujeres con preeclampsia. Evaluación de la expresión de TREM- (a) y CD11-b (b) en monocitos de mujeres embarazadas sanas (control-blanco) y en mujeres con PE (Preeclampsia-negro). Células de muestras de sangre periférica fueron inmunomarcadas con los anticuerpos anti-CD45, anti-CD16, anti-CD14, anti-HLA-DR y anti-TLR2 y analizadas por citometría de flujo con la estrategia E2. Prueba estadística de U-Mann-Whitney con valores significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Discusión

Los monocitos humanos de sangre periférica son una población celular heterogénea con diferencias fenotípicas y funcionales con implicaciones en los diferentes papeles inmunorreguladores en estados fisiológicos y patológicos. Técnicas asociadas a evaluar parámetros como tamaño y complejidad permitieron reportar inicialmente dos subpoblaciones definidas por su actividad celular inflamatoria o fagocítica²². La tecnología que la citometría de flujo trajo consigo logró identificar las subpoblaciones de monocitos con base en la expresión diferencial en superficie celular de CD14 y CD16¹³² que requiere de una cuidadosa selección de combinaciones únicas de marcadores individuales que se basan en el grado de especificidad para la identificación de un linaje celular de interés, alguna etapa de maduración o bien un fenotipo aberrante, con una estrategia de análisis que permita identificar una población celular en particular en una muestra heterogénea como lo representa la sangre. Es indispensable que se seleccionen clones de anticuerpos conjugados a fluorocromos apropiados para analizarlos simultáneamente. En consecuencia, esta combinación de elementos es esencial para el diseño de un panel que permita establecer el mejor algoritmo para determinar la población de interés en una muestra problema.

Ejemplos de algoritmos de análisis para el inmunofenotipo de monocitos por citometría de flujo basan la identificación en la expresión de moléculas como LRP-1 cuya principal desventaja es ser un receptor endocítico y que en ensayos funcionales no podría ser utilizado para la identificación de las subpoblaciones de monocitos^{83, 87}, aunado a ello la participación en diversos procesos como señalización intracelular, proliferación, migración y diferenciación de diversos tipos celulares, incluyendo macrófagos, células musculares (VSMC) y neuronas no permite denominar como marcador exclusivo de monocitos en ambientes heterogéneos^{133, 134, 135}. Por otro lado se han observado la participación de moléculas como LRP-1 en movilidad y adhesión de células cancerígenas¹³⁶.

Existen algoritmos de análisis que se basan en el seguimiento de exclusión celular, analizando eventos negativos que no se ajusten a la expresión de parámetros establecidos para cada población celular, aunque se pueden seleccionar eventos que

no corresponden a los monocitos. Este tipo de análisis tiene la principal desventaja de hacer uso de mayor cantidad de anticuerpos para identificar cada población celular en sangre periférica lo cual está bien para protocolos que solo hagan la identificación por expresión en superficie celular pero no para protocolos que deseen evaluar expresión de moléculas intracelulares ya que dependen de los detectores habilitados en el citómetro de flujo para extender el número de parámetros a evaluar.

Con las observaciones anteriores se propuso incluir a TLR-2 en un algoritmo de análisis a partir de un banco de anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos que permita el diseño de un panel multiparamétrico de marcadores para la identificación y caracterización de monocitos de sangre periférica con las moléculas de superficie CD45, CD16, HLA-DR, TLR-2 y CD14 (Tabla 2.0) en tinciones de superficie y ensayos funcionales.

La expresión relativa de TLR-2 en monocitos es mayor que en otras poblaciones celulares, identificándolas a través del diagrama de puntos SSC-a versus TLR-2 (Figura 17.0), lo cual concuerda con la función celular que presenta este receptor en la respuesta inmune innata como iniciador de la misma a pesar que TLR-2 junto con TLR-4 y TLR-5 están distribuidos en muchas poblaciones celulares pero de manera característica en células mielomonocíticas¹⁶. El resultado anterior respalda la hipótesis de emplear a TLR-2 como marcador en sangre periférica donde la separación de subpoblaciones linfoides es esencial para la identificación de subpoblaciones de monocitos ya que en comparación con TLR-4 o CD86¹⁰¹ que en reportes previos evalúan una expresión diferencial, la expresión relativa de TLR-2 en las tres subpoblaciones es homogénea.

Considerando el resultado previo se diseñó una estrategia de análisis (E2) que presenta ventajas importante sobre el algoritmo convencional (E1): mientras E1 se limita a estudiar la región que por complejidad caracteriza a los monocitos, 1) E2 abarca toda la región de mononucleares, ya sea de un diagrama de puntos tamaño vs complejidad o bien CD45 vs complejidad considerando que la heterogeneidad de esta población celular las hace similares a los linfocitos, específicamente para los intermedios y no clásicos. La expresión diferencial de TLR-2 en monocitos sobre otras células mononucleares permite 2) tener una región que identifica fácilmente a los monocitos

como TLR-2+HLADR+. Ante la pérdida o escisión de membrana de CD14 ocasionada por la exposición de monocitos a LPS⁹⁶ en cultivos “in vitro”, 3) las subpoblaciones de monocitos clásicos y no clásicos se definen mejor en un diagrama de puntos TLR-2 vs CD16. A las características descritas se suma de forma implícita la posibilidad de realizar ensayos funcionales sin cambiar de molécula de identificación por la necesidad de evaluar moléculas intracelulares en un panel multiparamétrico.

Las ventajas mencionadas permiten excluir y limitar alteraciones que presentan las células de sangre que lleguen a confundirse con monocitos por presentar un tamaño y heterogeneidad similar, fenómeno que las estrategias por exclusión celular no contemplan, como es el caso de los eosinófilos, que puedan ser recogidos en la puerta de los monocitos no clásicos CD16+, bajo condiciones de inflamación, ya que IFN- γ puede inducir la expresión de CD16 en eosinófilos¹³⁷ o bien en los estadios de alergias hay una exacerbada expresión de CD16 en estas células¹³⁸. Otra dificultad que evita E2 es el uso de moléculas intracelulares para la identificación de monocitos como LRP-1, molécula que se vería modificada en tinciones intracelulares o ensayos “in vitro” por su alta expresión durante el desarrollo de enfermedades cardiovasculares³⁷ ya que juega un papel primordial en diferentes eventos celulares como adhesión y motilidad de células cancerosas¹³⁵.

La comparación que la estrategia E2 permitió establecer con base en la exclusión de otras células de los monocitos al identificarlas como células HLA-DR+TLR-2+, fue reflejada no solo en el algoritmo de análisis si no en el fenotipo de células que acorde con la nomenclatura establecida^{68, 139}, Clásicos (CD14+CD16⁻), Intermedios (CD14+CD16⁺) y No Clásicos (CD14⁻CD16⁺) se identificaron alternativamente con el fenotipo: Clásicos “HLA-DR+TLR-2+CD16⁻”, Intermedios HLA-DR+TLR-2+CD16⁺” y No Clásicos “HLA-DR+TLR-2+CD16⁺⁺”. Dicho fenotipo correlaciona con reportes previos, donde los monocitos clásicos constituyen de un 80 a 90% de los monocitos en circulación y el 10% restante distribuido para los monocitos CD16⁺ (Tabla 3.0).

Adicionalmente, la correlación que existe entre las dos estrategias para la población de monocitos no clásicos evaluada por el factor de correlación de Spearman (r_s), pone en evidencia la veracidad de E2, la cual analiza los mismos eventos celulares pero con la

restricción en la selección de la población de monocitos en controles clínicamente sanos, lo cual indicaría que una mayor o menor expresión en esta población celular se debe a la patología en cuestión y no por la confusión con otras células como reportes previos han observado⁸³ (Figura 19). Por otro lado la correlación de los marcadores celulares por las dos estrategias (Figura 20, Tabla 4) respalda el hecho de observar que la similitud para CD14 (monocitos Clásicos, $r_s=1$), CD16 (monocitos no clásicos, $r_s=0.9$) concuerde con la población que diferencialmente expresan estos marcadores. De hecho los resultados obtenidos para HLA-DR muestran de forma contundente que no debe ser utilizado como el único marcador de identificación dado que la expresión no es lo suficientemente homogénea en todas las subpoblaciones, lo cual puede ser atribuido a la función que desempeña cada subtipo celular, dado que HLA-DR participa en la presentación antigénica a células T⁹⁸.

La regulación en la expresión de las moléculas de identificación depende del estímulo que active el inmunofenotipo de las celular al ser expuestas a un producto bacteriano como el LPS. En contraste, TLR2 junto con HLA-DR mostraron un regulación homogénea en cultivos celulares bajo LPS como inductor de la respuesta inflamatoria (Figura 22).

Un hecho indiscutible es el creciente número de discrepancias respecto a la regulación de marcadores en superficie celular en evaluaciones “in vitro” o “in vivo” sobre los monocitos, ya que la principal razón para las diferencias encontradas en los reportes está fundamentada en el uso de las técnicas de purificación para cultivos in vitro, la cual genera un ambiente de estrés celular induciendo su activación y la regulación de moléculas en superficie, por lo cual se prefieren evaluaciones con sangre total para mejorar y homogeneizar los resultados^{112, 140}. Respecto a este polémico tema, varios estudios han demostrado los beneficios de una técnica frente a la otra¹⁴¹. En este estudio, para evaluar el algoritmo de análisis propuesto y observar las diferencias entre las dos estrategias planteadas, se trabajó con la separación por técnica de gradiente celular de CMSP en cultivos “in vitro”, considerando que dicho procedimiento puede conducir a artefactos experimentales que confundan el análisis en la función de los monocitos¹⁰¹, para lo cual se contemplaron los cuidados pertinentes durante el procedimiento, considerando que una de las razones por las que existe confusión no

solo debe a la técnica utilizada si no de igual o mayor forma al algoritmo de análisis que se plantee en la identificación de los monocitos.

La estimulación con LPS bacteriano en los cultivos genera vías de señalización iniciadas con el reconocimiento del PAMP por el complejo CD14/TLR-4/MD-2, el cual propicia un ambiente inflamatorio¹⁴². Esta condición genera una regulación de las moléculas de identificación a lo largo del tiempo y a la exposición al estímulo, modificando las subpoblaciones de monocitos (figura 21) con un impacto principalmente en la identificación por el patrón de marcadores establecidos. La afectación principal sobre los monocitos clásicos e intermedios genera que después del reconocimiento del LPS, el complejo mencionado produzca señales intracelulares a través de TIRAP y MyD88 generando la internalización rápida del complejo TLR4/LPS para producir la cascada siguiente de señales a través de TRAM y TRIF¹⁴². CD14 en esta cascada de señalización es clave para la endocitosis de TLR-4 inducida por LPS y generar una segunda señalización. Por su parte, no se ha reportado un mecanismo por el cual CD16 se escinda de membrana pero de acuerdo a las observaciones la interacción con LPS genera la pérdida del marcador de forma dependiente al tiempo de interacción, lo cual también se refleja en la disminución de la subpoblación de monocitos no clásicos (Figura 22). Con estas observaciones, la expresión constante de TLR-2 proviene de los reportes que detallan una regulación negativa en su regulación por la degradación proteolítica llevada a partir de la unión de TRIAD3A, miembro de la familia de ligasas TRIAD3 cuyo dominio se une a TLR-9 y TLR-4 promoviendo la ubiquitinación y eliminación de TLR-9 y TLR-4 pero no de TLR-2¹⁴³. La sobreexpresión de TRIAD3A se favorece por la activación de NF-kB en repuestas a LPS y CpG DNA en cuyo caso TLR-2 no se ve afectada ensayos “*in vitro*” (figura 23).

La citometría de flujo a través del uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos específicos permite el análisis cuantitativo multiparamétrico de células individuales. El uso extra de anticuerpos conjugados con fluorocromos para las formas fosforiladas de moléculas cuya participación es importante en las casadas de señalización y citocinas intracelulares permite el análisis de redes de señalización en poblaciones celulares complejas como son las CMSP^{144, 145}. El monitoreo de estas vías de señalización intracelular tiene actualmente un impacto dentro del tratamiento de un padecimiento,

con grupos de investigación que muestran su importancia en el monitoreo¹⁴⁶, pronóstico¹⁴⁷, así como en la predicción y seguimiento de un tratamiento terapéutico¹⁴⁸. Dada la importancia actual de estos protocolos, es indispensable conocer el comportamiento de un algoritmo de análisis en esas condiciones, para lo cual se montó un panel de anticuerpos que incluyen los marcadores HLA-DR, TLR-2, CD14, CD16 y los anticuerpos anti-TNF- α , anti-TGF- β e anti-IL-10, las fosfoproteínas anti-p38 y anti-NF κ -B, ya que se considera que son moléculas cuya activación involucra numerosas respuestas inmunes.

Existe un efecto marcado en la regulación de las moléculas de superficie como anteriormente se discutió, pero de igual forma existe un efecto en la regulación de los marcadores de identificación modificada por el uso de soluciones permeabilizadoras (figura 24 y 25), estos resultados no habían sido explorados ni reportados, sin embargo la disminución en la expresión de los marcadores de identificación pudiese deberse a una modificación a los epitopes que reconocen los anticuerpos monoclonales al realizar primero la permeabilización y posteriormente la tinción de las células, sin embargo al trabajar con la tinción celular en primera instancia y los procedimientos de permeabilización posteriormente, la modificación estaría en el paratopo (región variable) lo que impediría una adecuada reacción antígeno-anticuerpo. También este efecto podría estar relacionado al desacoplamiento del fluorocromo del anticuerpo, sin embargo se necesitarían más estudios para relacionar el efecto observado ya que algunos reportes han evaluado la dificultad de identificar a las poblaciones celulares bajo efecto del metanol como un agente permeabilizador de la membrana celular y el p-formaldehído como agente fijador^{149, 150}. Dichos estudios han sugerido un arreglo en el procedimiento que se debe emplear para disminuir el efecto en la resolución de las células capturadas, por ejemplo, podría existir un desacoplamiento de los anticuerpos monoclonales y su fluorocromo de detección por la agresión frente al metanol lo cual obligaría a permeabilizar/fijar primero a las células y posteriormente realizar el inmunomarcaje de superficie e intracelular. Sin embargo esta técnica está limitada a los anticuerpos que no están acoplados en tándem a fluorocromos, ya que se ha observado que el metanol destruye el arreglo de fluorocromos¹⁵¹, probablemente por

reaccionar de manera covalente con regiones de paratopos que eventualmente interaccionan más fuerte y en forma estable que con el epitope.

Bajo estas observaciones realizadas, las estrategias planteadas (E1/E2) no mostraron una variación en la respuesta intracelular estudiada en términos de poner a prueba dicho panel de anticuerpos dirigidos a la identificación de los monocitos. En la figura 26 se muestran los análisis estadísticos (Prueba U-Mann-Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) que no muestra diferencia significativa alguna entre cada subpoblación estudiada para cada estrategia planteada, aunque se observa la cantidad de eventos analizados que demuestran lo heterogéneo de una selección por la estrategia E1 (fenómeno establecido por las células que se analizan como monocitos pero ciertamente son desconocidas generalizándose como eventos HLADR⁺CD14^{low}) versus la selección restringida que ofrece E2.

El perfil de citocinas observado en las subpoblaciones de los monocitos humanos define la función general que desarrollan. La inflamación es un fenómeno complejo que implica varios receptores, mediadores y vías de señalización¹⁵². La expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, etc, ha sido asociada al grupo “inflamatorio”, caracterizada por procesos de fagocitosis, expresión de peroxidasa y altos niveles de IL-10 y bajos TNF- α en respuesta a LPS⁴³ en monocitos clásicos. Con los experimentos mostrados en cinéticas de 24 horas se demuestra que los monocitos clásicos están especializados en fagocitosis (figura 30) pero producen poca IL-10 a tiempos largos (figura 27). Los monocitos intermedios en este análisis demostraron ser productores intermedios de TNF- α , TGF- β e IL-10 y los monocitos no clásicos fueron los productores primarios de las tres citosinas aunque pobres en capacidad fagocítica. Estos resultados no convergen con las características que inicialmente se les brinda a los monocitos clásicos como “inflamatorios” y a los monocitos CD16⁺ como “patrulleros”⁴⁴, sin embargo hay que considerar que la mayoría de los resultados reportados basan sus análisis con base en técnicas diferentes de análisis “in vitro” o “in vivo”. Una observación interesante fue el aumento en la producción de IL-10 detectado por ambas estrategias para los monocitos intermedios, resultado que difiere de anteriores donde caracterizaban a los monocitos clásicos como los principales productores de IL-10^{44, 114}.

Evidentemente E2 permite una identificación de las subpoblaciones de monocitos evitando la interferencia de otras células mononucleares. El modelo fue aplicado a una enfermedad inflamatoria (preeclampsia). Se ha reportado cambios en la respuesta inmune innata durante el embarazo, entre los cuales incluye el incremento del número de monocitos y granulocitos en circulación periférica¹⁵³. Respecto a los datos obtenidos, con una estrategia E1 no hay una diferencia significativa en el incremento de las subpoblaciones celulares de monocitos, caso contrario sucede al analizar las mismas muestras con una estrategia E2, donde el incremento es diferencial para los monocitos CD14⁺CD16⁺ (Tabla 6). Sin embargo, el análisis de la expresión de los marcadores de identificación y caracterización en mujeres embarazadas sanas versus aquellas que fueron diagnosticadas con preeclampsia severa muestra que existe no solo un incremento en los subtipos, si no de igual forma se lleva a cabo una regulación de los marcadores (figura 33), lo que concuerda con los reportes que hablan sobre un cambio funcional y un fenotipo activado en esta enfermedad inflamatoria. Dichos resultados muestran un incremento en las moléculas CD11b, CD14, TREM-1 y HLA-DR, lo cual concuerda con el fenotipo activado que presentan las células durante una condición inflamatoria y propiamente en la preeclampsia donde los monocitos activados demuestran un fenotipo activado por el incremento en la expresión de marcadores de activación como CD11b, ICAM-1, CD14 y TLR-4¹⁵⁴. Con esta información es curioso observar que mientras se había reportado la disminución de la subpoblación clásica siguiendo un algoritmo de análisis E1, con el algoritmo propuesto no se detecta ningún cambio en la subpoblación, lo cual también está limitado por el número de muestras analizadas en estos ensayos y la variabilidad que existe en torno al periodo de gestación en que se tomaron las muestras de sangre y con ello el grado de severidad de la preeclampsia, pues dependiendo del microambiente celular en un tipo de preeclampsia la regulación y activación celular varía. De igual forma sería interesante contrastar el algoritmo de análisis que siguen para la identificación celular y los marcadores celulares que están asociados pues de ello depende de que células parten para el análisis hablando en términos de asegurar la homogeneidad de los eventos capturados como CD45⁺ y de la evaluación con base a FSC-A vs FSC-H para evitar incluir fenotipos aberrantes por la agregación de celular. Con los resultados

presentados aquí señalan que los monocitos intermedios están asociados a la PE, lo cual concuerda con otros resultados consistentes¹¹⁸ que reportan el incremento en esta subpoblación, por ejemplo un incremento de monocitos CD14⁺CD16⁺ también está ligado a otras enfermedades inflamatorias como sepsis, asma, artritis reumatoide, aterosclerosis y las infecciones por HIV-1⁴².

El marcador CD16 corresponde a un receptor conocido como FcγRIIIb, el incremento en la expresión sobre la membrana de los monocitos es un fenómeno ligado a la disminución de estrógenos en mujeres embarazadas¹⁵⁵, dicho proceso está regulado como parte de los procesos que llevan a cabo la homeostasis entre el tejido semialogenico y la respuesta celular de la madre. Se ha informado que durante el embarazo la concentración de estrógenos en mujeres aumenta considerablemente y disminuye de forma gradual en el pos-parto¹⁵⁶. Una de las consecuencias de la preeclampsia es la baja concentración de estrógenos en circulación influyendo de manera significativa al aumento en la expresión de CD16 en la superficie de monocitos y con ello la activación celular de las subpoblaciones intermedios y no clásicos. CD11b es expresado en diferentes leucocitos (células natural killers, granulocitos, macrófagos y monocitos) es un mediador de la inflamación ya que participa en la adhesión celular y reclutamiento leucocitario y de manera directa en la activación celular, quimiotaxis, citotoxicidad y fagocitosis de células del sistema inmune innato. Se han reportado datos que indican que la regulación de la inmunidad adaptativa por células T y el mantenimiento de la tolerancia de células T son llevados a cabo mediante la expresión en superficie de CD11b¹⁵⁷. Por otro lado los resultados observados para la regulación de CD11b como intermediario en las interacciones celulares durante la migración hacia sitios inflamatorios a través de señales que involucran un equilibrio dinámico en tres estados de afinidad diferentes hacen pensar que las vías de señalización que incluyen la regulación cruzada de las regiones ITAM de la integrina o por TLR a través de las moléculas Src-DAPI12 y la cadena gamma del receptor FC ocasionan que CD11b regule negativamente la expresión y respuestas por TLR, específicamente TLR-4¹⁵⁸ como se ha reportado pero no las respuestas por TLR-2, como se observa en el incremento de ambas moléculas durante el desarrollo de la preeclampsia como padecimiento inflamatorio y de forma homóloga los resultados son similares a los

observados en sepsis bacteriana donde se ha reportado el incremento en la expresión de CD11b y TLR-2 sobre neutrófilos y monocitos como parte de la respuesta inflamatoria¹⁵⁹. CD11b tiene la capacidad de reconocer DAMPS los cuales sumados al daño endotelial que promueve la liberación de peróxido de hidrogeno y un incremento en el ion superóxido¹⁶⁰ promueven que exista mayor adhesión celular a tejido dañado lo cual podría explicar que durante las alteraciones de la preeclampsia al tono vascular exista mayor expresión de CD11b sobre la superficie de los monocitos patrulleros como respuesta al desequilibrio homeostático del tejido vascular.

Otra molécula que incrementa su expresión durante la preeclampsia es TREM-1, el cual potencializa las respuestas inflamatorias desencadenadas por células mieloides. De manera específica induce la expresión de IL-8 y TNF- α ¹⁶¹. Ensayos de micro arreglos han reportado un incremento de TREM-1 en placentas preeclámpticas lo cual estaría relacionado con la expresión en monocitos para su diferenciación en células dendríticas como previamente se había reportado¹⁶², indicando un papel en la diferenciación y proliferación, sin embargo los efectos del daño vascular que induzcan la secreción de IL-8 y TNF- α promueven la fusión trofoblástica con lo cual la mayor expresión de TREM-1 sería para controlar el daño en el sinsitiotrofoblasto.

Finalmente los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la expresión de TLR-2 sobre la superficie de los monocitos es estable y menos modificable en comparación con otros receptores TLR, con lo cual se puede emplear TLR-2 como marcador de identificación de subpoblaciones de monocitos. Por otro lado la regulación de moléculas de activación celular en monocitos promueve funciones para el mantenimiento de la homeostasis sin embargo queda a futuros estudios involucrar las vías de señalización que avalen las hipótesis planteadas a los resultados observados durante la patogenia de la preeclampsia.

Conclusiones

La estrategia E2 que incluye dentro del algoritmo de análisis la molécula TLR-2 puede ser utilizada para la identificación y caracterización de subpoblaciones de monocitos humanos incluso mejor que la estrategia convencional por citometría de flujo con lo cual la estrategia puede ser utilizada en ensayos de tinciones de superficie, ensayos funcionales y trasladarse a la caracterización celular en enfermedades inflamatorias.

Perspectivas

En este trabajo se realizó la descripción de un inmunofenotipo para las subpoblaciones de monocitos que nos permite identificar esta población celular fácilmente en un microambiente heterogéneo como lo representa la sangre periférica a través de una estrategia de análisis para análisis por citometría de flujo. Sin embargo restaría evaluar los fenómenos observados durante el trabajo experimental que pueden llevar a contribuir de manera favorable la aceptación de TLR-2 como marcador de identificación y caracterización en monocitos humanos, por ello las perspectivas de este trabajo se resumen en los siguientes puntos:

- Evaluar la expresión de TLR-2 en monocitos durante otros padecimientos inflamatorios donde la participación de las subpoblaciones de monocitos ha quedado en duda por la falta de una estrategia de análisis que permita evaluar cambios en los porcentajes de estas células.
- Identificación de los perfiles de expresión de TLR-2 durante procesos hematopoyéticos para la diferenciación e identificación de monocitos.
- Evaluar los mecanismos de señalización intracelular que generan la escisión de CD16 sobre la superficie de monocitos intermedios y no clásicos por la activación celular.

- Estandarizar las condiciones ideales para efectuar tinciones intracelulares cuyos procedimientos no afecten la estabilidad de los anticuerpos acoplados a fluorocromos y ocasionen la pérdida en la expresión de las moléculas ya que estas técnicas de evaluación celular representan un sistema alternativo para el análisis bioquímico de redes de señalización en poblaciones complejas de células del sistema inmune.
- Completar la caracterización de los monocitos en sangre periférica de mujeres con preeclampsia así como la participación que tiene la movilización de reservorios a circulación y las moléculas solubles que están implicadas en la quimiotaxis de esta población celular.

Referencias

1. Dutta P, Nahrendorf M. Regulation and consequences of monocytosis. *Immunol Rev* 2014, **262**(1): 167-178.
2. Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nature immunology* 2006, **7**(4): 333-337.
3. Eliasson P, Jonsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 2010, **222**(1): 17-22.
4. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* 2009, **27**: 669-692.
5. Howard MR, Hamilton PJ, Britton R. *Haematology : an illustrated colour text*, Fourth edition. edn.
6. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010, **327**(5966): 656-661.
7. Suda T. [Hematopoietic stem cells and stem cell biology]. *Rinsho Ketsueki* 2001, **42**(3): 152-156.
8. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 2010, **17**(1): 53-59.
9. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 1968, **128**(3): 415-435.
10. Liu K, Waskow C, Liu X, Yao K, Hoh J, Nussenzweig M. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature immunology* 2007, **8**(6): 578-583.
11. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* 2006, **7**(3): 311-317.
12. Schlitzer A, Schultze JL. Tissue-resident macrophages - how to humanize our knowledge. *Immunology and cell biology* 2017, **95**(2): 173-177.
13. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology* 2015, **33**: 643-675.

14. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 2004, **60**(1): 1-13.
15. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999, **11**(4): 443-451.
16. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology* 2003, **21**: 335-376.
17. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrin U, Kouro T, Akira S, *et al.* Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 2006, **24**(6): 801-812.
18. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, *et al.* Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *Journal of immunology* 2000, **164**(11): 5998-6004.
19. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972, **46**(6): 845-852.
20. Bennett WE, Cohn ZA. The isolation and selected properties of blood monocytes. *The Journal of experimental medicine* 1966, **123**(1): 145-160.
21. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of leukocyte biology* 2001, **69**(1): 11-20.
22. Akiyama Y, Miller PJ, Thurman GB, Neubauer RH, Oliver C, Favilla T, *et al.* Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *The Journal of clinical investigation* 1983, **72**(3): 1093-1105.
23. Akiyama Y, Stevenson GW, Schlick E, Matsushima K, Miller PJ, Stevenson HC. Differential Ability of Human-Blood Monocyte Subsets to Release Various Cytokines. *Journal of leukocyte biology* 1985, **37**(5): 519-530.
24. Weiner RS, Mason RR. Subfractionation of Human-Blood Monocyte Subsets with Percoll. *Experimental Hematology* 1984, **12**(10): 800-804.

25. Figdor CG, Bont WS, Touw I, Deroos J, Roosnek EE, Devries JE. Isolation of Functionally Different Human-Monocytes by Counterflow Centrifugation Elutriation. *Blood* 1982, **60**(1): 46-53.
26. Chehimi J, Starr SE, Kawashima H, Miller DS, Trinchieri G, Perussia B, *et al.* Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood. *Immunology* 1989, **68**(4): 486-490.
27. Fernandez RC, Lee SH, Fernandez LA, Pope BL, Rozee KR. Production of interferon by peripheral blood mononuclear cells from normal individuals and patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Interferon Res* 1992, **Spec No**: 71-78.
28. Fernandez RC, Lee SH, Fernandez LA, Pope BL, Rozee KR. Production of interferon by peripheral blood mononuclear cells from normal individuals and patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Interferon Res* 1986, **6**(5): 573-580.
29. Schreiber AD, Kelley M, Dziarski A, Levinson AI. Human monocyte functional heterogeneity: monocyte fractionation by discontinuous albumin gradient centrifugation. *Immunology* 1983, **49**(2): 231-238.
30. Arenson EB, Epstein MB, Seeger RC. Monocyte subsets in neonates and children. *Pediatrics* 1979, **64**(5 Pt 2 Suppl): 740-744.
31. Esa AH, Noga SJ, Donnenberg AD, Hess AD. Immunological heterogeneity of human monocyte subsets prepared by counterflow centrifugation elutriation. *Immunology* 1986, **59**(1): 95-99.
32. Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology* 2006, **18**(1): 49-53.
33. Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *Journal of leukocyte biology* 2000, **67**(5): 603-606.
34. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, *et al.* Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *The Journal of experimental medicine* 2003, **197**(12): 1701-1707.
35. Rogacev KS, Heine GH. Human monocyte heterogeneity--a nephrological perspective. *Nephrologie & therapeutique* 2010, **6**(4): 219-225.

36. Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, *et al.* CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney international* 2008, **73**(5): 622-629.
37. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, *et al.* CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *European heart journal* 2011, **32**(1): 84-92.
38. Ellery PJ, Tippett E, Chiu YL, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, *et al.* The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *Journal of immunology* 2007, **178**(10): 6581-6589.
39. Ulrich C, Heine GH, Garcia P, Reichart B, Georg T, Krause M, *et al.* Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2006, **21**(6): 1596-1602.
40. Ancuta P, Liu KY, Misra V, Wacleche VS, Gosselin A, Zhou X, *et al.* Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC genomics* 2009, **10**: 403.
41. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010, **115**(3): e10-19.
42. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, *et al.* SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011, **118**(12): e50-61.
43. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003, **19**(1): 71-82.
44. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010, **33**(3): 375-386.
45. Narni-Mancinelli E, Campisi L, Bassand D, Cazareth J, Gounon P, Glaichenhaus N, *et al.* Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(9): 2075-2087.

46. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, *et al.* Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunology and cell biology* 2008, **86**(5): 398-408.
47. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* 2008, **26**: 421-452.
48. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007, **317**(5838): 666-670.
49. Jakubzick C, Bogunovic M, Bonito AJ, Kuan EL, Merad M, Randolph GJ. Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 2008, **205**(12): 2839-2850.
50. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, *et al.* Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *Journal of immunology* 2004, **172**(7): 4410-4417.
51. Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *Journal of immunology* 2006, **176**(7): 4155-4162.
52. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(1): 185-194.
53. Qu C, Edwards EW, Tacke F, Angeli V, Llodra J, Sanchez-Schmitz G, *et al.* Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 2004, **200**(10): 1231-1241.
54. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(5): 1057-1069.
55. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(12): 3037-3047.

56. Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, van Rooijen N, Mack M, *et al.* Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103⁺ and CD103⁻ pulmonary dendritic cell populations. *Journal of immunology* 2008, **180**(5): 3019-3027.
57. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, *et al.* CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 2009, **113**(4): 963-972.
58. Tacke F, Ginhoux F, Jakubzick C, van Rooijen N, Merad M, Randolph GJ. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(3): 583-597.
59. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, *et al.* Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(1): 171-180.
60. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity (Reprinted from Nature, vol 256, 1975). *Journal of immunology* 2005, **174**(5): 2453-2455.
61. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. (vol 115, pg e10, 2010). *Blood* 2010, **116**(5): 857-857.
62. McCarthy DA, Macey MG. Novel anticoagulants for flow cytometric analysis of live leucocytes in whole blood. *Cytometry* 1996, **23**(3): 196-204.
63. Watson JV. *Introduction to flow cytometry*. Cambridge University Press: Cambridge England ; New York, NY, USA, 1991.
64. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (Mexico). Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. [cited]v.]. Available from: <http://www.columbia.edu/cgi-bin/cul/resolve?clio7175073.001>
65. Rose S, Misharin A, Perlman H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2012, **81**(4): 343-350.
66. Givan AL. Flow cytometry : first principles. 2001 [cited]; 2nd:[1 online resource (xviii, 273 pages) illustrations]. Available from: <http://purl.oclc.org/DLF/benchrepro0212>

67. Diggs LW, Sturm D, Bell A, Sallah S, Diggs LW. *Diggs, Sturm, Bell the morphology of human blood cells*, 7th edn. Abbott Laboratories: Abbott Park, Ill., 2005.
68. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010, **116**(16): e74-80.
69. van de Veerdonk FL, Netea MG. Diversity: a hallmark of monocyte society. *Immunity* 2010, **33**(3): 289-291.
70. Goff WL, Johnson WC, Wyatt CR, Cluff CW. Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production. *Veterinary immunology and immunopathology* 1996, **55**(1-3): 45-62.
71. Mirkovitch J, Konig A, Sauter KS, Brcic M, Hope JC, Howard CJ, *et al.* Single-cell analysis divides bovine monocyte-derived dendritic cells into subsets expressing either high or low levels of inducible nitric oxide synthase. *Veterinary immunology and immunopathology* 2006, **114**(1-2): 1-14.
72. Chamorro S, Revilla C, Alvarez B, Alonso F, Ezquerro A, Dominguez J. Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology* 2005, **114**(1): 63-71.
73. Chamorro S, Revilla C, Alvarez B, Lopez-Fuertes L, Ezquerro A, Dominguez J. Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiology* 2000, **202**(1): 82-93.
74. Ahuja V, Miller SE, Howell DN. Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43. *Cellular immunology* 1995, **163**(1): 59-69.
75. Yrlid U, Cerovic V, Milling S, Jenkins CD, Klavinskis LS, MacPherson GG. A distinct subset of intestinal dendritic cells responds selectively to oral TLR7/8 stimulation. *European journal of immunology* 2006, **36**(10): 2639-2648.
76. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(12): 953-964.
77. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology* 2007, **82**(2): 244-252.

78. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, *et al.* Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of experimental medicine* 2001, **194**(9): 1361-1373.
79. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993, **82**(10): 3170-3176.
80. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and rheumatism* 2012, **64**(3): 671-677.
81. Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyc A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M. Enhanced frequencies of CD14++CD16+, but not CD14+CD16+, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clinical immunology* 2009, **130**(3): 338-346.
82. Hijdra D, Vorselaars AD, Grutters JC, Claessen AM, Rijkers GT. Phenotypic characterization of human intermediate monocytes. *Frontiers in immunology* 2013, **4**: 339.
83. Heimbeck I, Hofer TP, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A, *et al.* Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14+CD16++ monocytes in females. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2010, **77**(9): 823-830.
84. Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, *et al.* Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Institute Mitteilungen* 1991(88): 208-215.
85. Lin ZQ, Guo J, Xia Q, Yang XN, Huang W, Huang ZW, *et al.* Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes may be an early marker for secondary infection in severe acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology* 2013, **60**(128): 1896-1902.
86. Berry PA, Antoniadou CG, Carey I, McPhail MJ, Hussain MJ, Davies ET, *et al.* Severity of the compensatory anti-inflammatory response determined by monocyte HLA-DR expression may assist outcome prediction in cirrhosis. *Intensive care medicine* 2011, **37**(3): 453-460.
87. Ferrer DG, Jaldin-Fincati JR, Amigone JL, Capra RH, Collino CJ, Albertini RA, *et al.* Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2014, **85**(7): 601-610.

88. Yona S. Monocytes, less is more. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2012, **81**(10): 821-822.
89. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HW. Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. *American journal of physiology Cell physiology* 2000, **279**(3): C578-586.
90. Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *Journal of leukocyte biology* 2003, **74**(1): 33-39.
91. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clinical and experimental immunology* 1998, **112**(3): 501-506.
92. Fertl A, Menzel M, Hofer TP, Morresi-Hauf A, Ziegler-Heitbrock L, Frankenberger M. Monitoring of glucocorticoid therapy by assessment of CD14(+)CD16(+) monocytes: a case report. *Immunobiology* 2008, **213**(9-10): 909-916.
93. Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004, **43**(5): 547-554.
94. Nockher WA, Wiemer J, Scherberich JE. Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subsets. *Clinical and experimental immunology* 2001, **123**(1): 49-55.
95. Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, *et al.* Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(33): 25616-25624.
96. Bosshart H, Heinzmann M. Spontaneous decrease of CD14 cell surface expression in human peripheral blood monocytes ex vivo. *Journal of immunological methods* 2011, **368**(1-2): 80-83.
97. Bannan J, Visvanathan K, Zabriskie JB. Structure and function of streptococcal and staphylococcal superantigens in septic shock. *Infectious disease clinics of North America* 1999, **13**(2): 387-396, ix.

98. Skinner NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, Visvanathan K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clinical and experimental immunology* 2005, **141**(2): 270-278.
99. Dalpke AH, Heeg K. Synergistic and antagonistic interactions between LPS and superantigens. *Journal of endotoxin research* 2003, **9**(1): 51-54.
100. Visvanathan K, Charles A, Bannan J, Pugach P, Kashfi K, Zabriskie JB. Inhibition of bacterial superantigens by peptides and antibodies. *Infection and immunity* 2001, **69**(2): 875-884.
101. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific reports* 2015, **5**: 13886.
102. Myers JE, Baker PN. Hypertensive diseases and eclampsia. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2002, **14**(2): 119-125.
103. Walker JJ. Inflammation and preeclampsia. *Pregnancy hypertension* 2011, **1**(1): 43-47.
104. Wagner LK. Diagnosis and management of preeclampsia. *American family physician* 2004, **70**(12): 2317-2324.
105. Tsatsaris V, Fournier T, Winer N. [Pathophysiology of preeclampsia]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* 2010, **29**(3): e13-18.
106. Norman JE, Bollapragada S, Yuan M, Nelson SM. Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC pregnancy and childbirth* 2007, **7 Suppl 1**: S7.
107. Svensson-Arvelund J, Ernerudh J, Buse E, Cline JM, Haeger JD, Dixon D, *et al.* The placenta in toxicology. Part II: Systemic and local immune adaptations in pregnancy. *Toxicologic pathology* 2014, **42**(2): 327-338.
108. Svensson J, Jenmalm MC, Matussek A, Geffers R, Berg G, Ernerudh J. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *Journal of immunology* 2011, **187**(7): 3671-3682.
109. Gustafsson C, Mjosberg J, Matussek A, Geffers R, Matthiesen L, Berg G, *et al.* Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS one* 2008, **3**(4): e2078.

110. Medeiros LT, Peracoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Golim MA, *et al.* Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are polarized to a M1 phenotype. *American journal of reproductive immunology* 2014, **72**(1): 5-13.
111. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reproductive sciences* 2010, **17**(3): 209-218.
112. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic research* 2012, **53**(1-3): 41-57.
113. Saha P, Geissmann F. Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunology and cell biology* 2011, **89**(1): 2-4.
114. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011, **118**(5): e16-31.
115. Lampe R, Kover A, Szucs S, Pal L, Arnyas E, Adany R, *et al.* Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *Journal of reproductive immunology* 2015, **107**: 26-30.
116. Warning JC, McCracken SA, Morris JM. A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction* 2011, **141**(6): 715-724.
117. Naruse K, Innes BA, Bulmer JN, Robson SC, Searle RF, Lash GE. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. *Journal of reproductive immunology* 2010, **86**(2): 148-150.
118. Melgert BN, Spaans F, Borghuis T, Klok PA, Groen B, Bolt A, *et al.* Pregnancy and preeclampsia affect monocyte subsets in humans and rats. *PLoS one* 2012, **7**(9): e45229.
119. Al-ofi E, Coffelt SB, Anumba DO. Monocyte subpopulations from pre-eclamptic patients are abnormally skewed and exhibit exaggerated responses to Toll-like receptor ligands. *PLoS one* 2012, **7**(7): e42217.
120. Vega-Sanchez R, Gomez-Lopez N, Flores-Pliego A, Clemente-Galvan S, Estrada-Gutierrez G, Zentella-Dehesa A, *et al.* Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *Journal of reproductive immunology* 2010, **84**(1): 100-110.

121. LaMarca B, Speed J, Fournier L, Babcock SA, Berry H, Cockrell K, *et al.* Hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion in pregnant rats: effect of tumor necrosis factor-alpha blockade. *Hypertension* 2008, **52**(6): 1161-1167.
122. Serrano NC. Immunology and genetic of preeclampsia. *Clinical & developmental immunology* 2006, **13**(2-4): 197-201.
123. Spaans F, Melgert BN, Chiang C, Borghuis T, Klok PA, de Vos P, *et al.* Extracellular ATP decreases trophoblast invasion, spiral artery remodeling and immune cells in the mesometrial triangle in pregnant rats. *Placenta* 2014, **35**(8): 587-595.
124. Joerger-Messerli MS, Hoesli IM, Rusterholz C, Lapaire O. Stimulation of monocytes by placental microparticles involves toll-like receptors and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. *Frontiers in immunology* 2014, **5**: 173.
125. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2001, **86**(6): 2505-2512.
126. Arts RJ, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *Journal of leukocyte biology* 2013, **93**(2): 209-215.
127. Sharif O, Knapp S. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* 2008, **213**(9-10): 701-713.
128. Kim HA, Choi B, Suh CH, Han MH, Jung JY, Sayeed HM, *et al.* Highly Expression of CD11b and CD32 on Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Adult-Onset Still's Disease. *International journal of molecular sciences* 2017, **18**(1).
129. Welt FG, Tso C, Edelman ER, Kjelsberg MA, Paolini JF, Seifert P, *et al.* Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury. *Vascular medicine* 2003, **8**(1): 1-7.
130. Becher UM, Moller L, Tiyerili V, Vasa Nicotera M, Hauptmann F, Zimmermann K, *et al.* Distinct CD11b+ monocyte subsets accelerate endothelial cell recovery after acute and chronic endothelial cell damage. *International journal of cardiology* 2014, **173**(1): 80-91.

131. Faas MM, Schuiling GA, Linton EA, Sargent IL, Redman CW. Activation of peripheral leukocytes in rat pregnancy and experimental preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology* 2000, **182**(2): 351-357.
132. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989, **74**(7): 2527-2534.
133. Barnes H, Ackermann EJ, van der Geer P. v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene* 2003, **22**(23): 3589-3597.
134. Strickland DK, Ranganathan S. Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2003, **1**(7): 1663-1670.
135. Caceres LC, Bonacci GR, Sanchez MC, Chiabrando GA. Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-kappaB activation in macrophage-derived cell lines. *Journal of cellular biochemistry* 2010, **111**(3): 607-617.
136. Barcelona PF, Jaldin-Fincati JR, Sanchez MC, Chiabrando GA. Activated alpha2-macroglobulin induces Muller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013, **27**(8): 3181-3197.
137. Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ. IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils. *Journal of immunology* 1992, **148**(5): 1471-1478.
138. Davoine F, Lavigne S, Chakir J, Ferland C, Boulay ME, Laviolette M. Expression of Fc gamma RIII (CD16) on human peripheral blood eosinophils increases in allergic conditions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002, **109**(3): 463-469.
139. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cellular immunology* 2014, **289**(1-2): 135-139.
140. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology* 2014, **5**: 514.
141. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, *et al.* Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS one* 2010, **5**(6): e11049.

142. Kim D, Kim JY. Anti-CD14 antibody reduces LPS responsiveness via TLR4 internalization in human monocytes. *Molecular immunology* 2014, **57**(2): 210-215.
143. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* 2001, **70**: 503-533.
144. Davies R, Vogelsang P, Jonsson R, Appel S. An optimized multiplex flow cytometry protocol for the analysis of intracellular signaling in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunological methods* 2016, **436**: 58-63.
145. Krutzik PO, Nolan GP. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2003, **55**(2): 61-70.
146. Huang X, Guo Y, Bao C, Shen N. Multidimensional single cell based STAT phosphorylation profiling identifies a novel biosignature for evaluation of systemic lupus erythematosus activity. *PloS one* 2011, **6**(7): e21671.
147. Cesano A, Perbellini O, Evensen E, Chu CC, Cioffi F, Ptacek J, *et al.* Association between B-cell receptor responsiveness and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from single cell network profiling studies. *Haematologica* 2013, **98**(4): 626-634.
148. Gavasso S, Mosleth EF, Maroy T, Jorgensen K, Nakkestad HL, Gjertsen BT, *et al.* Deficient phosphorylation of Stat1 in leukocytes identifies neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *PloS one* 2014, **9**(2): e88632.
149. Ilangumaran S, Finan D, Rottapel R. Flow cytometric analysis of cytokine receptor signal transduction. *Journal of immunological methods* 2003, **278**(1-2): 221-234.
150. Pollice AA, McCoy JP, Jr., Shackney SE, Smith CA, Agarwal J, Burholt DR, *et al.* Sequential paraformaldehyde and methanol fixation for simultaneous flow cytometric analysis of DNA, cell surface proteins, and intracellular proteins. *Cytometry* 1992, **13**(4): 432-444.
151. Krutzik PO, Clutter MR, Nolan GP. Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry. *Journal of immunology* 2005, **175**(4): 2357-2365.
152. Narni-Mancinelli E, Soudja SM, Crozat K, Dalod M, Gounon P, Geissmann F, *et al.* Inflammatory monocytes and neutrophils are licensed to kill during memory responses in vivo. *PLoS pathogens* 2011, **7**(12): e1002457.

153. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Bouman A, Moes H, Heineman MJ, de Leij LF, Santema J, *et al.* Endotoxin-induced cytokine production of monocytes of third-trimester pregnant women compared with women in the follicular phase of the menstrual cycle. *American journal of obstetrics and gynecology* 2003, **188**(4): 1073-1077.
154. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2006, **11**(5): 309-316.
155. Kramer PR, Kramer SF, Guan G. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis and rheumatism* 2004, **50**(6): 1967-1975.
156. Kramer PR, Winger V, Kramer SF. 17beta-Estradiol utilizes the estrogen receptor to regulate CD16 expression in monocytes. *Molecular and cellular endocrinology* 2007, **279**(1-2): 16-25.
157. Xia S, Guo Z, Xu X, Yi H, Wang Q, Cao X. Hepatic microenvironment programs hematopoietic progenitor differentiation into regulatory dendritic cells, maintaining liver tolerance. *Blood* 2008, **112**(8): 3175-3185.
158. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nature immunology* 2010, **11**(8): 734-742.
159. Jamsa J, Huotari V, Savolainen ER, Syrjala H, Ala-Kokko T. Kinetics of leukocyte CD11b and CD64 expression in severe sepsis and non-infectious critical care patients. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2015, **59**(7): 881-891.
160. Gandley RE, Rohland J, Zhou Y, Shibata E, Harger GF, Rajakumar A, *et al.* Increased myeloperoxidase in the placenta and circulation of women with preeclampsia. *Hypertension* 2008, **52**(2): 387-393.
161. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nature immunology* 2006, **7**(12): 1266-1273.
162. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *American journal of reproductive immunology* 1997, **37**(3): 240-249.

