

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Implicación de la pseudoquinasa IRAK-M
en los procesos de tolerancia a endotoxina
y a tumores.

TESIS DOCTORAL

Carlos del Fresno Sánchez

Madrid, 2007

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Implicación de la pseudoquinasa IRAK-M en los procesos de tolerancia a endotoxina y a tumores.

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Carlos del Fresno Sánchez
Licenciado en Biología

Director de tesis:
Dr. Eduardo Manuel López Collazo

Unidad de Investigación
Hospital Universitario “La Paz”



Hospital Universitario La Paz



EDUARDO MANUEL LÓPEZ COLLAZO, DOCTOR EN FARMACIA E INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ,

CERTIFICA

Que el trabajo que presenta D. CARLOS DEL FRESNO SÁNCHEZ, titulado “Implicación de la pseudoquinasa IRAK-M en los procesos de tolerancia a endotoxina y a tumores”, ha sido realizado bajo mi dirección y considero que reúne los requisitos de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser presentado como Memoria de Tesis Doctoral.

Madrid, 15 de Septiembre de 2007

Fdo. Dr. Eduardo Manuel López Collazo

Si tienes un problema y tiene solución....

¿de qué te preocupas?

Y si no tiene solución...

¿de qué te preocupas?

(Para mí, esto define a una aptitud optimista)

AGRADECIMIENTOS

Nunca pensé que cuando al terminar de elaborar esta tesis, me dispusiera a escribir esta parte, me iba a resultar tan difícil.

He de empezar por mi director de tesis, el Dr. Eduardo López-Collazo. Ed, director, socio, amigo, con todo lo mucho de bueno que eso tiene, y también lo poco de malo, creo que nunca he logrado hacerte sentir cómo te agradezco todo lo que me has dado. Me siento científico por ti, por como me has enseñado a pensar, a elaborar experimentos, a leer, a criticar. Sabes que soy muy cabezón, pero creo en ti (sobre todo después de lo del ácido hialurónico y el TNF α); no lo olvides cuando discutamos. Padrino, gracias infinitas.

Tengo que agradecer haberme tropezado en el camino de la ciencia biomédica con el Dr. Francisco Arnalich. Su aportación desde el punto de vista médico y su implicación en este trabajo han sido clave para su desarrollo. Pero por encima de todo quisiera agradecerle cómo nos escucha cuando le hablamos, cómo se interesa de verdad por aquello que hacemos, a pesar de tener las ingentes responsabilidades que supone su cargo en el hospital.

A los doctores Silvano Sozzani y Antonio Sica, por permitirnos realizar los experimentos con los ARN de interferencia en su laboratorio del Instituto Mario Negri en Milán. “Grazie mille di tutto”. De manera especial, a Karel Otero, porque sin su hospitalidad y su inestimable ayuda en el desarrollo de esos experimentos, no hubiera sido posible su realización.

A mis compañeras Alecita y Vaniii de manera muy especial. Alecita, gracias por nuestros besitos en el aula (tú y yo sabemos lo que significa eso), por tus risas, pero sobre todo por lo que significó para mí una cosa que me dijiste: “estás consiguiendo que me dé cuenta de que me encanta la ciencia”. Vanesa, sabes que te admiro por tu valentía al seguir tus ideas, por ser capaz de romper con algo establecido y cómodo, para hacer aquello que de verdad querías. Sois unas compañeras geniales, da gusto trabajar con vosotras y discutir de ciencia, incluso cuando nos vamos de juerga.

Agradezco a la gente que a estado a mi lado a lo largo de este trabajo, a la que considero parte de nuestro grupo: Irene, Elena, Pedro, Mamen, Miriam, Mayte y al mister, Alex. A la gente de la Unidad de Investigación que me ha ayudado a que el trabajo fuera más llevadero en los momentos duros, como Victor, Miguel, Marta, Cristina, Loli o Mariano. De manera especial a la flor, Carolina.

A ti Lourdes, no sabía muy bien dónde ponerte. Hay millones de cosas que me recuerdan a ti. Me enseñaste lo que sé de cultivos celulares, y sobre todo a hacerlo riendo. Me ilustraste cómo una gran científica puede ser una madraza, enamorada de su marido y de la vida. Es fácil sentir que leerás esto allá donde estés. Gracias por todo.

Ahora mismo me acuerdo de mis padres, Carlos y Mercedes. Soy lo que soy por vosotros, por vuestras enseñanzas, por la educación que me habéis dado, por hacerme entender que hay que luchar para llegar a ser algo, y así valorarlo después. Intento y creo estar a la altura de lo que esperabais de mí, porque soy un reflejo de vosotros. Como lo es Javier, mi hermano, al que tengo que agradecerle que sea como es, como por ejemplo cuando a la pregunta de tú que vas a ser de mayor, él respondió: “hermano del biólogo”.

A mi familia, por animarme y entusiasmarse conmigo. Quizá no debiera (mi madre es posible que incluso se enfade), pero quiero destacar a cuatro personas, justo por lo que acabo de decir, por animarme y entusiasmarse conmigo. A mi abuela Tomasa y a mi tita Mari; no todo el mundo puede decir que casi tiene tres madres, como yo puedo hacerlo gracias a ellas. A mi tío Vicente y mi tita Nieves; ambos, por su mirada cuando les hablo de mi trabajo y mis proyectos.

A mi “nueva” familia, Miguel, Lola y mis cuñados. Me habéis acogido como uno más, y eso ha sido una gran ayuda a mi trabajo y a mi vida.

Y a ti, Evvi, ya te dije que no te gustaría dónde ibas a aparecer. Como sé que me conoces bien, sabes porqué apareces aquí. Tú me has aguantado a lo largo de todo este tiempo, y me has enseñado a levantar la cabeza del artículo que estaba leyendo un domingo por la tarde y conocer nuevas formas de divertirme. Me has ayudado a ver que no todo ha de ser ciencia, aun respetando lo importante que es para mí. Y gracias a eso este trabajo ha salido adelante. Les he dicho a mis padres que soy un reflejo de ellos. Soy también un reflejo de lo que me has dado.

Finalmente, agradecer todo lo que tengo, vivo y soy, a las Virtudillas.

Este trabajo ha podido realizarse gracias a los fondos proporcionados por la Comunidad de Madrid, el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social y la Fundación Mutua Madrileña Automovilística.

A lo largo del presente trabajo, he disfrutado de una beca de investigación del Hospital Universitario La Paz, una beca de Formación de Personal Investigador de la Comunidad de Madrid y un contrato de Personal de Apoyo a la Investigación también de la Comunidad de Madrid.

RESUMEN

La exposición de células del sistema inmune innato a determinados agentes patógenos, como el lipopolisacárido (LPS) de la pared de bacterias Gram negativas o el co-cultivo con determinadas células tumorales, induce una respuesta inflamatoria. Sin embargo, una pre-exposición a dichos agentes, induce la entrada en un estado en el que la respuesta inflamatoria se ve atenuada, al existir un nuevo contacto con el estímulo. Este fenómeno es conocido como tolerancia.

El presente trabajo demuestra la implicación de la pseudoquinasa IRAK-M en el desarrollo de este proceso en monocitos / macrófagos (MØ) humanos, dentro de dos contextos, la tolerancia a endotoxina ("TE") y la tolerancia a tumores ("TT").

La exposición de MØ a LPS o a células tumorales, induce en ellos la expresión de IRAK-M. Sin embargo, la inducción de condiciones tolerantes a estas células, en sendos modelos de "TE" y "TT", acelera significativamente la expresión de la pseudoquinasa. En el modelo de "TT", IRAK-M juega un papel crítico, ya que su silenciamiento anula el desarrollo de la tolerancia.

La actividad PI3K y el TNF α están implicados en la inducción de IRAK-M por LPS. Por otra parte, el ácido hialurónico (AH) liberado al medio y anclado a las membranas de células tumorales, es responsable de la inducción de IRAK-M en el modelo de "TT". Este proceso está mediado por el reconocimiento específico del AH por los receptores de membrana CD44 y TLR4.

MØ tolerantes aislados de pacientes sépticos y expuestos *ex vivo* a LPS, muestran una cinética de expresión de IRAK-M concordante con la observada en el modelo de "TE". Análogamente, MØ aislados de pacientes con procesos tumorales en los que existen células cancerosas circulantes (leucemia y tumor metastásico de colon), expresan IRAK-M. Ambos datos validan los resultados obtenidos *in vitro* con los modelos de "TE" y "TT", respectivamente, además de otorgarles un importante valor clínico.

En conjunto, nuestros datos indican que IRAK-M es un elemento clave implicado en el desarrollo de procesos tolerantes en MØ humanos.

SUMMARY

Exposition of innate immune cells to pathogen agents or a co-culture with tumour cells, induces an inflammatory response. However, a pre-exposition to such agents, generates a refractory state known as tolerance.

The data presented in this thesis suggests that IRAK-M plays a crucial role in the control of tolerance in human monocytes / macrophages (MØ). Two models have been analyzed: endotoxin tolerance (“ET”) and tumor tolerance (“TT”).

Both, LPS and tumor cells, induce IRAK-M expression in human MØ. However, induction of a tolerant stage provokes a fast up-regulation of its expression. In addition, our findings reveal that IRAK-M plays a critical role in this event as its down-regulation by genetic techniques blocks the tolerance induction in the “TT” model.

With regards to its mechanisms, apparently PI3K activity and TNF α are involved in LPS-induced IRAK-M induction. On the other hand, hyaluronic acid (HA), generated by tumor cells, results are a crucial factor for IRAK-M up-regulation in the “TT” model. Our data demonstrated that both, soluble and membrane anchored HA, are able to induce the tolerance state mediated by IRAK-M induction. This process needs a previous recognition of HA by CD44 and TLR4.

Ex vivo LPS challenged of tolerant MØ, isolated from patients who suffer from gram negative bacteremia, showed the same IRAK-M expression pattern observed *in vitro* (ET model). Likewise, MØ isolated from patients who suffer from a tumor process, in which there are circulating tumor cells (leukemia and colon metastatic tumor), express IRAK-M. These data corroborate the *in vitro* results obtained on the “ET” and the “TT” models.

ÍNDICE

	Página
Listado de Figuras.....	21
Listado de Tablas.....	23
Abreviaturas.....	25
1.- INTRODUCCIÓN.....	31
1.1.- Sistema inmune innato.....	31
1.1.a) Familia de receptores “Toll-like Receptors”.....	31
1.1.b) Proteínas adaptadoras.....	33
1.1.c) Proteínas accesorias y otros receptores importantes en la respuesta inmune innata.....	35
1.1.d) Receptor CD44 y ácido hialurónico.....	35
1.1.e) Familia de proteínas de transducción de señal “Interleukin-1 Receptor Associated Kinases”.....	36
1.1.f) Respuesta inflamatoria generada por el sistema inmune innato.....	39
1.2 TOLERANCIA	42
1.2.a) Mecanismos implicados en la tolerancia.....	43
1.3 IRAK-M.....	44
2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
2.1.- Reactivos.....	49
2.1.a) Anticuerpos.....	49
2.2.- Cultivos celulares.....	50
2.2.a) Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	50
2.2.b) Purificación de monocitos / macrófagos por adherencia.....	50
2.2.c) Purificación magnética de monocitos / macrófagos de sangre periférica.....	51
2.2.d) Cultivo de líneas celulares, fibroblastos y linfocitos primarios.....	51
2.3.- Tratamientos	52
2.3.a) Tratamientos con lipopolisacárido.....	52
2.3.b) Co-cultivos y posterior aislamiento de monocitos / macrófagos humanos.....	52
2.3.c) Diseño y transfección de ARN de interferencia contra IRAK-M.....	53
2.4.- Selección de pacientes.....	53
2.4.a) Pacientes con sepsis.....	53
2.4.b) Pacientes con diversos tumores.....	54
2.5.- Aislamiento de ARN y proteínas.....	54

2.6.- Cuantificación del ARN mensajero.....	55
2.7.- Análisis por Western Blot.	57
2.8.- ELISA para TNFα.	57
2.9.- Ensayos de apoptosis.....	58
2.10.- Análisis estadísticos.	58
3.- RESULTADOS.....	61
3.1.- Modelo general de tolerancia.....	61
3.2.- Expresión de IRAK-M en el contexto de la tolerancia a endotoxina.	63
3.2.a) Modelo de tolerancia a endotoxina.....	63
3.2.b) Activación de IRAK-M en el modelo de tolerancia a endotoxina.....	65
3.2.c) Mecanismos que controlan la activación de IRAK-M.....	67
3.2.c.i) Vinculación de la actividad fosfatidil inositol 3' - quinasa en la expresión de IRAK-M inducida por LPS.	67
3.2.c.ii) TNF α induce la expresión de IRAK-M.....	68
3.2.d) Regulación específica de IRAK-M en monocitos / macrófagos aislados de pacientes con sepsis.....	69
3.3. Expresión de IRAK-M en el contexto de la tolerancia a tumores.	70
3.3.a) Modelo de tolerancia a células tumorales.	70
3.3.b) Activación de IRAK-M en el modelo de tolerancia a células tumorales.	72
3.3.c) Silenciamiento génico de IRAK-M en el modelo de tolerancia a tumores.	75
3.3.d) Elementos responsables de la inducción de IRAK-M en el modelo de tolerancia a tumores.	78
3.3.d.i) Implicación del ácido hialurónico en la inducción de IRAK-M.	79
3.3.d.ii) El ácido hialurónico induce tolerancia y el silenciamiento de IRAK-M revierte este proceso.....	81
3.3.d.iii) CD44 y TLR4 intervienen en la inducción de IRAK-M por ácido hialurónico.....	83
3.3.e) Expresión de IRAK-M en monocitos / macrófagos aislados de pacientes con cáncer.....	85
4.- DISCUSIÓN.....	89
5.- CONCLUSIONES.....	107
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	111
6.1.- Artículos publicados con los datos del presente trabajo.....	123
6.2.- Artículos adicionales publicados durante el desarrollo del presente trabajo..	125

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura I1. Ligandos y localización subcelular de los diferentes Toll-like Receptors.	32
Figura I2. Uso de proteínas adaptadoras por los diferentes Toll-like receptors.	34
Figura I3. Resumen esquemático de los procesos en que intervienen las diferentes Interleukin-1 Receptor Associated Kinases.	40
Figura I4. Esquema general de los elementos implicados en el reconocimiento del lipopolisacárido por parte del Toll-like Receptor 4, y su cascada de señalización intracelular.	41
Figura R1. Expresión de TNF α a nivel transcripcional en el modelo de tolerancia a endotoxina.	64
Figura R2. Producción de TNF α en el modelo de tolerancia a endotoxina.	64
Figura R3. Expresión de IRAK-M en función del tiempo de estimulación con LPS.	65
Figura R4. Expresión de IRAK-M en el modelo de tolerancia a endotoxina.	66
Figura R5. Expresión a nivel proteico de IRAK-M en el modelo de tolerancia a endotoxina.	66
Figura R6. Vinculación entre la actividad fosfatidil inositol 3' - quinasa y la expresión de IRAK-M.	68
Figura R7. TNF α induce la expresión de IRAK-M.	68
Figura R8. Expresión de TNF α e IRAK-M en monocitos / macrófagos aislados de pacientes sépticos.	69
Figura R9. Expresión de TNF α a en el modelo de tolerancia a tumores.	71
Figura R10. Inducción de IRAK-M por diferentes tipos celulares.	73
Figura R11. Expresión de IRAK-M en el modelo de tolerancia a tumores.	74
Figura R12. Expresión de TNF α en el modelo de tolerancia a tumores.	75
Figura R13. Test de eficacia del ARN de interferencia contra IRAK-M.	76
Figura R14. Expresión de TNF α en el modelo de tolerancia a tumores en presencia de ARN de interferencia contra IRAK-M.	77
Figura R15. Inducción de IRAK-M debida a factores anclados a membranas de células tumorales o elementos solubles liberados por ellas.	79
Figura R16. Inducción de IRAK-M y TNF α por ácido hialurónico.	80
Figura R17. Expresión proteica de IRAK-M en monocitos / macrófagos expuestos a diferentes estímulos en el contexto de la tolerancia a tumores.	81
Figura R18. Expresión de TNF α en el modelo de tolerancia inducido por ácido hialurónico, en presencia de ARN de interferencia contra IRAK-M.	82
Figura R19. Efecto bloqueante de los anticuerpos anti-CD44 y anti-TLR4 sobre la expresión de IRAK-M inducida por ácido hialurónico.	84
Figura R20. Efecto aditivo de los anticuerpos anti-CD44 y anti-TLR4 sobre la expresión de IRAK-M inducida por células A431.	84
Figura R21. Expresión de TNF α e IRAK-M en monocitos / macrófagos de pacientes con diversos tumores.	85
Figura D1. Esquema hipotético general de los mecanismos descritos implicados en la activación de IRAK-M en el proceso de tolerancia a endotoxina.	94
Figura D2. Esquema hipotético general de los posibles mecanismos implicados en la activación de IRAK-M en el proceso de tolerancia a tumores.	102

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla M1. Anticuerpos utilizados.	49
Tabla M2. Líneas celulares utilizadas.	51
Tabla M3. Secuencia de los cebadores utilizados en PCR cuantitativa.	55
Tabla M4. Programas de PCR cuantitativa utilizados para cada para uno de los cebadores.	56
Tabla R1. Estructura general del modelo de tolerancia utilizado “in vitro”.	62
Tabla R2. Estructura del modelo de tolerancia a endotoxina.	63
Tabla R3. Estructura del modelo de tolerancia a células tumorales.	71

ABREVIATURAS

α -MSH: α -Melanocyte-Stimulating-Hormone.

AH: Ácido Hialurónico.

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

DE: Desviación Estándar.

DD: Death Domain.

DMEM: Dulbecco's MEM.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

IL-X: Interleuquina – X.

IRAK: Interleukin-1 Receptor Associated Kinase.

IRF: Interferon Response Factor.

LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein.

LPS: Lipopolisacárido.

M: Media.

MØ: Monocitos / macrófagos.

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase.

MD-2: Myeloid Differentiation 2.

MyD88: Myeloid Differentiation factor 88.

NF- κ B: Nuclear Factor - κ B.

PBS: Phosphate Buffered Saline.

PCR-Q: PCR cuantitativa.

PGN: Peptidoglucano.

PI3K: Phosphatidyl Inositol 3' Kinase.

PGE₂: Prostaglandina E2.

SARM: SAM and ARM-containing protein.

SFB: Suero Fetal Bovino.

TE: Tolerancia a Endotoxina.

TIR: Toll/IL-1R homology.

TIRAP/Mal: TIR domain-containing Adaptor Protein / MyD88 Adaptor-Like.

TLR: Toll-Like Receptor.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

TRAM: Trif-Related Adaptor Molecule.

TRIF: TIR domain-containing adaptor inducing InterFeron- β .

TT: Tolerancia a Tumores.

UI: Unidades Internacionales.

INTRODUCCIÓN

1.- Introducción

1.1.- Sistema inmune innato.

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa de nuestro organismo ante diferentes agresiones, como quemaduras, operaciones quirúrgicas o infecciones (Sherwood, *et al*, 2004). Los monocitos como precursores circulantes y los macrófagos como elementos efectoros que forman parte del sistema fagocítico (Kumar, *et al*, 2006), son clave en esta respuesta inicial. Estas células desarrollan diversas funciones fundamentales en la respuesta inmune temprana, como son la liberación de citoquinas inflamatorias, fagocitosis y presentación de antígenos (Tosi, 2005).

Inicialmente, este sistema fue considerado como “inespecífico”, con una función caracterizada por la captación y digestión de microorganismos y antígenos ajenos (Abreu, *et al*, 2004).

Sin embargo, la descripción inicial en *Drosophila melanogaster* del producto del gen *Toll* (Lemaitre, *et al*, 1996), cambió radicalmente esa concepción inicial. Este trabajo mostró cómo esta proteína receptora era esencial, de manera específica, en las respuestas antifúngicas de las moscas. El hallazgo hacía pensar que la respuesta del sistema inmune innato, dependía del reconocimiento específico de agentes ajenos por receptores concretos. Partiendo de esta apreciación, se llegó a la caracterización de una familia de proteínas, conservadas a lo largo de la evolución desde el nemátodo *Caenorhabditis elegans* hasta mamíferos (Akira, *et al*, 2006), conocida como TLR (del inglés “Toll-Like Receptors”).

1.1.a) Familia de receptores “Toll-like Receptors”.

Los TLR en mamíferos constituyen una familia de al menos 12 receptores, todos ellos con la capacidad de reconocer ligandos específicos y activar una respuesta inmune de tipo inflamatorio (Trinchieri, *et al*, 2007). Se trata de glucoproteínas de membrana caracterizadas por dos regiones estructurales; un dominio extracelular con varios motivos LRR (del inglés “Leucine-Rich-Repeat”), a través del cual se da el reconocimiento específico de su ligando, y un dominio citoplasmático llamado TIR (del inglés “Toll/IL-1R”).

homology”), mediante el que interaccionan con proteínas de transducción de señal (Akira, *et al*, 2006; Akashi-Takamura, *et al*, 2006).

Cada uno de los TLR reconoce ligandos específicos, ya sea individualmente o dimerizándose con otros (Figura 11). Además, sus localizaciones subcelulares dependen del ligando que reconozcan; por ejemplo, el TLR4 se localiza en la superficie celular, donde reconoce al LPS de la pared de bacterias Gram negativas. Sin embargo el TLR3 se encuentra en endosomas, ya que reconoce ARN de doble hélice propio de determinados virus, cuyo mecanismo de infección es intracelular. A pesar de estar descritos los TLR del 10 al 12, se desconocen sus ligandos (Chen, *et al*, 2007).

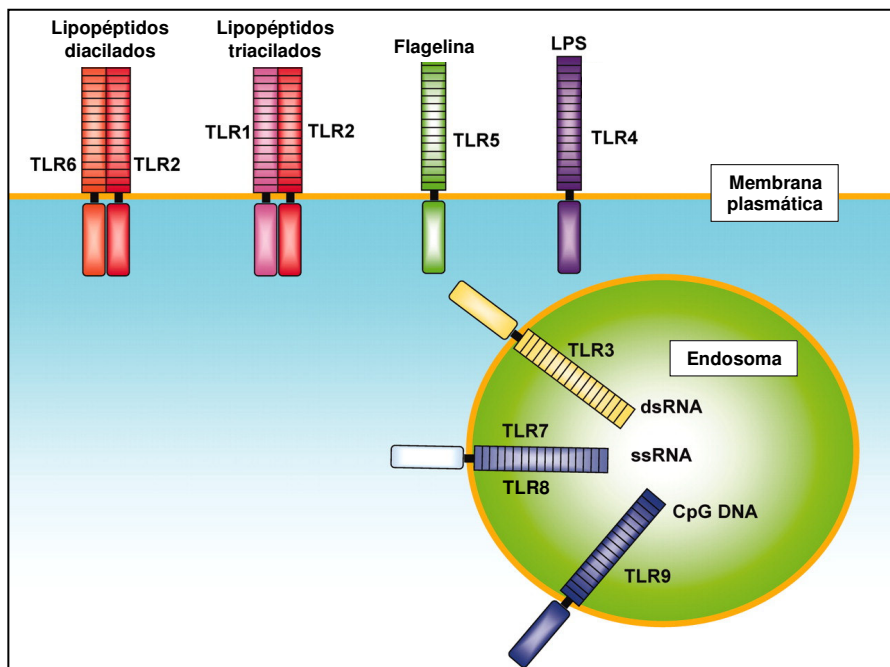


Figura 11. Ligandos y localización subcelular de los diferentes Toll-like Receptors. (Modificada de Takeda, *et al*, 2005).

El TLR4 como parte esencial del complejo que reconoce al LPS, merece una atención especial para el presente trabajo. Este receptor además de reconocer a la endotoxina bacteriana, presenta la capacidad de detectar diversos ligandos del propio organismo hospedador, como proteínas de choque térmico, fibrinógeno o el ácido hialurónico (AH) (Akira, *et al*, 2004). Este fenómeno ha hecho pensar en su posible implicación en el desarrollo de tolerancia periférica y en procesos autoinmunes (Ehlers, *et al*, 2007).

La importancia del TLR4 en la respuesta inmune innata, ha quedado patente con la descripción de patologías asociadas a mutaciones o polimorfismos en este receptor. Se han vinculado, por ejemplo, con malaria (Mockenhaupt, *et al*, 2006), susceptibilidad a infección por meningococo (Faber, *et al*, 2006), o respuestas diferenciales a endotoxemia sistémica (Calvano, *et al*, 2006).

Los TLR carecen de actividad quinasa, con lo que necesitan la participación de moléculas adaptadoras y quinasas de transducción de señal, que generen una cascada de señalización intracelular, iniciada por el reconocimiento específico de los correspondientes ligandos. De esta forma, una vez que el TLR ha reconocido a su ligando específico, en su porción intracelular se inicia el reclutamiento de diversas proteínas adaptadoras, originando un complejo iniciador de la cascada de señalización (McGettrick, *et al*, 2004). De hecho, la especificidad de esa cascada se logra mediante el reclutamiento diferencial de dichos adaptadores (Huang, *et al*, 2005).

1.1.b) Proteínas adaptadoras.

Actualmente se conocen cinco proteínas adaptadoras implicadas en la transducción de señal iniciada por los TLR. Todas ellas tienen en común que contienen dominios TIR con los que interaccionan por uniones homofílicas con los receptores (O'Neill, *et al*, 2007).

La primera descrita, y que en la actualidad diversifica el estudio de las cascadas de señalización en función de su implicación o no, fue MyD88 (del inglés "Myeloid Differentiation 88") (Lord, *et al*, 1990). Además del dominio TIR ya mencionado, presenta un dominio DD (del inglés "Death Domain"), mediante el cual interacciona con proteínas quinasas que continúan la cascada de señalización, como son las IRAK (del inglés Interleukin-1 Receptor Associated Kinases) (O'Neill, *et al*, 2007).

MyD88 es esencial para la producción de citoquinas inflamatorias mediada por todos los TLR, exceptuando el TLR3 (Figura I2), que presenta una ruta de señalización independiente de MyD88, la cual puede ser también utilizada por TLR4 (Takeda, 2005).

En el caso de los TLR5, 7, 8 y 9, la interacción de MyD88 con los receptores es directa. Sin embargo, en el caso de los dímeros TLR1-2, TLR2-6 o para TLR4, en la unión de MyD88 con el dominio intracelular de los receptores, media otra proteína adaptadora llamada TIRAP/Mal (del inglés “TIR domain-containing Aaptor Protein / MyD88 Aaptor-Like”) (O’Neill, *et al*, 2007).

La tercera proteína adaptadora descrita fue TRIF (del inglés “TIR-domain-containing adaptor inducing InterFeron- β ”). Presenta la capacidad de unirse a TLR3 y TLR4 independientemente de MyD88, para iniciar una cascada de señalización que culmina con la producción de interferones tipo I (Yamamoto, *et al*, 2002).

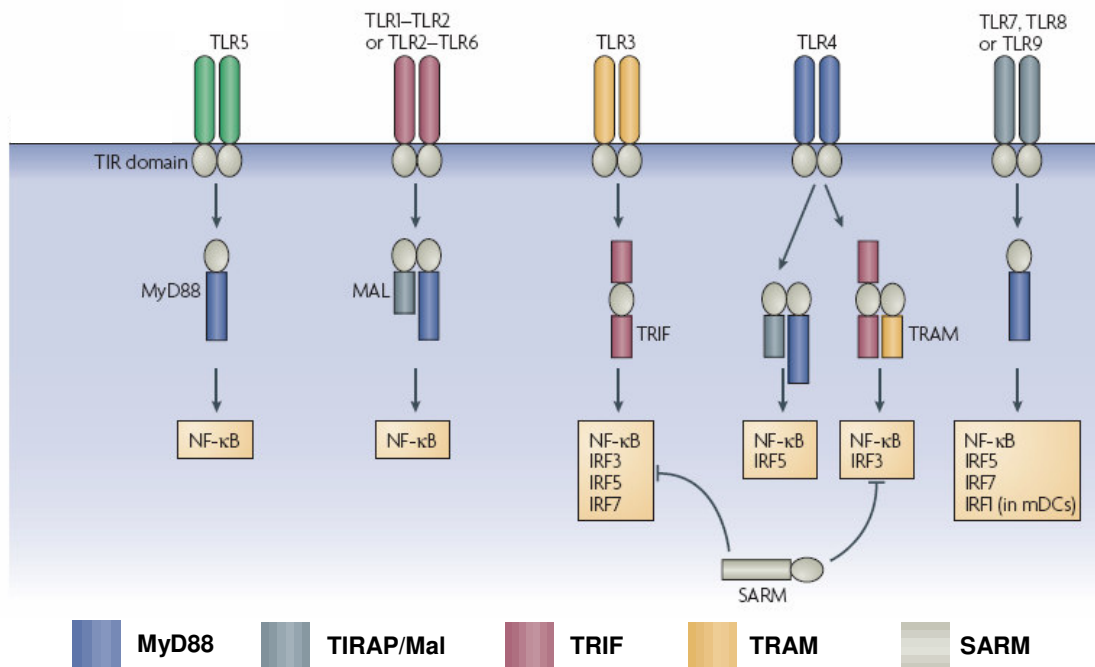


Figura I2. Uso de proteínas adaptadoras por los diferentes Toll-like receptors. Tras el reconocimiento por parte de los TLR de sus ligandos específicos, diferentes proteínas adaptadoras median la activación de los factores de transcripción NF- κ B (del inglés “Nuclear Factor κ B”) o de diferentes IRF (del inglés “Interferon Response Factors”). La intervención de cada una de las cinco proteínas adaptadoras descritas (MyD88, TIRAP/Mal, TRIF, TRAM y SARM), está representada por un código de colores. (Modificada de O’Neill, *et al*, 2007).

Sin embargo, la interacción de TRIF con TLR4, no es directa. Está mediada por la cuarta proteína adaptadora, TRAM (del inglés “Trif-Related Aaptor Molecule”) (McGettrick, *et al*, 2004). En la Figura I4, encuadrado en rojo, puede verse un esquema de la participación de estas cuatro proteínas en la señalización iniciada por el TLR4.

La última proteína implicada en la integración de la señal iniciada por los TLR, con la cascada de señalización intracelular es SARM (del inglés “SAM and ARM-containing protein”) (Couillault, *et al*, 2004). Al contrario que el resto de las anteriormente mencionadas, su sobreexpresión no activa una respuesta inflamatoria, lo que es debido a que se trata de un regulador negativo específico de la activación dependiente de TRIF (Carty, *et al*, 2006).

1.1.c) Proteínas accesorias y otros receptores importantes en la respuesta inmune innata.

Es importante destacar, que la visión dada hasta ahora del reconocimiento antigénico por parte del sistema inmune innato, es bastante simplista. En este proceso intervienen otras muchas proteínas, con funciones tanto receptoras de ligandos específicos, como accesorias de esa función (Medzhitov, *et al*, 1998).

Si nos centramos como modelo en el reconocimiento del LPS, además del TLR4, son necesarios otros tres elementos: la proteína de unión al LPS, LBP (del inglés Lipopolysaccharide Binding Protein), el receptor CD14 (exclusivo de células de origen mieloide) y la proteína accesoria MD-2 (del inglés Myeloid Differentiation 2) (Miyake, 2006). En este modelo, el LPS se une a la proteína soluble LBP, la cual se une al CD14; este receptor carece de región transmembrana, con lo que a su vez, para transducir la señal al interior celular, necesita dimerizarse con TLR4, mediando la acción de MD-2 (Taylor, *et al*, 2005). Puede verse una representación gráfica de este proceso en la Figura 14, encuadrado en color azul.

1.1.d) Receptor CD44 y ácido hialurónico.

Otro receptor importante en el desarrollo de este trabajo, presente en células del sistema inmune innato, es el CD44. Se trata del principal receptor de AH (Ahrens, *et al*, 2001), aunque como ya hemos comentado, este compuesto también puede ser reconocido por TLR4 (Akira, *et al*, 2004).

CD44 es un receptor transmembrana, relacionado con diversos procesos patológicos asociados a inflamación. Por ejemplo, está implicado en la fusión celular de macrófagos, que da lugar a la formación de células gigantes en

procesos inflamatorios crónicos (Cui, *et al*, 2006), o en patologías de tipo osteoporóticas con origen inflamatorio (Ariyoshi, *et al*, 2005; Hayer, *et al*, 2005).

Sin embargo, el papel que juega este receptor en procesos tumorales, ha sido objeto de gran interés desde el momento de su caracterización en macrófagos (Gupta, *et al*, 1991), considerándose un potencial factor diagnóstico (Chiu, *et al*, 1995) e incluso pronóstico (Naor, *et al*, 1997) de metástasis.

Por su parte, el AH es un glucosaminglucano polimérico, componente de la matriz extracelular, formado por unidades repetidas del disacárido [- ácido - D - glucurónico - β 1,3 N - acetil - D - glucosamina - β 1,4 -] (Stern, 2004). Esta estructura tan sencilla, dependiendo de la longitud que presente, muestra funciones diferentes e incluso opuestas. Así, polímeros de alto peso molecular (hasta 2×10^4 kDa) presentan funciones inmunosupresoras, mientras que polímeros más pequeños son inflamatorios e inmunoestimuladores (Stern, *et al*, 2006).

La producción de pequeños fragmentos de AH por células tumorales, se conoce desde antiguo (Prehm, 1983), si bien actualmente la vinculación entre CD44, AH y malignidad tumoral, en diferentes tipos de tumores, está claramente descrita, por ejemplo en cáncer de colon (Kim, *et al*, 2004), mama (Gotte, *et al*, 2006), y próstata (Konety, 2006).

1.1.e) Familia de proteínas de transducción de señal “Interleukin-1 Receptor Associated Kinases”.

Entre las diferentes proteínas que intervienen en la transducción de señal, originada por el reconocimiento por parte de los TLR de sus ligandos específicos, la familia de las IRAK, juega un papel fundamental.

El nombre de esta familia de proteínas (la traducción del inglés es quinasas asociadas al receptor de interleuquina-1(IL-1)), procede de su primer miembro descrito, IRAK-1, una proteína quinasa con la propiedad de inmunoprecipitar con el receptor de la IL-1 (Martin, *et al*, 1994). En un análisis comparativo de esta proteína se demostró que era homóloga a Pelle, una quinasa de *Drosophila melanogaster*, implicada en la ruta de señalización de Toll (mencionado en el punto 1.1), y esencial para la inmunidad del insecto

(Cao, *et al*, 1996). Este dato inició el estudio de la implicación de esta familia de proteínas en la respuesta inmune de mamíferos.

Se han descrito cuatro miembros pertenecientes a esta familia, IRAK-1, IRAK-2, IRAK-3 (también conocida como IRAK-M) e IRAK-4. Todas ellas muestran una estructura general similar, presentando dos regiones fundamentales para su función (Janssens, *et al*, 2003): por un lado, poseen un dominio DD mediante el cual, interaccionan por uniones homofílicas con las proteínas adaptadoras mencionadas en el punto 1.1.b., y por otro un dominio quinasa. En este dominio radica una diferencia fundamental entre IRAK-1 y 4 con respecto a IRAK-2 y M. Sólo en las dos primeras el dominio quinasa es funcional, ya que en IRAK-2 y M, existe un cambio en un residuo aminoacídico, crítico para la actividad quinasa (Janssens, *et al*, 2003). De este modo podemos hablar de IRAK-2 e IRAK-M como “pseudoquinasas”.

Describamos con mayor profundidad a cada uno de los miembros de esta familia.

IRAK-1

IRAK-1 está implicada en la activación de NF- κ B mediada por el receptor de IL-1, por diversos TLR y también por el receptor tipo I de TNF α (Thomas, *et al*, 1999). En este sentido, el ratón knock-out para IRAK-1 muestra una reducción significativa, aunque no total, de la actividad NF- κ B (Kanakaraj, *et al*, 1998).

IRAK-1 se recluta por el complejo proteico iniciado en el reconocimiento por parte de los TLR, de su ligando específico. Allí se fosforila por IRAK-4, experimentando también procesos de autofosforilación (Janssens, *et al*, 2003), conociéndose los residuos aminoacídicos críticos para que se dé esa interacción (Neumann, *et al*, 2007). Una vez fosforilada, IRAK-1 se libera del complejo, iniciando la cascada de señalización intracelular, sufriendo una posterior ubiquitinización y degradación (Janssens, *et al*, 2003). Este último proceso se ha explicado como un mecanismo regulador negativo de la activación de NF- κ B (Yamin, *et al*, 1997).

Paradójicamente, se ha descrito la translocación de IRAK-1 al núcleo celular (Bol, *et al*, 2000) implicándose, ante una estimulación con LPS, en la

regulación transcripcional de la IL-10 a nivel del promotor (Huang, *et al*, 2004). Es decir, además de tratarse de una proteína quinasa que media en una cascada de transducción de señal, se ha sugerido que desempeña funciones de transactivador transcripcional.

IRAK-2

IRAK-2 induce la activación de NF- κ B cuando se sobreexpresa ectópicamente (Muzio, *et al*, 1997). Además, su silenciamiento inhibe la activación de NF- κ B inducida por IL-1 (Guo, *et al*, 1999).

Con estos datos, cabría pensar que IRAK-2 presenta una función redundante con IRAK-1. Sin embargo, se ha descrito su interacción con la proteína adaptadora TIRAP/Mal (mencionada en el punto 1.1.b), interviniendo de manera específica, en la cascada de señalización que activa NF- κ B mediada por dicha proteína adaptadora (Fitzgerald, *et al*, 2001).

Por otro lado, IRAK-2 está implicada en la inducción de apoptosis en macrófagos mediada por LPS (Ruckdeschel, *et al*, 2002).

IRAK-M

La IRAK-3 es conocida generalmente como IRAK-M. Adquiere este nombre de su patrón de expresión: se expresa en células mieloides circulantes, en líneas celulares de tipo monocítico como U937 o THP-1 (Wesche, *et al*, 1999), además de en tipos celulares con origen mieloide como son los osteoclastos (Li, *et al*, 2005; Soares-Schanoski, *et al*, 2007). Su vinculación con el linaje mieloide le ha valido el apelativo de IRAK-M.

Su papel en la cascada de señalización, quedó claro con la publicación del fenotipo que mostraba el ratón knock-out para esta pseudoquinasa; estos ratones mostraban una activación exacerbada de la cascada de señalización iniciada por IL-1 y diversos TLR, mostrando una excesiva respuesta inflamatoria (Kobayashi, *et al*, 2002). Estos datos indicaban que IRAK-M desempeña un papel como regulador negativo de la activación de NF- κ B.

Por otra parte, los macrófagos peritoneales de estos ratones no mostraban el fenómeno de tolerancia a endotoxina ("TE"), sugiriendo un papel central de IRAK-M en el desarrollo de este proceso (Kobayashi, *et al*, 2002).

Profundizaremos y discutiremos otros datos publicados sobre IRAK-M más adelante, ya que se trata del elemento crucial de estudio en este trabajo.

IRAK-4

Los ratones knock-out para IRAK-4 carecen de respuesta inflamatoria a IL-1 y a la estimulación de diversos TLR (Suzuki, *et al*, 2002). Este hecho da idea de la importancia de esta proteína en la cascada de señalización.

IRAK-4 fosforila a IRAK-1 y depende estrictamente de su actividad quinasa para activar a NF- κ B, ya que mutaciones en residuos críticos para esta actividad, bloquean la cascada de señalización (Li, *et al*, 2002). Este punto se ha ratificado con experimentos hechos en ratones que presentan una IRAK-4 modificada, carente del dominio quinasa. Estos animales son resistentes a shock séptico inducido por LPS, debido a su incapacidad de producir citoquinas y quimioquinas inflamatorias (Kim, *et al*, 2007).

En humanos, el papel crítico de IRAK-4 en la activación de la respuesta inmune innata, queda reflejado en la observación de pacientes con infecciones recurrentes, debido a mutaciones en esta quinasa (Medvedev, *et al*, 2003) o a su deficiencia genética (Day, *et al*, 2004; Chapel, *et al*, 2005; McDonald, *et al*, 2006).

La Figura I3 resume las funciones en que están implicadas las diferentes IRAK. En la Figura I4, encuadrado en color amarillo, puede verse un esquema de la participación de IRAK-1 e IRAK-4 en la señalización iniciada por el TLR4.

1.1.f) Respuesta inflamatoria generada por el sistema inmune innato.

Como hemos visto hasta ahora, tras el reconocimiento de ligandos específicos por sus correspondientes receptores, se inician diferentes vías de señalización intracelular. Ésto conduce a la activación de cascadas de proteínas quinasas, que en último término activan factores de transcripción, generando una respuesta inflamatoria por parte de células del sistema inmune innato.

Dentro de las cascadas y factores de transcripción importantes para esta respuesta, se encuentran el AP-1 (del inglés “Activation Protein – 1”), los IRF (del inglés “Interferon Response Factor”), las MAPK (del inglés “Mitogen

Activated Protein Kinases”), y el NF- κ B (Zhong, *et al*, 2006). A modo de ejemplo, la participación de estos factores de transcripción como respuesta a la activación de TLR4, aparece representada en la Figura I4, recuadrado en color rosa.

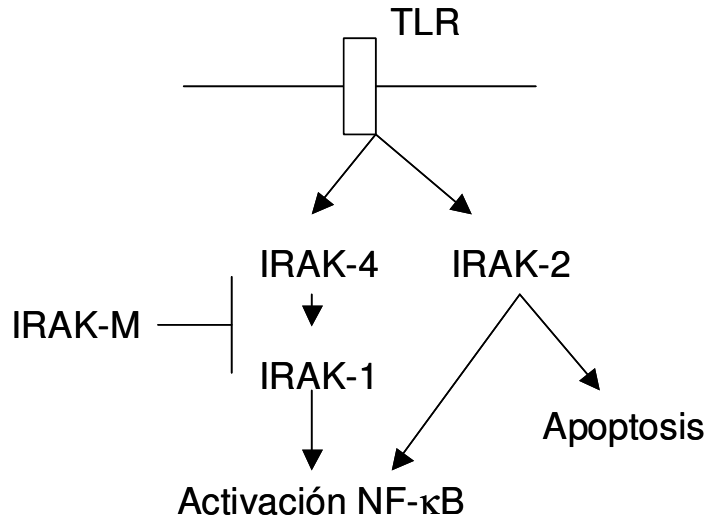


Figura I3. Resumen esquemático de los procesos en que intervienen las diferentes Interleukin-1 Receptor Associated Kinases.

IRAK-1 interviene en la activación de NF- κ B. IRAK-2 media también en esa actividad, además de en la inducción de apoptosis. IRAK-4 actúa en la activación por fosforilación de IRAK-1. IRAK-M presenta una función represora de la actividad NF- κ B, actuando teóricamente a nivel de las IRAK-1 y/o IRAK-4. (Modificada de Huang, *et al*, 2005).

La activación de estos elementos concluye en la expresión de diferentes citoquinas inflamatorias como el TNF α (del inglés “Tumor Necrosis Factor α ”), IL-1, IL-6 o IL-12 (Zhang, *et al*, 2005), indicado en la Figura I4 recuadrado en color verde.

La importancia del TNF α en la respuesta del sistema inmune innato es crucial. Se trata de una citoquina inflamatoria producida principalmente por monocitos y macrófagos con función bactericida y tumoricida, además de ser inmunoestimuladora (Locksley, *et al*, 2001). El importante efecto inmunomodulador del TNF α queda reflejado en diferentes procesos. Por ejemplo, en su capacidad inductora de NF- κ B, creando un mecanismo de autoregulación positiva de la respuesta inmune (Neurath, *et al*, 1998). O en cómo su bloqueo o el de sus receptores específicos, logra revertir el efecto letal inducido por la supresión de elementos de la maquinaria de señalización del NF- κ B (Hayden, *et al*, 2006).

Dentro de la respuesta inmune innata, podemos diferenciar una doble funcionalidad. De un lado, la defensa primaria propiamente dicha contra la agresión inductora de la respuesta. Pero también la regulación y modulación de la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo, con la producción diferencial de la citoquina inductora de respuestas Th1, IL-12 (Puccetti, *et al*, 2002).

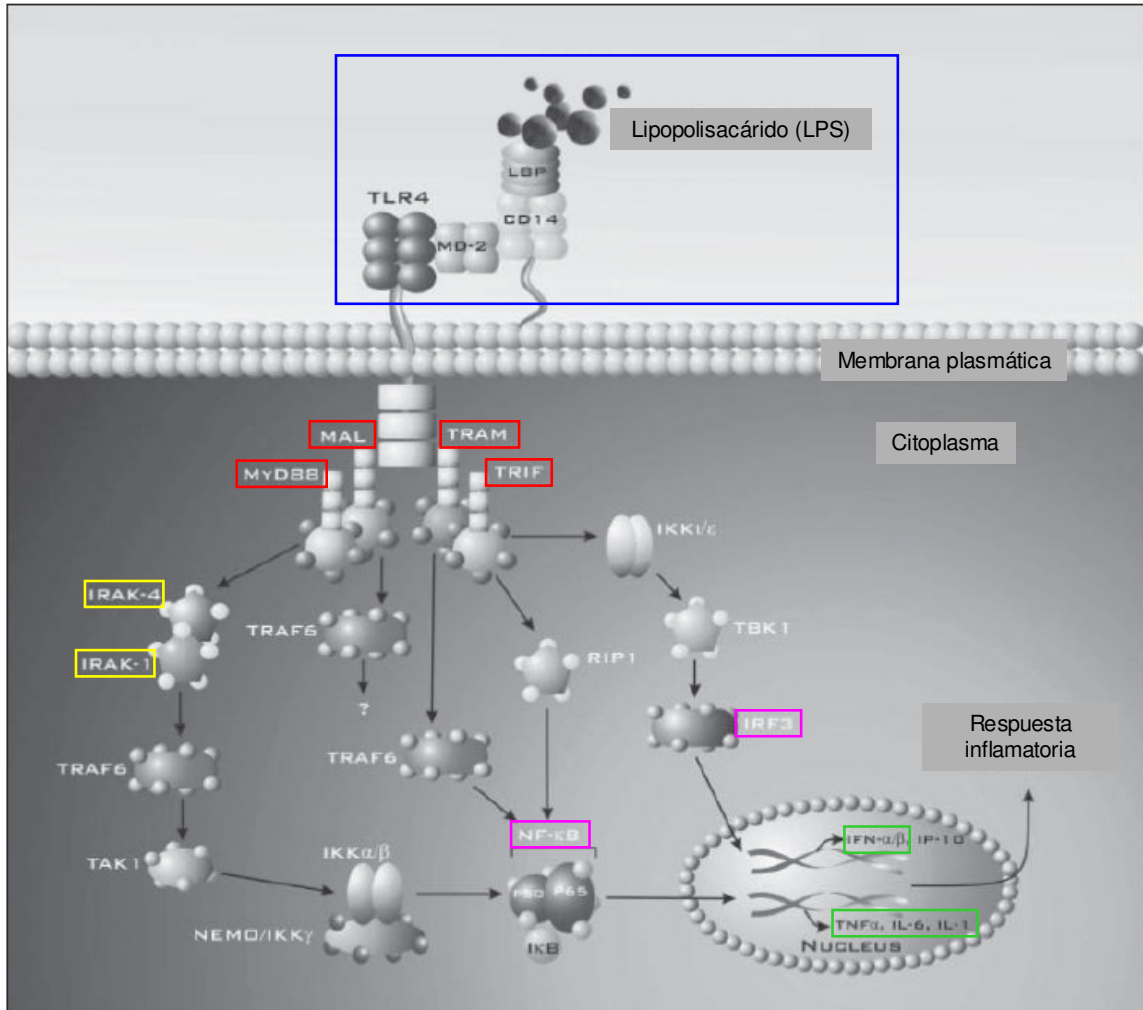


Figura 14. Esquema general de los elementos implicados en el reconocimiento del lipopolisacárido por parte del Toll-like Receptor 4, y su cascada de señalización intracelular.

El recuadro azul engloba el complejo proteico formado para que se dé el reconocimiento específico del LPS. Los recuadros rojos indican proteínas adaptadoras. Los amarillos, encuadran proteínas de la familia de las IRAK. En color rosa se destacan factores de transcripción. Los marcos verdes indican citoquinas inflamatorias producidas en respuesta al LPS. El resto de elementos indicados en la figura intervienen en la cascada de señalización, pero con el objetivo de simplificar, no han sido mencionados en el presente trabajo. (Modificada de Verstak, *et al*, 2007).

Si bien, en lo que a la respuesta innata primaria se refiere, tan importante es su activación, como la capacidad de frenar esa respuesta a

tiempo. En este sentido, el fenómeno de tolerancia juega un papel clave evitando una respuesta inflamatoria exagerada (Broad, *et al*, 2006), cuyo reflejo clínico es la entrada en shock y fallo multiorgánico (López-Bojorquez, *et al*, 2004).

1.2 TOLERANCIA

El fenómeno de tolerancia puede definirse como el proceso por el cual, repetidas exposiciones del sistema inmune innato a un agente proinflamatorio, ocasionan una disminución de la respuesta, representada generalmente en una reducción en la producción de citoquinas inflamatorias (Prud'homme, 2004; Broad, *et al*, 2006; López-Collazo, *et al*, 2006). La literatura muestra cómo este proceso se ha estudiado principalmente desde el punto de vista de la "TE", sin embargo la vinculación entre procesos inflamatorios y cáncer (De marzo, *et al*, 2007; Okamoto, *et al*, 2007) está orientando cada vez más las investigaciones hacia el estudio de la tolerancia a tumores ("TT").

El significado biológico de este proceso viene dado por el hecho de que las citoquinas inflamatorias, además de su función bactericida y tumoricida, presentan sistemas de autoregulación positiva, de modo que su liberación, potencia la producción de mayores cantidades de citoquinas (Kobayashi, *et al*, 2004). La entrada en estados de tolerancia, evita este fenómeno de "perpetuación", que presenta una incidencia clínica creciente en forma de shock (Vincent, *et al*, 2007).

La contrapartida que muestra este proceso en el caso de la "TE", es la permisibilidad que supone a sucesivas infecciones debido a que la respuesta inmune no es efectiva, hasta el punto de que existen autores que postulan la inmunoestimulación como estrategia terapéutica en la sepsis (Pugin, 2007). Sin embargo en un contexto tumoral, existe una tendencia a lograr "mimetizar" el proceso de tolerancia terapéuticamente, intentando con ello evitar los fenómenos inflamatorios asociados al comienzo de determinados cánceres (Calzado, *et al*, 2007).

Cabe destacar que los procesos de tolerancia presentan una importante relevancia clínica, con presencia tanto en pacientes aquejados de sepsis

(Benjamin, *et al*, 2004; West, *et al*, 2007), como en diagnosticados con determinados cánceres (Siedlar, *et al*, 2005).

1.2.a) Mecanismos implicados en la tolerancia.

Inicialmente el proceso de tolerancia era considerado como una inmunosupresión o inmunoparálisis, es decir, una carencia de respuesta al estímulo inductor (Karp, *et al*, 1998; Wolk, *et al*, 2000; Yadavalli, *et al*, 2001). Sin embargo, actualmente se considera un proceso de reprogramación de la respuesta, existiendo numerosos mecanismos moleculares que se activan cuando se da este fenómeno (Fan, *et al*, 2004; Kobayashi, *et al*, 2004; Cavaillon, *et al*, 2006).

Indicaremos a continuación algunos ejemplos de mecanismos descritos implicados en los procesos de tolerancia, como muestra de la mencionada reprogramación de la respuesta inmune innata.

Un mecanismo clásico es la aparición de factores solubles que supriman la respuesta inmune. La producción autocrina de la citoquina inmunomoduladora IL-10 es un ejemplo paradigmático (Grütz, 2005). La neutralización de la citoquina con anticuerpos bloqueantes durante una primera exposición a LPS, supone la producción normal de TNF α con una reexposición a la endotoxina (Randow, *et al*, 1995). Si bien, los ratones knock-out para IL-10 aún muestran el fenómeno de “TE” (Berg, *et al*, 1995), lo que indica que existen mecanismos alternativos en el desarrollo del proceso tolerante.

En el contexto de la “TT”, también se da el mecanismo de liberación de factores inmunosupresores. Factores solubles liberados por células de glioma, inducen la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) en macrófagos, mediante la activación de una enzima clave en su síntesis, la ciclooxigenasa-2. La producción autocrina de PGE₂, genera una respuesta atenuada por parte de los macrófagos, produciendo cantidades reducidas de TNF α e IL-12 (Nakano, *et al*, 2006).

Otro posible mecanismo es la activación de determinadas actividades enzimáticas que intervienen en las cascadas de transducción de señal. Por ejemplo, la actividad PI3K (del inglés “Phosphatidyl Inositol 3’- Kinase”) se ha vinculado con la regulación negativa de la señalización intracelular iniciada por los TLR (Fukao, *et al*, 2002), actuando en una fase temprana de dicha

señalización (Fukao, *et al*, 2003). El bloqueo de dicha actividad con inhibidores específicos, inhibe la inducción de tolerancia al LPS, sugiriendo su implicación en el desarrollo de “TE” (Peck, *et al*, 2006).

El presente trabajo se centra en el estudio de la implicación de IRAK-M en los procesos de “TE” y “TT”, lo que puede suponer un nuevo mecanismo de reprogramación de la respuesta inmune innata.

1.3 IRAK-M

La IRAK-M fue inicialmente descrita como un miembro de la familia de las IRAKs, carente de actividad quinasa, expresada principalmente en células de origen mononuclear y con capacidad de asociarse a IRAK-1 (Wesche, *et al*, 1999). Estas características son compartidas en humanos y roedores (Rosati, *et al*, 2002).

Funcionalmente, IRAK-M se ha descrito como un regulador negativo de la señalización inducida por diversos TLR, no induciéndose el proceso de “TE” en ratones knock-out para este gen (Kobayashi, *et al*, 2002). Estos datos orientaron el estudio de esta pseudoquinasa hacia su implicación en diversos procesos de tolerancia, tal y como se detalla a continuación.

La IRAK-M se ha implicado en el desarrollo de tolerancia a peptidoglucano (PGN), componente mayoritario de la pared de bacterias Gram positivas, aunque también aparece en la de bacterias Gram negativas. El principal receptor de este agente es TLR2 (Akira, *et al*, 2006). Se ha descrito que altas concentraciones de PGN generan tolerancia a un estímulo posterior a la misma toxina, induciendo IRAK-M. El bloqueo de la expresión de la pseudoquinasa mediante un ARN de interferencia, eliminó el proceso de tolerancia (Nakayama, *et al*, 2004). Un efecto similar se observó cuando el estímulo fue el lipo-arabinomano de la pared de *Mycobacterium tuberculosis* (Pathak, *et al*, 2005).

En la misma línea, IRAK-M se ha vinculado con el efecto inmunosupresor del neuropéptido α -MSH (del inglés “ α -Melanocyte-Stimulating-Hormone”). La estimulación de MØ de la línea J774A.1 con α -MSH y LPS, muestra una producción reducida de óxido nítrico e IL-12 con respecto a

un estímulo sólo con LPS. Durante ese proceso se induce IRAK-M y aparece unida a IRAK-1 (Taylor, 2005).

En general, la IRAK-M parece estar asociada a diversos procesos, tanto fisiológicos como patológicos, donde se dan fenómenos de tolerancia. En estos procesos puede mediar tanto una inducción como una expresión deficiente de la pseudoquinasa.

Por ejemplo, la IRAK-M está vinculada a la “TE” que se da de manera fisiológica en células epiteliales intrahepáticas. Estas células están expuestas al LPS procedente de la microbiota intestinal vía vena portal o bilis. Sin embargo esa endotoxina no induce una respuesta inflamatoria, mediando la activación de la expresión de IRAK-M (Harada, *et al*, 2006).

Con respecto a procesos patológicos, por ejemplo, está vinculada al desarrollo de asma (Balaci, *et al*, 2007). En la misma línea, la sobreexpresión de IRAK-M en la “TE” generada en tejido pulmonar durante procesos sépticos, y su implicación en este proceso, se ha demostrado en base a ratones knock-out para la pseudoquinasa (Deng, *et al*, 2006). Por el contrario, la producción exagerada de TNF α en respuesta a LPS, observada en monocitos aislados de pacientes con cirrosis avanzada, está asociada con una reducción en la expresión de IRAK-M (Tazi, *et al*, 2006). En síndromes coronarios agudos se ha detectado su expresión, asociada al desarrollo de tolerancia (del Fresno, *et al*, 2007).

Esta pseudoquinasa también está vinculada a procesos osteoporóticos; los osteoclastos de ratones knock-out para la IRAK-M, muestran mayor vida media y mayor activación, desarrollando una osteoporosis severa (Li, *et al*, 2005). De hecho, se ha descrito que un mecanismo implicado en la osteoporosis inducida por glucocorticoides, es la reducción en la expresión de IRAK-M (Soares-Schanoski, *et al*, 2007).

El mecanismo por el cual IRAK-M actúa bloqueando la cascada de señalización no se conoce aún. Un minucioso análisis estructural y evidencias indirectas, sugieren que IRAK-M potencia la unión del complejo MyD88/IRAK-1/IRAK-4, evitando la disociación de dicho complejo y por ello, la iniciación de la cascada de señalización (López-Collazo, *et al*, 2006). Profundizando en su mecanismo de actuación, IRAK-M parece ejercer su efecto de manera específica sobre la vía de activación de las MAPK (p38 en concreto),

describiéndose su translocación del núcleo celular al citoplasma tras una estimulación con ligandos de TLR2 (Su, *et al*, 2007).

En el presente trabajo, hemos estudiado la implicación de IRAK-M en los procesos de “TE” y “TT”, aplicado tanto a modelos *in vitro* como a patologías asociadas al desarrollo de ambos procesos tolerantes. Además, hemos profundizado en los mecanismos que subyacen en el desarrollo de estos fenómenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.- Materiales y métodos.

2.1.- Reactivos.

Todos los reactivos utilizados, se compraron a las siguientes casas comerciales: Merck (Darmstadt, Alemania), Boehringer (Mannheim, Alemania), y Sigma (San Luis, MO, EEUU). En todos los casos, los reactivos adquiridos fueron de la mayor calidad disponible.

Los medios de cultivo utilizados según procediera por el tipo celular, fueron el DMEM (Dulbecco's MEM) y el RPMI, ambos de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). En todos los casos, los medios estaban suplementados con 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Ambos antibióticos, también procedían de Invitrogen. Todas las soluciones y medios de cultivo estaban libres de contaminación por LPS, testándolo por el test de limulus, utilizando el Limulus Amebocyte Lysate kit de Cambrex (East Rutherford, NJ, EEUU).

El LPS utilizado se aisló de *Salmonella abortus*, y fue donado por los doctores Chris Galanos y Manuel Modollel, del Max Planck Institute für Immunobiologie de Freiburg, Alemania. El inhibidor de la actividad PI3K, LY294002, se compró a Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

2.1.a) Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en el presente trabajo, su tipo, especie de procedencia, y empresa suministradora se muestran en la Tabla M1.

Anticuerpo	Tipo	Especie	Empresa
Anti-IRAK-M	Policlonal	Conejo	Chemicon International (Temecula, CA, EEUU)
Anti-CD14-FITC	Monoclonal conjugado a FITC	Ratón	Cymbus Biotechnology (Chandlers Fod, RU)
Anti-β-Actina	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-TLR2	Monoclonal	Ratón	
Anti-TLR4	Monoclonal	Ratón	
Anti-CD44	Monoclonal	Ratón	Immunotools (Friesoythe, Alemania)

Tabla M1. Anticuerpos utilizados.

2.2.- Cultivos celulares.

Todos los datos mostrados en el presente trabajo, se obtuvieron a partir del estudio del comportamiento de MØ humanos, aislados desde buffy coats o sangre periférica. En ambos casos, se realizó un paso inicial de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), y una posterior purificación de MØ.

2.2.a) Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

Partiendo de buffy coats y sangre periférica extraída de donantes sanos o diversos pacientes, aislamos CMSP por centrifugación en gradiente de densidad, utilizando el reactivo Ficoll-Hypaque Plus de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU). Del total de CMSP, dependiendo de la finalidad prevista, purificamos MØ por dos métodos diferentes que especificamos a continuación.

2.2.b) Purificación de monocitos / macrófagos por adherencia.

En el caso de utilizar buffy coats para experimentos *in vitro* o sangre periférica de pacientes con sepsis, purificamos MØ por el siguiente método. Una vez obtenidas las CMSP, las cultivamos durante dos horas en DMEM a una densidad de 5×10^6 células/ml. Después de este periodo, se aspiraron los sobrenadantes, arrastrando las células no adheridas. Las adheridas se lavaron 3 veces con solución tampón PBS, y se cultivaron en el mismo tipo de medio, suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), comprado a Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). Se dejaron reposar durante 16 horas, y posteriormente, se iniciaron los tratamientos oportunos.

Los cultivos se testaron con respecto a su homogeneidad, analizando la expresión superficial del marcador CD14 por citometría de flujo. Las células adheridas expresaban el marcador en un $(89 \pm 2.3 \%)$ (Media \pm Desviación Estándar; $M \pm DE$).

2.2.c) Purificación magnética de monocitos / macrófagos de sangre periférica.

Partiendo de sangre periférica de pacientes con diversos tumores, realizamos una purificación magnética de MØ en base al marcador CD14. En este caso, los MØ humanos se aislaron utilizando el sistema de separación positiva LS-positive Separation Column System de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania), con un anticuerpo anti-CD14 conjugado con “perlas” magnéticas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras el aislamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se sometieron a los tratamientos oportunos.

Analizamos la pureza de la población obtenida por citometría de flujo, marcando las células con un anticuerpo anti-CD14 conjugado, observando que el (94 ± 3.1 %) ($M \pm DE$) de la población obtenida expresaba este marcador.

2.2.d) Cultivo de líneas celulares, fibroblastos y linfocitos primarios.

En el presente trabajo se han usado las líneas celulares indicadas en la Tabla M2, siempre de origen humano, obtenidas todas ellas de la American Type Culture Collection. En todos los casos, se testaron contra posibles contaminaciones por Micoplasma.

Nombre	Procedencia
A431	Carcinoma epidérmico
MCF7	Carcinoma de mama
HL60	Leucemia promielocítica
Jurkat	Leucemia de células T
HepG2	Hepatoblastoma
HeLa	Tumor de cervix

Tabla M2. Líneas celulares utilizadas.

Los cultivos primarios de fibroblastos humanos se obtuvieron según el método publicado previamente por Soma, *et al*, 1989.

Los linfocitos primarios se obtuvieron a partir de la fracción de células no adheridas, obtenida por el método de purificación de MØ por adherencia (ver

punto 2.2.b). Estas células se mantuvieron durante 16 horas en DMEM suplementado con 10 % de SFB. Tras este cultivo, las células no adheridas presentes en el sobrenadante se consideraron linfocitos.

2.3.- Tratamientos

Los cultivos de MØ humanos sobre los que se realizaron los diferentes tratamientos, siempre se realizaron en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB.

2.3.a) Tratamientos con lipopolisacárido.

Los tratamientos con LPS, salvo cuando se indique lo contrario en el texto, se realizaron a una dosis de 10 ng/ml.

En el modelo de "TE", los MØ humanos se pre-trataron durante 24 horas con 10 o 100 ng/ml de LPS o se incubaron en medio. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se reestimularon con 100 ng/ml de la endotoxina, siempre y cuando fuera necesario. El tiempo de estimulación de este segundo tratamiento varía según el parámetro a valorar, y aparece indicado en cada caso en los pies de figura.

2.3.b) Co-cultivos y posterior aislamiento de monocitos / macrófagos humanos.

MØ humanos se co-cultivaron con las diferentes líneas celulares indicadas en la Tabla M2, con linfocitos autólogos o con fibroblastos primarios heterólogos, a una proporción de 1:0.3 (MØ:línea celular) durante los tiempos indicados en las figuras correspondientes. En los casos indicados, los co-cultivos se realizaron utilizando células fijadas previamente con 4 % de paraformaldehído.

Después de las incubaciones oportunas, se recolectaron todas las células y se aislaron magnéticamente aquellas que expresaban el marcador CD14, siguiendo el mismo proceso indicado en el punto 2.2.c. Seguidamente, se sometió a la población celular aislada a los tratamientos oportunos, ya sean un nuevo cultivo, co-cultivo o extracción de material genético / proteico.

2.3.c) Diseño y transfección de ARN de interferencia contra IRAK-M.

El diseño de los ARN de interferencia específicos lo llevó a cabo Ambion (Austin, TX, EEUU). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue:

5' GGA GAU GGG ACA UCG UCG ATT 3'

5' UCG ACG AUG UCC CAU CUC CTG 3'

Cultivos de MØ humanos se transfectaron con el ARN de interferencia o con un ARN control irrelevante suministrado por Ambion. La concentración máxima de ARN utilizada en las transfecciones fue de 25 nM, por encima de la cual, presenta efectos tóxicos para las células. Para este proceso se utilizó el Silencer siRNA Transfection kit, también de Ambion, siguiendo las indicaciones del fabricante. Utilizamos como “portador” el reactivo Lipofectamine 2000 de Invitrogen. Las células se incubaron en DMEM libre de antibióticos, suplementado con 3 % de SFB durante 20 horas después de la transfección. Posteriormente, se sometieron a los tratamientos oportunos indicados en las correspondientes figuras.

2.4.- Selección de pacientes.

En todos los casos, se obtuvo informe consentido de los pacientes incluidos en este trabajo. Estos estudios fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital “La Paz”.

2.4.a) Pacientes con sepsis.

Partimos de nueve pacientes, con edades de (51 ± 12) años ($M \pm DE$), admitidos de manera consecutiva en la Unidad de Medicina Interna del Hospital “La Paz”. Todos ellos mostraban bacteriemia microbiológicamente confirmada (cultivos de sangre positivos para *Escherichia coli*), secundaria a una infección del tracto urinario, reuniendo los criterios diagnósticos para sepsis definidos por consenso clínico (Bone, *et al*, 1992; Levy, *et al*, 2003). Las muestras de sangre periférica se tomaron dentro de las 48 horas después de la extracción para los cultivos, momento en que se reunían los criterios de sepsis por vez primera.

El grupo de donantes sanos, lo formaron 10 voluntarios con edades de (49 ± 12) ($M \pm DE$) años.

Se impusieron los siguientes criterios de exclusión: enfermedades de origen tumoral o de inflamación crónica, tratamientos con esteroides o medicamentos inmunosupresores durante el último mes. Fallo hepático (niveles en suero de aspartato aminotransferasa y / o alanina aminotransferasa > 100 UI/ml; tiempo de protrombina < 60 %; nivel total de bilirrubina > 60 μ mol/l). Insuficiencia renal (niveles de creatinina en plasma > 200 μ mol/l). Infección por VIH-1, virus de las hepatitis B o C, gestación y edad superior a 70 años.

2.4.b) Pacientes con diversos tumores.

Los datos incluidos en este trabajo en lo que a pacientes con tumores se refiere, hacen referencia por un lado, a un grupo de seis pacientes con edades de (29 ± 4) (M \pm DE) años. Estos pacientes fueron admitidos consecutivamente en la Unidad de Hematología del Hospital “La Paz” y diagnosticados con leucemia mieloide crónica, confirmada por el test BCR/ABL (Osarogiagbon, *et al*, 1999). También se incluyeron dos pacientes (edad (56 ± 5) (M \pm DE) años) admitidos en la Unidad de Medicina Interna del mismo hospital, con carcinoma gástrico diseminado en el peritoneo, hígado, sangre y pulmón. Se estudiaron además, dos pacientes con tumor de colon localizado, admitidos en la Unidad de Oncología (edad (58 ± 2) (M \pm DE) años).

El grupo control consistió en 10 voluntarios sanos con edades de (40 ± 12) (M \pm DE) años.

Se impusieron los mismos criterios de exclusión que en el caso de los pacientes con sepsis (ver punto 2.4.a), excluyendo las enfermedades de origen tumoral, por ser justamente el objeto de estudio.

2.5.- Aislamiento de ARN y proteínas.

Después de cada uno de los tratamientos impuestos a los cultivos de MØ humanos, se lavaron tres veces con solución tampón PBS. Obtuvimos el ARN total de estas células utilizando el reactivo TRI-Reagent de Sigma (San Luis, MO, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ARN aislado fue tratado con DNAsa I libre de RNAsas de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), obteniendo la muestra de ARN de partida para sintetizar ADN

complementario. Previamente, fue cuantificado por espectrofotometría ultravioleta.

El reactivo TRI-Reagent permite aislar de una misma muestra biológica, ARN, ADN y proteínas. Purificamos la fracción proteica, siguiendo las indicaciones proporcionadas por Sigma. Los precipitados proteicos finales, se disolvieron en una solución de SDS al 1 %. Finalmente, cuantificamos las proteínas obtenidas utilizando el kit BCA Protein Assay de Pierce (Rockford, IL, EEUU).

2.6.- Cuantificación del ARN mensajero.

Partiendo de 1 µg de ARN libre de ADN obtenido según el punto anterior, sintetizamos ADN complementario utilizando el kit First-strand cDNA synthesis de Roche (Palo Alto, CA, EEUU), en base a oligonucleótidos poli(T).

Los niveles de expresión de cada uno de los genes estudiados en el presente trabajo, se analizaron en ese ADN complementario en reacciones de PCR cuantitativa (PCR-Q) en tiempo real. Para ello utilizamos el sistema LightCycler de Roche. Las reacciones de PCR-Q se realizaron utilizando el kit Fast-Start DNA Master SYBR Green system, también de Roche y los cebadores específicos detallados en la Tabla M3. Todos los cebadores fueron sintetizados, desalados y purificados mediante HPLC por Bonsai Biotech (Alcobendas, Madrid), excepto los correspondientes al ARN ribosómico 18S, que se adquirieron a Ambion (Austin, TX, EEUU).

Gen	Cebador Sentido (5' → 3')	Cebador Antisentido (5' → 3')
IRAK-M	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA	GCATTGCTTATGGAGCCAAT
TNF α	GCCTCTTCTCCTTCCTGATCGT	CTCGGCAAAGTCGAGATAGTCG
β -ACTINA	AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	TCCACATCTGCTGGAAGGTGG
18S	QuantumRNA Classic 18S de Ambion (Austin, TX, EEUU)	

Tabla M3. Secuencia de los cebadores utilizados en PCR cuantitativa.

Los resultados obtenidos para cada uno de los genes analizados, se normalizaron con respecto a la expresión del gen codificante para la β -actina o el ARN ribosómico 18S.

El número de copias de ADN complementario de cada uno de los genes de interés, se determinó usando una curva estándar de siete puntos específica para cada gen. Los coeficientes de correlación (r^2) de estas curvas, para ser aceptadas como válidas fueron siempre > 0.98 . Las curvas se realizaron en paralelo para cada reacción de PCR-Q, además de las muestras en las que se deseaba cuantificar la expresión.

Para confirmar la especificidad de los productos de la reacción en cada experimento, se analizaron los perfiles de “melting” o desnaturalización de cada grupo de muestras, utilizando el LightCycler. Estos perfiles se determinaron manteniendo la reacción a 80 °C durante 10 segundos y entonces, calentando hasta 95 °C a una tasa de calentamiento de 0.1 °C / segundo. A lo largo de este proceso, se medía la fluorescencia emitida de manera continua. Este análisis demostraba que para cada par de cebadores, el producto de la amplificación era un único amplicón.

Al finalizar cada reacción de PCR-Q, los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa, tiñéndolos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y observándolos por transiluminación ultravioleta. En todos los casos se verificó que para cada par de cebadores, el producto de amplificación era una única banda del tamaño esperado.

Gen	Temperatura Hibridación (°C)	Ciclos
IRAK-M	59	95 °C, 10"; 59 °C, 10"; 72 °C, 10"
TNF α	64	95 °C, 10"; 64 °C, 10"; 72 °C, 19"
β -ACTINA	55	95 °C, 10"; 55 °C, 10"; 72 °C, 17"
18S	60	95 °C, 10"; 60 °C, 10"; 72 °C, 10"

Tabla M4. Programas de PCR cuantitativa utilizados para cada para uno de los cebadores.

Cada programa de PCR-Q consiste en 45 ciclos específicos según el par de cebadores, con un paso previo de desnaturalización y activación de la polimerasa de 5 minutos a 95 °C. Los programas de PCR-Q utilizados para cada uno de los cebadores, se muestran en la Tabla M4.

2.7.- Análisis por Western Blot.

Las proteínas obtenidas (ver punto 2.5) se desnaturalizaron por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos en solución tampón Laemmli. Posteriormente se separaron por electroforesis en geles al 12 % de SDS-poliacrilamida, en tampón Tris-glicina-SDS (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina, 0.1 % SDS). Al finalizar la separación, transferimos las proteínas a membranas Immun-Blot PVDF de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU), aplicando una corriente eléctrica de 300 mA durante 1 hora y media a 4 °C.

A partir de este punto, todos los procesos se realizaron en agitación. Las membranas se bloquearon durante una hora con 5 % de leche desnatada disuelta en solución tampón TTBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2 % Tween 20), lavándolas posteriormente tres veces con la misma solución. Después de los lavados, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios oportunos (anti-IRAK-M y anti- β -Actina), diluidos según las indicaciones del fabricante en TTBS, durante 16 horas a 4 °C. Después de tres nuevos lavados con TTBS, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con peroxidasa, durante 45 minutos, de nuevo en TTBS. Posteriormente, se lavaron las membranas tres veces con la misma solución.

Finalmente, detectamos los anticuerpos unidos utilizando el reactivo quimioluminiscente ECL Plus de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8.- ELISA para TNF α .

Los niveles de la citoquina inflamatoria TNF α en medio de cultivo, se valoraron con el kit de inmunoensayo Pelikine Compact human TNF α

suministrado por Sanquin (Amsterdam, Holanda). El límite inferior de detección de este ensayo es de 1 a 3 pg/ml.

2.9.- Ensayos de apoptosis.

Al finalizar cada uno de los experimentos mostrados en el presente trabajo, partiendo de una pequeña alícuota de MØ humanos, determinamos el grado de apoptosis / necrosis.

Para ello, utilizamos el kit Annexin V-FITC / PI Apoptosis kit de Oncogene (Cambridge, MA, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Marcamos las células, y analizamos la expresión de anexina V y yoduro de propidio en un citómetro de flujo BD FACSCalibur de Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ, EEUU).

En todos los casos, y para considerar que los tratamientos no afectaban a la viabilidad celular, el porcentaje de células apoptóticas fue inferior al 3 %, sin existir diferencias significativas entre los tratamientos impuestos, y el control sin tratar de cada experimento.

2.10.- Análisis estadísticos.

El número de réplicas para cada uno de los experimentos realizados fue de tres en los casos de análisis de expresión transcripcional, y de dos en los casos de análisis de expresión proteica, ya sea por ELISA o por *Western blot*.

Para cada experimento donde analizamos la expresión de diversos genes por PCR-Q, partíamos de los datos arrojados por las tres réplicas para calcular las medias y desviaciones estándar. En el caso de estudiar la expresión proteica por ELISA, utilizamos los datos proporcionados por las dos réplicas. Con estos parámetros, aplicando el estadístico *T* de Student, consideramos una significación estadística en las diferencias de expresión observadas, para valores de $p < 0.05$. Esta significación se indica en las figuras con (*).

En los casos de experimentos en base a la técnica de *Western blot*, se muestra el resultado de uno de los dos geles realizados por experimento, considerado como significativo del efecto observado.

RESULTADOS

3.- Resultados

En el siguiente punto se muestran los datos obtenidos a lo largo de este trabajo, estructurados en tres partes.

En la primera de ellas, realizaremos una introducción general a los modelos de tolerancia, asentando el tipo de experimento genérico que supone este tipo de estudios.

En las dos siguientes partes, aparecen los resultados obtenidos sobre la expresión de IRAK-M en dos modelos de tolerancia concretos, la tolerancia a endotoxina (“TE”) y la tolerancia a tumores (“TT”) respectivamente.

Dentro de cada uno de estos dos apartados, se sigue la misma estructura: presentamos el modelo de tolerancia, el patrón de expresión de IRAK-M en el mismo, los mecanismos implicados en la regulación de esa expresión, para concluir con los resultados obtenidos en patologías asociadas a cada uno de los modelos.

3.1.- Modelo general de tolerancia.

Cuando el sistema inmune innato detecta una agresión, tan importante es su respuesta inflamatoria para luchar contra ese ataque, como el posterior freno de la misma. Una reacción inflamatoria descontrolada, puede causar daños en el propio organismo, reflejándose a nivel clínico como shock séptico (López-Bojorquez, *et al*, 2004).

En los procesos de tolerancia, tras un primer encuentro con el agente causante de la inflamación, la respuesta del sistema inmune innato se ve notablemente atenuada al darse un segundo estímulo. Por ello, los modelos de tolerancia *in vitro*, son una herramienta sumamente útil para estudiar la regulación negativa del sistema inmune innato.

En nuestro caso, todos los estudios se han realizado sobre MØ humanos, como células clave y representativas del mencionado sistema inmune innato. Purificamos estas células desde sangre periférica por adherencia o por separación magnética en base al marcador CD14 (Ver Materiales y métodos).

La estructura general del modelo de tolerancia se esquematiza en la Tabla R1:

Condición Experimental	1er Estímulo	2o Estímulo
Control	-	-
Pre-tratamiento	+	-
Tolerancia	+	+
Tratamiento	-	+

Tabla R1. Estructura general del modelo de tolerancia utilizado “in vitro”. Se representa la estructura general del modelo de tolerancia. Las condiciones experimentales surgen de la implantación (+) o no (-) de cada uno de los dos estímulos que forman el modelo.

El modelo general de tolerancia, está basado en dos estímulos, dando lugar a tres condiciones experimentales y un control en cada experimento.

El primer estímulo, simula el encuentro inicial del sistema inmune innato con el agente causante de una respuesta inflamatoria, mientras que el segundo representa el reencuentro de las células inmunes con dicho agente.

En base a esto, se generan tres condiciones experimentales básicas y un control en cada uno de los experimentos:

- a) Control ⇒ Control de actividad basal; se trata de las células sin estimular.
- b) Pre-tratamiento ⇒ Permite discernir el efecto del primer estímulo. Después del tiempo de incubación requerido en cada experimento, las células se lavan abundantemente para eliminar el agente proinflamatorio, dejándolas reposar en medio de cultivo hasta el final del experimento.
- c) Tolerancia ⇒ Los cultivos son expuestos a los dos estímulos con el agente proinflamatorio. Después de la primera estimulación, las células son lavadas para eliminar dicho agente. Con el segundo estímulo, se inducen las condiciones de tolerancia.
- d) Tratamiento ⇒ Representa el estímulo con el agente causante de la inflamación *per sé*.

El resultado de este modelo lo veremos de forma más concreta en los siguientes puntos del presente trabajo, aplicado al modelo de “TE” y al de “TT”.

3.2.- Expresión de IRAK-M en el contexto de la tolerancia a endotoxina.

3.2.a) Modelo de tolerancia a endotoxina.

En este modelo, el estímulo proinflamatorio es el LPS aislado de la pared celular de bacterias Gram negativas. La estructura del modelo, incluyendo la simbología de cada condición, se muestra en la Tabla R2:

Condición	1er estímulo	Lavado	2o estímulo
Control	Medio	3 x PBS	Medio
Pre-tratamiento (T)	LPS	3 x PBS	Medio
Tolerancia (T+L)	LPS	3 x PBS	LPS
Tratamiento (L)	Medio	3 x PBS	LPS

Tabla R2. Estructura del modelo de tolerancia a endotoxina.

Para comprobar que el modelo reproduce el fenómeno de tolerancia, valoramos la producción de la citoquina inflamatoria TNF α , ya que como se ha comentado (ver punto 1.1.f), se trata de una citoquina clave tanto por su papel efector de la respuesta inflamatoria, como por ejercer un efecto inmunomodulador (Locksley, *et al*, 2001). Testamos su expresión a nivel transcripcional con el segundo estímulo de LPS durante 1 hora (Figura R1.A) y 6 horas (Figura R1.B). También valoramos su liberación al medio de cultivo mediante ELISA transcurridas 24 horas del segundo estímulo (Figura R2).

Como puede comprobarse en ambas figuras (R1 y R2), comparado con la respuesta a un único estímulo de LPS, la producción de TNF α en las condiciones tolerantes, se ve reducida de manera muy significativa. Así, nuestro modelo reproduce el fenómeno de “TE”.

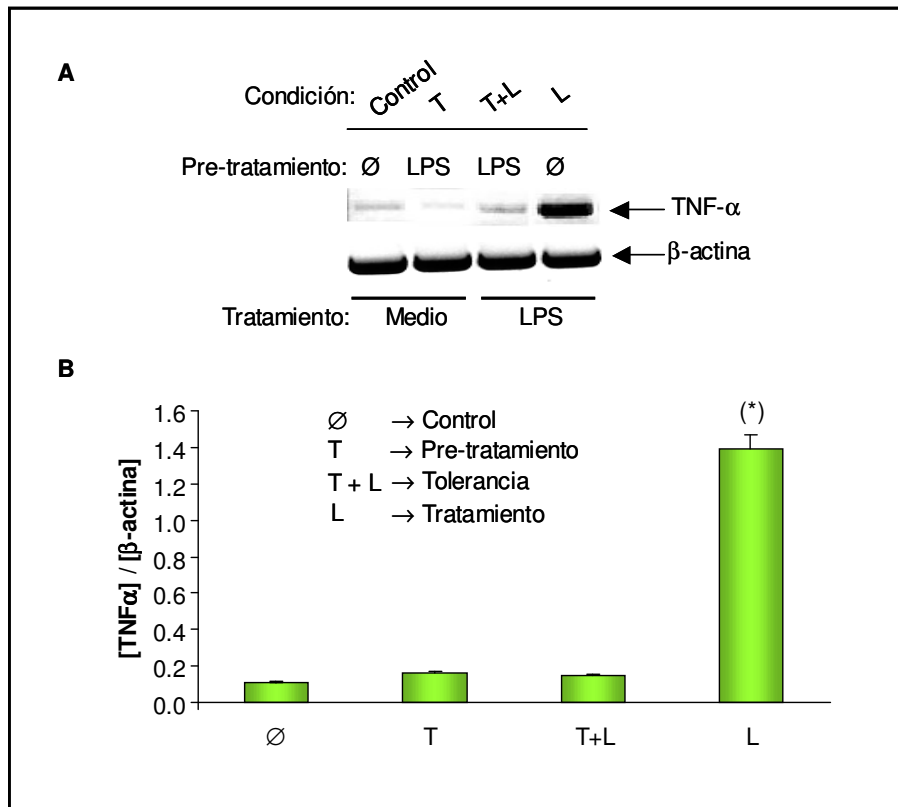


Figura R1. Expresión de TNF α a nivel transcripcional en el modelo de tolerancia a endotoxina.

Cultivos de M ϕ humanos se pre-trataron con LPS o con medio (\emptyset) durante 24 horas, se lavaron tres veces con PBS y se trataron de nuevo con la endotoxina durante 1 hora (**A**) o 6 horas (**B**). Al finalizar los tratamientos, se aisló ARN total y por PCR-Q se valoró la expresión de TNF α y β -actina. (**A**): gel de electroforesis con el producto final de PCR-Q. (**B**): expresión de TNF α medida por PCR-Q, analizando la relación TNF α / β -actina. La leyenda hace referencia a las condiciones experimentales indicadas en la Tabla R2. (*) $p < 0.05$ con respecto al control.

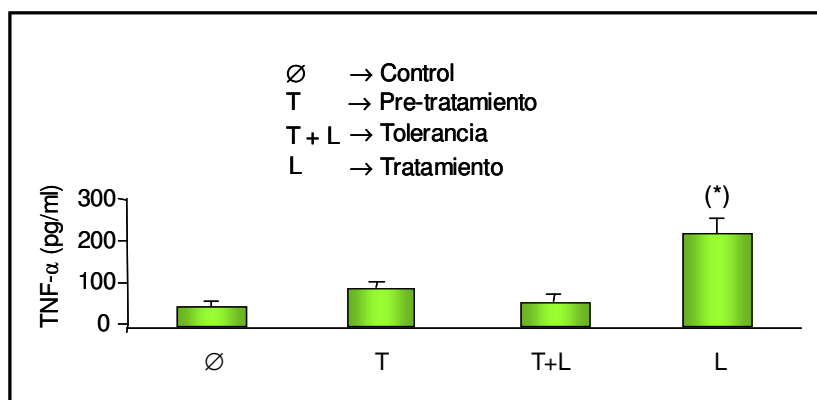


Figura R2. Producción de TNF α en el modelo de tolerancia a endotoxina.

Cultivos de M ϕ humanos se pre-trataron con LPS durante 24 horas, se lavaron tres veces con PBS y se trataron de nuevo con la endotoxina durante 24 horas. Valoramos los niveles de TNF α liberados al medio por los cultivos mediante ELISA. La leyenda hace referencia a las condiciones experimentales indicadas en la Tabla R2. (*) $p < 0.05$ con respecto al control.

Este tipo de experimentos constituye una forma clásica de comprobar la inducción de “TE” en modelos *in vitro* (Rieser, *et al*, 1998; West, *et al*, 2002).

3.2.b) Activación de IRAK-M en el modelo de tolerancia a endotoxina.

Una vez establecido un modelo para estudiar los eventos asociados a la “TE”, procedimos a analizar la evolución del gen codificante para IRAK-M en este modelo. Para ello evaluamos por PCR-Q, la expresión de esta pseudoquinasa en función del tiempo de estimulación con LPS.

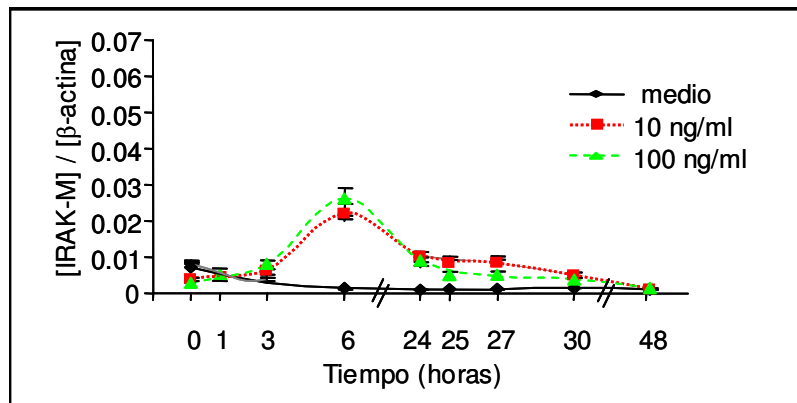


Figura R3. Expresión de IRAK-M en función del tiempo de estimulación con LPS. Cultivos de MØ humanos se estimularon con 10 o 100 ng/ml de LPS durante los periodos indicados. Se aisló ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y β -actina, analizando la relación IRAK-M / β -actina.

Tal y como se aprecia en la Figura R3, los niveles basales de IRAK-M en ausencia de estímulo son muy bajos. Sin embargo, una única exposición a LPS ya sea a 10 o a 100 ng/ml, induce la expresión de IRAK-M con un máximo a las 6 horas del inicio del estímulo. El nivel de expresión alcanzado durante ese máximo fue tres veces superior al basal, el cual se alcanza de nuevo a partir de 24 horas.

Sin embargo, cuando los cultivos pre-estimulados con LPS durante 24 horas, se expusieron de nuevo a la endotoxina, la expresión de IRAK-M se indujo mucho más rápidamente. Así, con sólo una hora del segundo estímulo, se alcanzó un máximo en los niveles de expresión, tres veces superior al máximo de inducción conseguido con una sola exposición (Figura R4).

Por el contrario en el mismo experimento, los cultivos no pre-tratados con LPS, muestran un perfil de expresión de IRAK-M muy similar al observado en el primer experimento mostrado en la Figura R3.

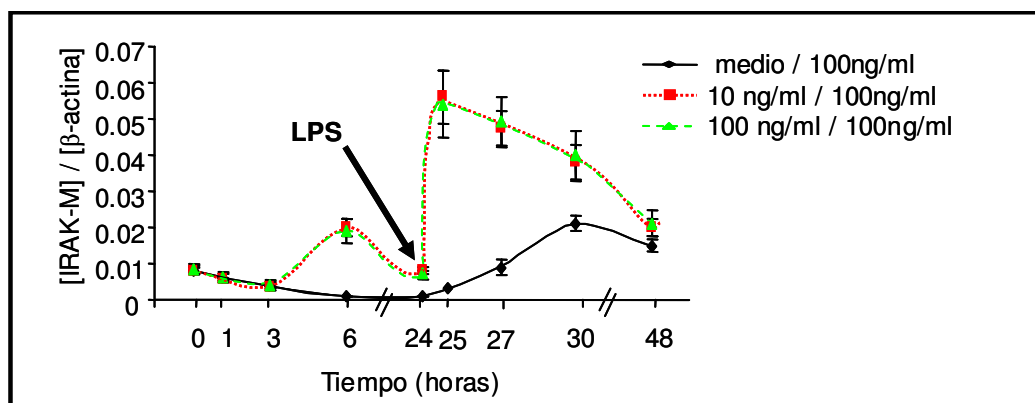


Figura R4. Expresión de IRAK-M en el modelo de tolerancia a endotoxina.

Cultivos de MØ humanos se pre-trataron con las concentraciones indicadas de LPS o se dejaron en medio durante 24 horas, lavándolos después 3 veces con PBS. Posteriormente, los MØ se re-estimularon con 100 ng/ml de LPS, dejándolos en cultivo 24 horas más. A los tiempos indicados, se aisló ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y β -actina, analizando la relación IRAK-M / β -actina.

Con el fin de examinar si esta cinética de expresión acelerada a nivel transcripcional en el modelo de “TE”, se traducía en una rápida aparición de IRAK-M a nivel proteico, realizamos análisis *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra dicha pseudoquinasa.

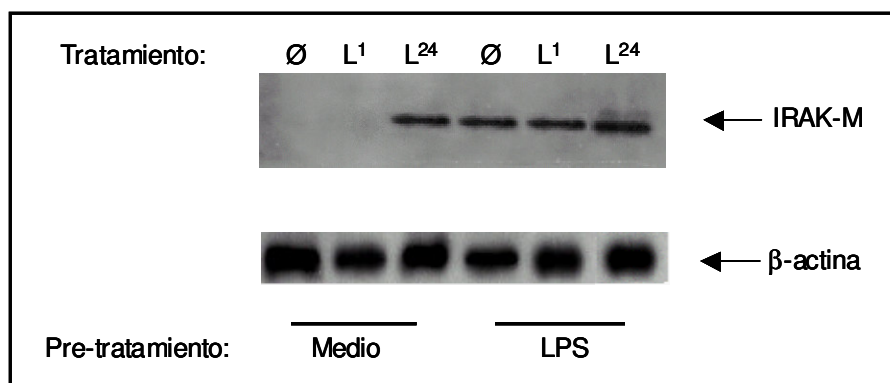


Figura R5. Expresión a nivel proteico de IRAK-M en el modelo de tolerancia a endotoxina.

Cultivos de MØ humanos se pre-trataron con 10 ng/ml de LPS o se dejaron en medio durante 24 horas, lavándolos después 3 veces con PBS. Posteriormente, los MØ se trataron con 100 ng/ml de LPS, durante 1 hora (L¹) o 24 horas (L²⁴). Aislamos las proteínas totales y realizamos análisis *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra IRAK-M y β -actina.

Reflejando lo observado con la expresión de IRAK-M a nivel transcripcional, los niveles proteicos basales y tras una hora de exposición sencilla al LPS, son indetectables (Figura R5); tras 24 horas de estímulo, se observa la aparición de la banda correspondiente a IRAK-M. Sin embargo, en todas las condiciones donde los MØ fueron pre-tratados con LPS, puede observarse la banda específica, incrementándose la cantidad presente transcurridas 24 horas desde el segundo estímulo (Figura R5).

3.2.c) Mecanismos que controlan la activación de IRAK-M.

Una vez demostrada la vinculación entre IRAK-M y los procesos de “TE”, nos propusimos estudiar posibles mecanismos que estuvieran asociados o controlaran la expresión de la pseudoquinasa en este modelo.

3.2.c.i) Vinculación de la actividad fosfatidil inositol 3' - quinasa en la expresión de IRAK-M inducida por LPS.

Con el objetivo de estudiar factores que influyesen en la activación de IRAK-M en el proceso de “TE”, hipotetizamos la existencia de una relación entre la actividad PI3K y la expresión de IRAK-M. Esta hipótesis tiene su fundamento en la descripción de la cascada de señalización mediada por PI3K, como elemento represor temprano de la respuesta inflamatoria (Fukao, *et al*, 2002; Guha, *et al*, 2002). Para testar si existe vinculación entre IRAK-M y PI3K, utilizamos como herramienta el conocido inhibidor específico de la actividad PI3K, LY294002 (Gharbi, *et al*, 2007).

Cultivamos MØ humanos pre-tratados durante una hora con el inhibidor o su disolvente (2% Dimetilsulfóxido, DMSO) como control; posteriormente se estimularon con LPS o se dejaron en medio durante los tiempos indicados en la Figura R6, después de lo cual se valoró la expresión de IRAK-M a nivel transcripcional.

Como se puede apreciar, el pre-tratamiento de los MØ con el inhibidor en ausencia de LPS, no supuso ningún cambio significativo en la expresión de IRAK-M. Sin embargo, en aquellos cultivos pre-tratados con el inhibidor, la exposición al LPS supuso una inducción de la pseudoquinasa más rápida, alcanzándose mayores niveles de expresión que en los MØ pre-tratados con el

disolvente. Estos datos vinculan a la actividad PI3K con la expresión de IRAK-M.

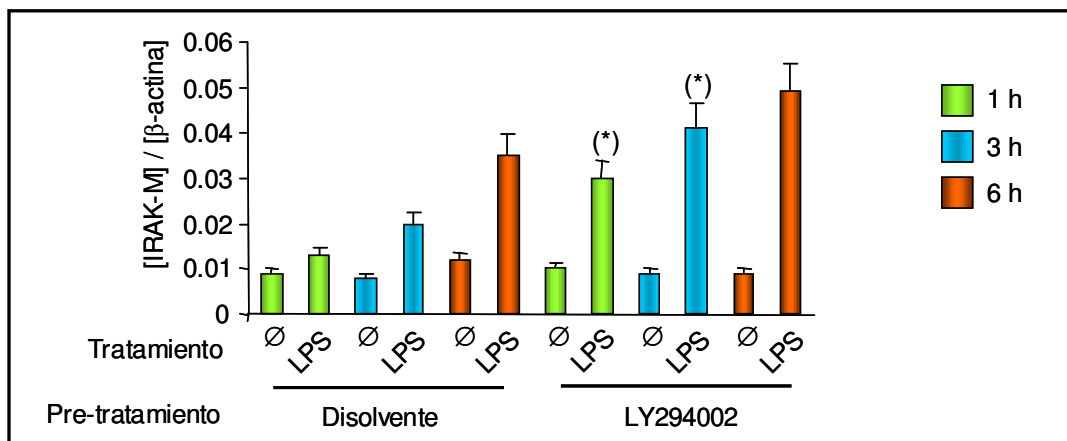


Figura R6. Vinculación entre la actividad fosfatidil inositol 3' - quinasa y la expresión de IRAK-M.

Cultivos de MØ humanos se pre-trataron con 10 μ M del inhibidor de la actividad PI3K, LY294002 o su disolvente (2% DMSO) durante una hora. Seguidamente se expusieron a 100 ng/ml de LPS o se dejaron en medio (Ø). A los tiempos indicados, se aisló ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y β -actina, analizando la relación IRAK-M / β -actina. (*) $p < 0.05$ con respecto a la misma condición pre-tratada con el disolvente.

3.2.c.ii) $TNF\alpha$ induce la expresión de IRAK-M.

Los datos mostrados hasta ahora, indican que la expresión de IRAK-M es posterior en el tiempo a la de $TNF\alpha$ (comparar Figuras R1.A y R3). Considerando este hecho, hipotetizamos que la citoquina inflamatoria podría estar induciendo la expresión de la pseudoquinasa.

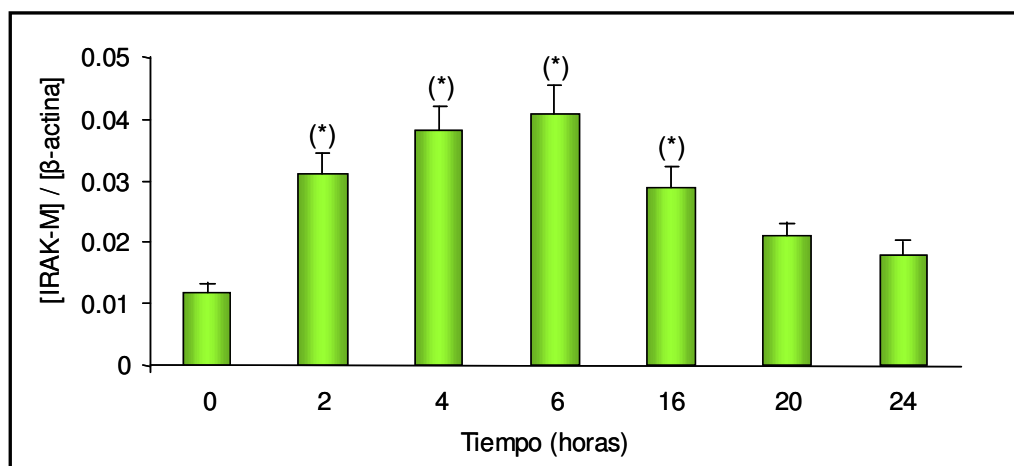


Figura R7. $TNF\alpha$ induce la expresión de IRAK-M.

Cultivos de MØ humanos se expusieron a 2 ng/ml de $TNF\alpha$ durante 24 horas. A los tiempos indicados, se aisló ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y β -actina, analizando la relación IRAK-M / β -actina. (*) $p < 0.05$ con respecto al control inicial.

Para testar esta hipótesis, expusimos MØ a TNF α (2 ng/ml) durante 24 horas, y evaluamos la expresión de IRAK-M. Tal y como se aprecia en la Figura R7, efectivamente el TNF α induce la expresión de IRAK-M. La inducción de la pseudoquinasa se inicia sólo dos horas después de iniciarse el tratamiento con TNF α , alcanzando un máximo de expresión a las 6 horas.

3.2.d) Regulación específica de IRAK-M en monocitos / macrófagos aislados de pacientes con sepsis.

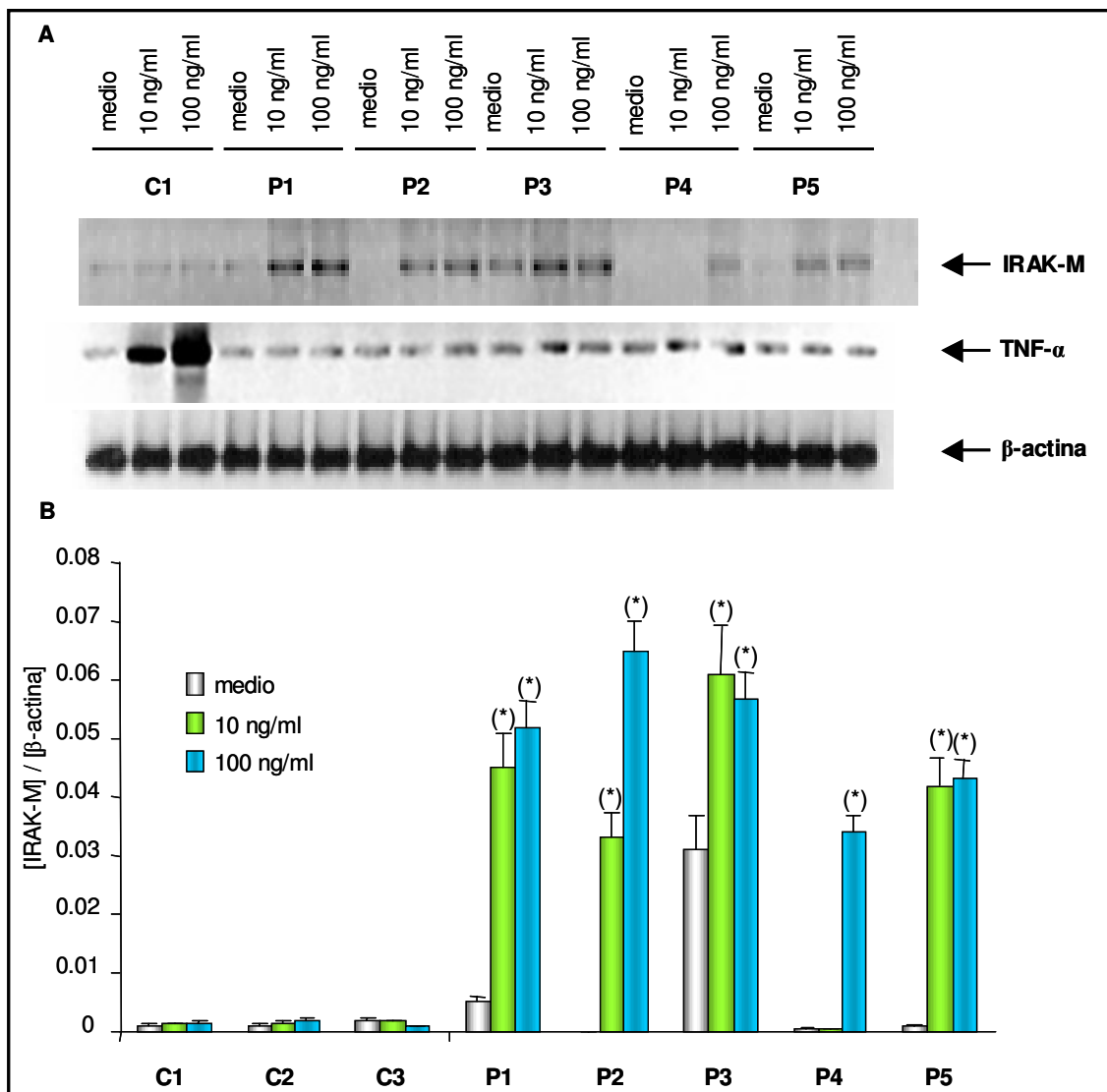


Figura R8. Expresión de TNF α e IRAK-M en monocitos / macrófagos aislados de pacientes sépticos.

MØ aislados de sangre periférica de donantes sanos (Cn) o de pacientes sépticos (Pn), se expusieron *ex vivo* a 10 o 100 ng/ml de LPS durante una hora. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se recolectaron. Aislamos ARN total de estas células y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M, TNF α y β -actina. **(A)**: productos finales de PCR-Q resueltos en un gel de agarosa. **(B)**: Análisis de la relación IRAK-M / β -actina. (*) $p < 0.05$ con respecto a MØ tratados con medio, en el mismo donante / paciente.

Una vez observada la expresión específica mostrada por IRAK-M en el modelo de “TE”, decidimos analizar su comportamiento en MØ aislados de pacientes que sufrían sepsis, patología en la que está descrita la caída en estados de tolerancia (West, *et al*, 2002; Broad, *et al*, 2006).

Aislamos MØ de estos pacientes y los expusimos *ex vivo* a LPS durante una hora, comparando su comportamiento con MØ aislados de donantes sanos. Analizamos la expresión de TNF α a nivel transcripcional, observando que en cinco de los pacientes seleccionados, la exposición al LPS no indujo la expresión de la citoquina inflamatoria. Sin embargo, tanto en los MØ aislados de donantes sanos, como en los obtenidos de los restantes cuatro pacientes incluidos en el estudio, la exposición al LPS indujo una expresión significativa de TNF α (Figura R8). Esto nos permitió definir a los MØ de los cinco primeros pacientes como tolerantes.

Estudiando el comportamiento de IRAK-M, en los MØ de pacientes sépticos tolerantes, el encuentro con LPS indujo rápidamente la expresión de la pseudoquinasa. Sin embargo, no observamos cambios en la expresión de IRAK-M en los MØ obtenidos de donantes sanos.

Es decir, en los MØ tolerantes de pacientes sépticos, se da un patrón de expresión de IRAK-M muy similar al observado en el modelo *in vitro* de “TE”.

3.3. Expresión de IRAK-M en el contexto de la tolerancia a tumores.

Una vez que hemos descrito una regulación específica de IRAK-M en el proceso de “TE”, decidimos testar si esta pseudoquinasa estaba implicada en otro proceso patológico, en el que la tolerancia del sistema inmune innato juega un importante papel (Mytar, *et al*, 2003): la tolerancia a tumores (“TT”).

3.3.a) Modelo de tolerancia a células tumorales.

El estímulo proinflamatorio en este modelo es la exposición de los MØ a células de origen tumoral, de tipos tan frecuentes como diferentes. El primer encuentro se simuló con un co-cultivo de células tumorales y MØ, después del cual, se separaron magnéticamente estos últimos en base al marcador CD14;

una vez lavados, se volvieron a co-cultivar con el mismo tipo de célula tumoral. La estructura del modelo es la mostrada en la Tabla R3.

Condición	1er estímulo	Separación CD14+	Lavado	2o estímulo
Control	Medio	+	3x PBS	Medio
Pre + Tratamiento	Co-cultivo	+	3x PBS	Co-cultivo
Tratamiento	Medio	+	3x PBS	Co-cultivo

Tabla R3. Estructura del modelo de tolerancia a células tumorales.

Para asegurar que los efectos observados eran específicos del co-cultivo con células tumorales, realizamos co-cultivos controles con linfocitos autólogos y con fibroblastos humanos primarios heterólogos.

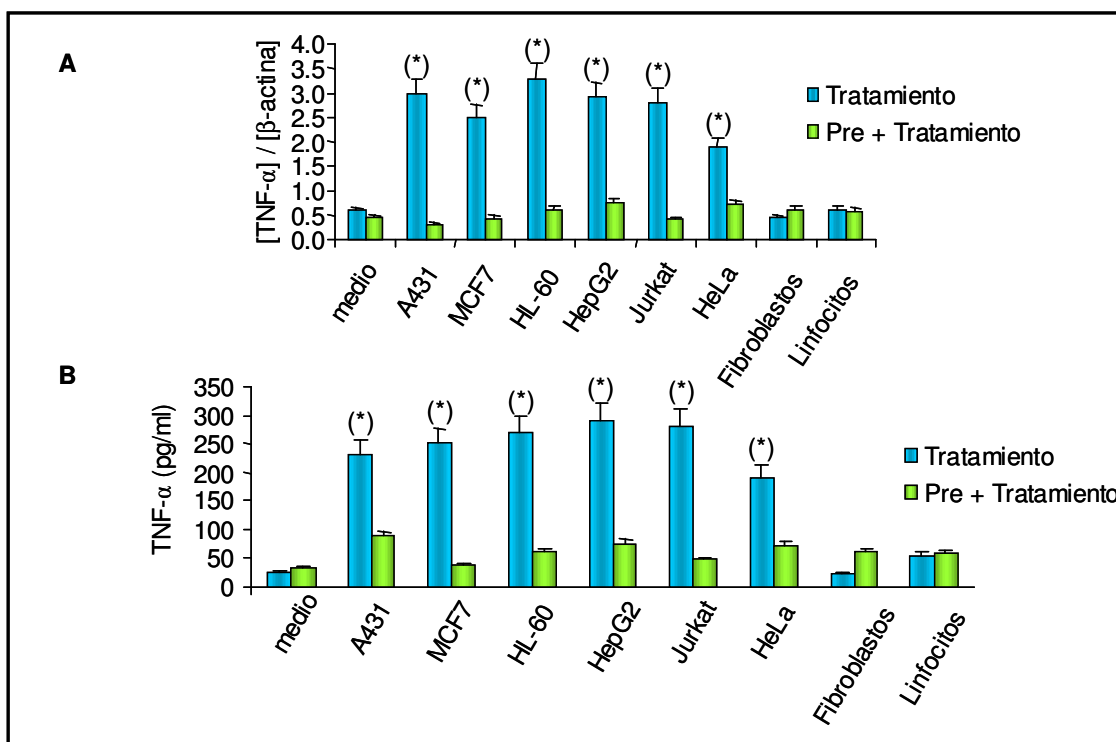


Figura R9. Expresión de $TNF\alpha$ en el modelo de tolerancia a tumores.

MØ humanos se co-cultivaron con las células indicadas en la figura o se dejaron en medio durante 6 horas. Posteriormente, se aislaron magnéticamente en base al marcador CD14, se lavaron tres veces con PBS y se volvieron a co-cultivar con el mismo tipo celular. **(A)**: tras una hora del segundo co-cultivo, se volvieron a aislar los MØ, se purificó el ARN y se cuantificó $TNF\alpha$ y β -actina por PCR-Q, analizando la relación $TNF\alpha / \beta$ -actina. **(B)**: tras 24 horas del segundo co-cultivo, valoramos la presencia de $TNF\alpha$ en el medio de cultivo mediante ELISA. (*) $p < 0.05$ con respecto a MØ pre-tratados con la misma línea celular.

Tras una hora del segundo co-cultivo, los MØ se aislaron nuevamente, y valoramos la expresión de TNF α a nivel transcripcional por PCR-Q (Figura R9.A). Como puede comprobarse, la pre-estimulación de los MØ (primer co-cultivo) reduce de manera drástica la respuesta inflamatoria inducida por el co-cultivo sencillo con las células tumorales.

Al igual que en el modelo de "TE", en el modelo de "TT" valoramos la liberación al medio de cultivo de la citoquina TNF α , en este caso, 24 horas después de iniciarse el segundo estímulo, que en esta ocasión se trata de un co-cultivo. En la Figura R9.B se aprecia que efectivamente, un primer co-cultivo de células tumorales con MØ, reduce la respuesta inflamatoria en un segundo encuentro con las células tumorales.

Los co-cultivos con fibroblastos heterólogos o linfocitos autólogos, no indujeron la expresión de TNF α a ningún nivel.

3.3.b) Activación de IRAK-M en el modelo de tolerancia a células tumorales.

Partiendo del modelo de "TT" establecido en el que observamos la desactivación de MØ por células tumorales, procedimos a analizar la expresión de IRAK-M en él. En paralelo a como realizamos con el modelo de "TE", primeramente estudiamos la expresión a nivel transcripcional de IRAK-M, en función del tiempo de estimulación de los MØ en co-cultivos con células tumorales. Para ello, expusimos MØ a diferentes líneas celulares y evaluamos la expresión de la pseudoquinasa por PCR-Q. De nuevo, como control de los efectos observados, realizamos co-cultivos de MØ con fibroblastos primarios heterólogos y con linfocitos autólogos.

Como se aprecia en la Figura R10, la presencia de todas las líneas tumorales testadas indujo la expresión de IRAK-M en MØ, con una cinética similar a la inducida por LPS. En todos los casos se observa un máximo a las 6 horas del co-cultivo, con niveles comparables (casos de A431, HeLa) o incluso superiores (HL60, MCF7) a los alcanzados con la exposición a LPS. Por el contrario, ni los linfocitos autólogos y ni los fibroblastos heterólogos indujeron IRAK-M.

Para estudiar la evolución de la pseudoquinasa en el modelo de “TT”, seleccionamos la línea tumoral epidérmica A431, ya que como se aprecia en la Figura R10, induce una respuesta representativa y muy similar a la observada en el caso del LPS; además, usamos fibroblastos heterólogos como células control.

En estos experimentos utilizamos MØ pre-expuestos a fibroblastos, células A431, o cultivados solos durante 6 horas, después de lo cual, se aislaron magnéticamente en función del marcador CD14 y se reestimularon con la misma línea tumoral o se dejaron en medio. Estos tratamientos representan el modelo de “TT” descrito en el punto 3.3.a. Estudiamos la expresión de IRAK-M por PCR-Q a lo largo de todo el tiempo que duró el cultivo, de nuevo en células CD14+. El resultado puede verse en la Figura R11. En esta gráfica, en la escala temporal está considerado como “tiempo cero”, el momento en que iniciamos el aislamiento de MØ tras el primer tratamiento, fuera éste un co-cultivo o simplemente mantener las células en medio.

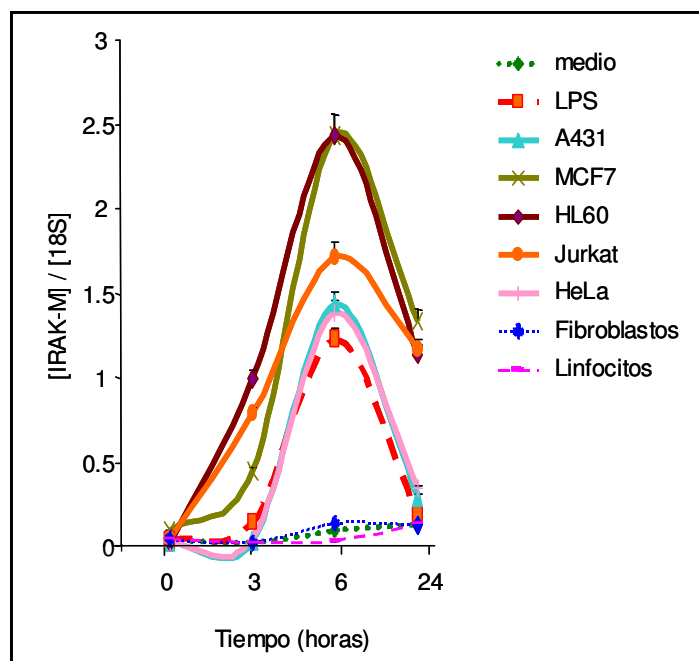


Figura R10. Inducción de IRAK-M por diferentes tipos celulares.

MØ humanos se co-cultivaron con los diferentes tipos celulares mostrados en la figura durante 24 horas. A los tiempos indicados, aislamos magnéticamente células CD14+, obtuvimos ARN total de ellas y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y 18S, analizando la relación IRAK-M / 18S.

Los co-cultivos de MØ con células tumorales mantenidos anteriormente en medio (—) o dejados en medio después del co-cultivo (---), muestran una

cinética de expresión de IRAK-M similar a la observada en la Figura R10, con un máximo de inducción a las 6 horas de iniciarse el co-cultivo. Este patrón de expresión no se vio alterado por una pre-exposición de los MØ a fibroblastos heterólogos (▲).

Sin embargo un primer co-cultivo de MØ con células A431, cambió de manera significativa el patrón de expresión de IRAK-M, tras una segunda exposición con la línea tumoral (●). En este caso, el segundo co-cultivo indujo una expresión de IRAK-M mucho más rápida, alcanzándose un máximo sólo 2 horas después de iniciarse este segundo estímulo.

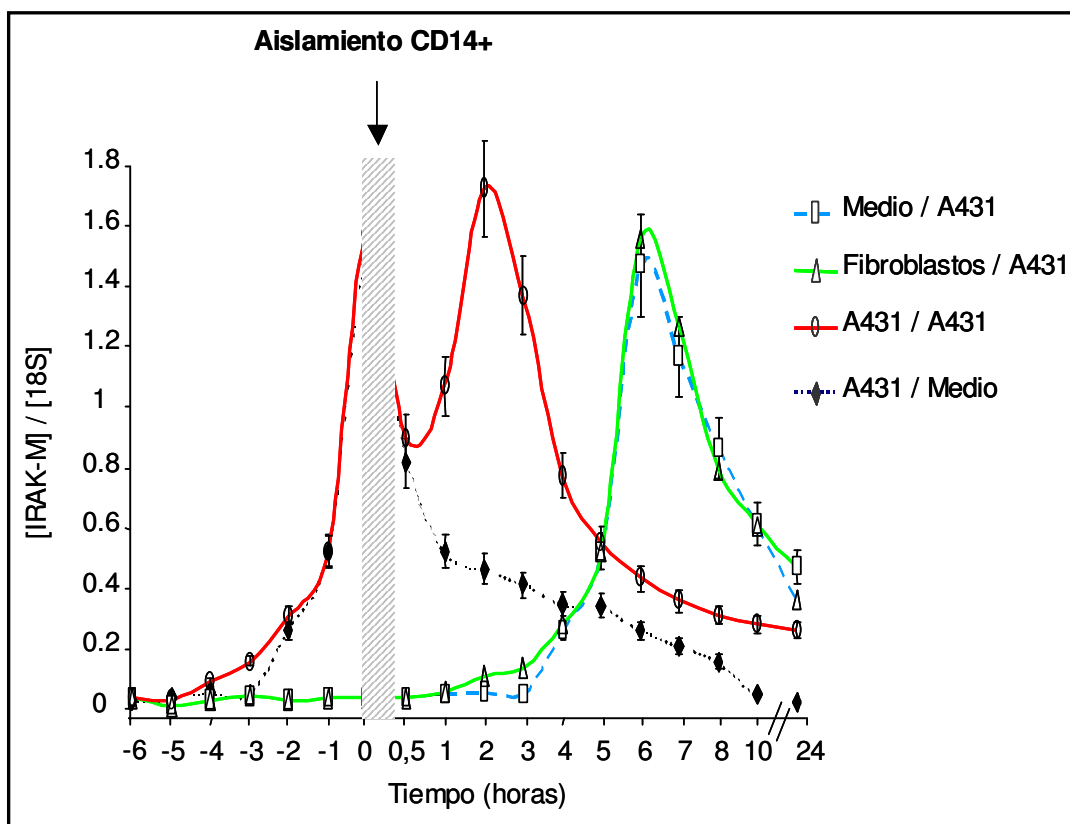


Figura R11. Expresión de IRAK-M en el modelo de tolerancia a tumores.

MØ humanos se co-cultivaron con fibroblastos, células A431 o se dejaron en medio durante 6 horas. En ese momento se aislaron magnéticamente células CD14+ (indicado en la figura), se lavaron 3 veces con PBS y se volvieron a cultivar en medio o co-cultivar con células A431. A los tiempos indicados, aislamos magnéticamente células CD14+, se aisló ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y 18S, analizando la relación IRAK-M / 18S.

Estos resultados indican que en el modelo de “TT”, la cinética de expresión de IRAK-M presenta una regulación singular, que a su vez, es análoga a la observada en el modelo de “TE” (comparar Figura R4 con R11).

Con el objetivo de comprobar que en este experimento, se seguían induciendo las condiciones de tolerancia descritas en el punto 3.3.a, analizamos la expresión de $TNF\alpha$ en células $CD14+$ obtenidas después del primer aislamiento y posterior estimulación (Figura R12).

Tal y como ocurría en la descripción del modelo de “TT” (ver Figura R9), el primer co-cultivo de los $M\phi$ con células A431 (—○—) reduce de manera significativa la producción de $TNF\alpha$ inducida por un co-cultivo sencillo con la célula tumoral (—□—). Además, ese efecto no se da cuando el primer co-cultivo se realiza con fibroblastos primarios heterólogos (—△—). Estos datos ratifican que en el experimento se reproduce el modelo de “TT”.

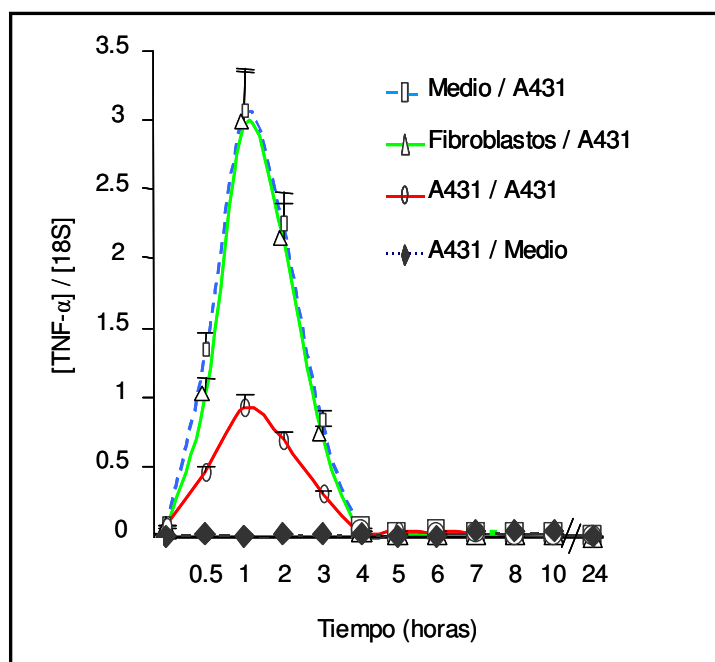


Figura R12. Expresión de $TNF\alpha$ en el modelo de tolerancia a tumores.

$M\phi$ humanos se co-cultivaron con fibroblastos, células A431 o se dejaron en medio durante 6 horas. En ese momento se aislaron magnéticamente células $CD14+$, se lavaron 3 veces con PBS y se volvieron a cultivar en medio o co-cultivar con células A431. A los tiempos indicados después de ese primer aislamiento, obtuvimos magnéticamente células $CD14+$, aislamos ARN total de ellas y por PCR-Q valoramos la expresión de $TNF\alpha$ y 18S, analizando la relación $TNF\alpha$ / 18S.

3.3.c) Silenciamiento génico de IRAK-M en el modelo de tolerancia a tumores.

En vista del patrón de expresión específico mostrado por IRAK-M en el modelo de “TT”, estudiamos si el silenciamiento génico de esta pseudoquinasa alteraría la inducción de este proceso. Para ello realizamos experimentos con un ARN de interferencia específicamente diseñado contra IRAK-M.

Inicialmente, testamos la eficacia de silenciamiento de este ARN, transfectando MØ humanos con él, y exponiéndolos a la línea tumoral A431 durante 6 horas. Como control de transfección, utilizamos un ARN de interferencia irrelevante. La Figura R13 muestra cómo la exposición de los MØ a la línea tumoral, tanto no transfectados como transfectados con el ARN control, induce la expresión de IRAK-M a unos niveles comparables a los alcanzados en la Figura R10. La transfección con 0.5 nM del ARN de interferencia no logró reducir esa expresión de manera significativa; sin embargo, a concentraciones de 5 y 25 nM del ARN específico contra IRAK-M, su expresión se redujo hasta un 25 % del valor inicial.

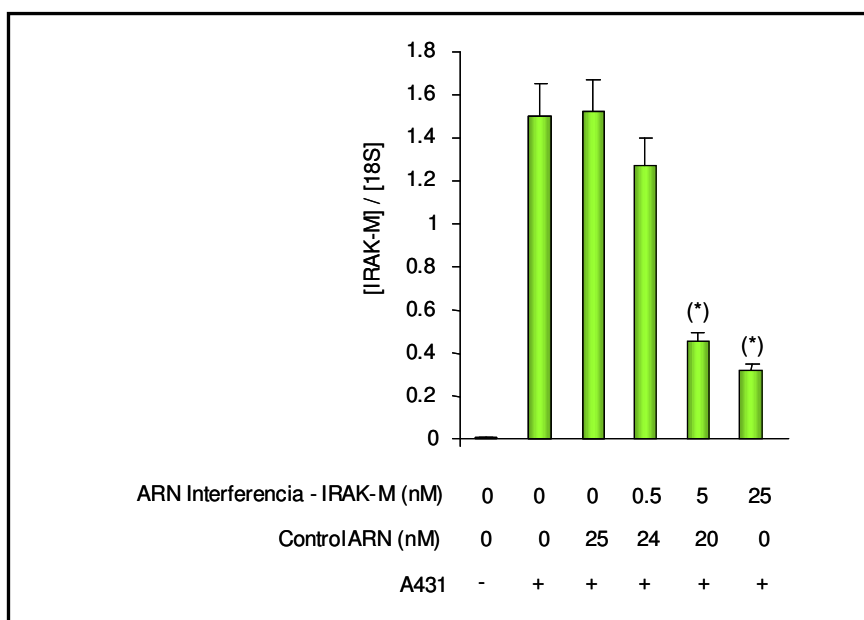


Figura R13. Test de eficacia del ARN de interferencia contra IRAK-M.

Cultivos de MØ humanos se transfectaron con las concentraciones indicadas de ARN control o de interferencia contra IRAK-M. Posteriormente, se co-cultivaron con células A431 durante 6 horas, después de lo cual, aislamos magnéticamente células CD14+, purificamos ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y 18S, analizando la relación IRAK-M / 18S. (*) $p < 0.05$ con respecto a MØ con el mismo tratamiento, transfectados con el ARN control.

Una vez testada la eficacia del ARN de interferencia, transfectamos MØ humanos y realizamos experimentos imponiendo las condiciones de “TT”; co-cultivamos MØ transfectados, con células A431 durante 2 horas (2o co-cultivo), pre-tratados o no con la misma célula tumoral por espacio de 6 horas (1er co-cultivo), tal y como se hizo en el punto 3.3.a. Después de esos tratamientos,

aislamos las células CD14+ y valoramos la expresión de TNF α a nivel transcripcional en ellas.

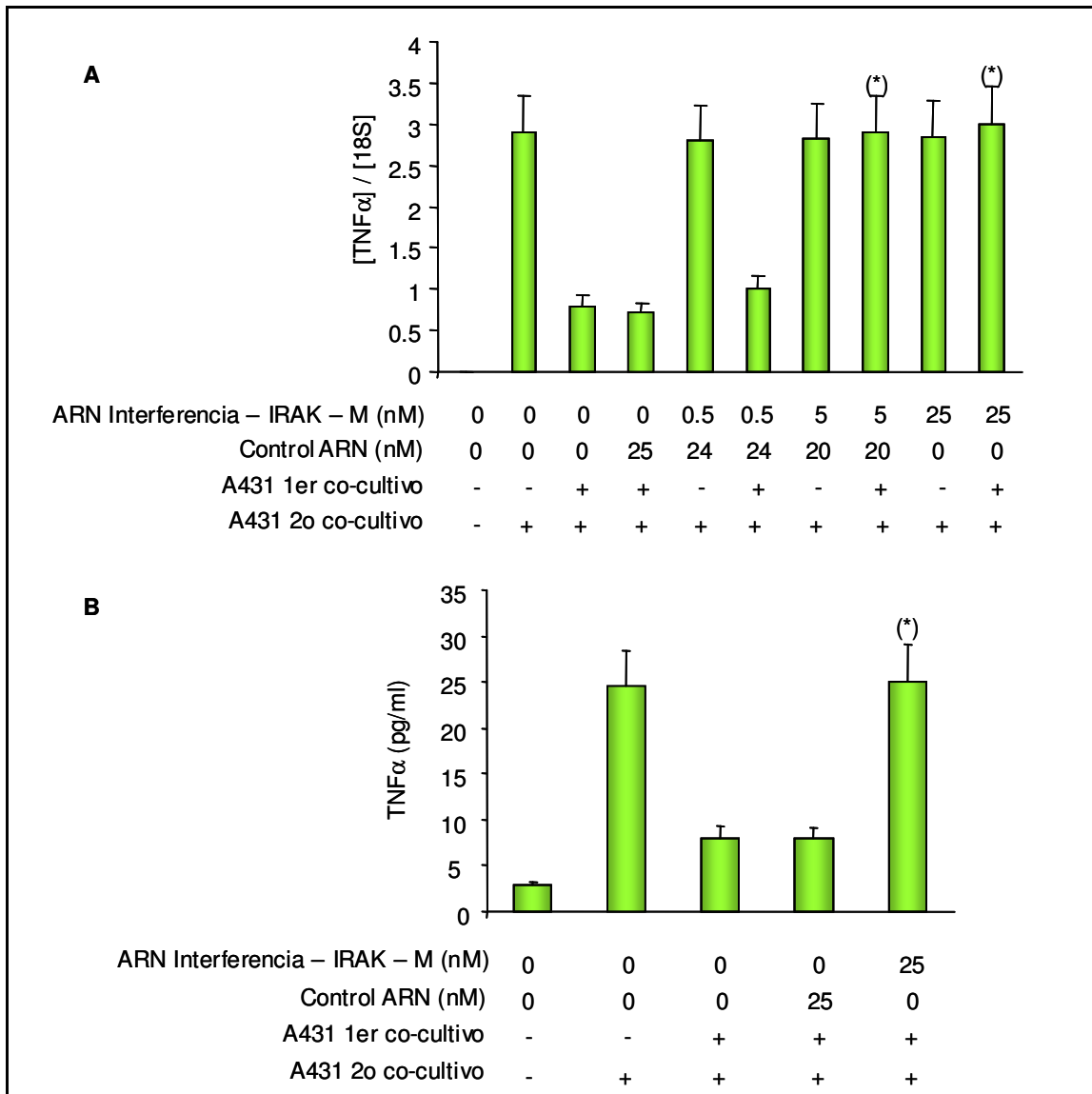


Figura R14. Expresión de TNF α en el modelo de tolerancia a tumores en presencia de ARN de interferencia contra IRAK-M.

Cultivos de M ϕ humanos se transfectaron con las concentraciones indicadas de ARN control o de interferencia. Posteriormente, se co-cultivaron con células A431 durante 6 horas (1er co-cultivo), después de lo cual, aislamos magnéticamente células CD14+. Lavamos 3 veces con PBS estas células y las volvimos a co-cultivar con A431 durante 2 horas (2o co-cultivo) **(A)** o 18 horas **(B)**. **(A)**: Aislamos de nuevo células CD14+, purificamos ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de TNF α y 18S, analizando la relación TNF α / 18S. **(B)**: Cuantificamos TNF α en el medio de cultivo por ELISA. Sólo se muestran los datos obtenidos en transfecciones con 25 nM de ARN para clarificar la figura y el efecto observado. Resultados similares con 5 nM de ARN interferente no mostrados. (*) p<0.05 con respecto a M ϕ con el mismo tratamiento, transfectados con el ARN control.

Como se muestra en la Figura R14.A, en los M ϕ no transfectados, transfectados con el ARN control o con 0.5 nM del ARN de interferencia, el pre-

tratamiento con las células A431 (1er co-cultivo), supone una reducción en la expresión de TNF α inducida por el segundo encuentro con la línea tumoral; es decir, se da el proceso de “TT”. Sin embargo, en aquellos M \emptyset transfectados con 5 o 25 nM del ARN de interferencia, el pre-tratamiento no logra reducir la expresión de TNF α .

Para ratificar que el efecto observado a nivel transcripcional se traducía a nivel de proteína, valoramos la liberación de TNF α al medio en los experimentos con M \emptyset transfectados con 25 nM del ARN de interferencia. La Figura R14.B muestra cómo efectivamente, la transfección con el ARN de interferencia, anula el efecto del primer co-cultivo con la célula tumoral.

En conjunto, estos datos indican que la reducción de la expresión de IRAK-M, revierte el fenotipo tolerante de los M \emptyset en el modelo de “TT”.

3.3.d) Elementos responsables de la inducción de IRAK-M en el modelo de tolerancia a tumores.

Una vez observado que el co-cultivo de células tumorales con M \emptyset humanos inducía en estos la expresión de IRAK-M, nos dispusimos a estudiar los mecanismos que subyacen en este proceso.

Inicialmente nos planteamos las hipótesis de si esta inducción, podría ser debida a elementos expresados en la membrana de las células tumorales, y/o a compuestos solubles liberados al medio por las mismas. Para intentar responder a la primera hipótesis, realizamos co-cultivos de M \emptyset con células tumorales fijadas (Figura R15.A), mientras que para abordar la segunda, expusimos a los M \emptyset a un medio de cultivo suplementado con un 20 % de sobrenadante procedente de un cultivo de células tumorales (Figura R15.B). En ambos casos, testamos la expresión de IRAK-M a lo largo de 24 horas de cultivo.

Todas las células tumorales fijadas indujeron la expresión de IRAK-M a las 3 horas de iniciado el co-cultivo, y esta expresión se mantuvo hasta las 6 horas, cayendo los niveles después de 24 horas. Sin embargo ni fibroblastos primarios heterólogos ni linfocitos autólogos (ambos fijados), lograron inducir esta expresión (Figura R15.A).

En el caso de los cultivos con medio condicionado tumoral, el comportamiento de la expresión de IRAK-M es muy similar al anterior. Se observa una clara inducción en los casos de medio condicionado procedente de células tumorales, no observada cuando el medio procedía de fibroblastos o linfocitos (Figura R15.B). Cabe indicar que el grado de inducción alcanzado por IRAK-M en estos experimentos, es menor que el observado en el caso de las células tumorales fijadas y de los co-cultivos (Ver Figura R10).

Estos datos indican que algún factor o factores unido/s a la membrana de las células tumorales y también liberado/s al medio por ellas, es/son responsable/s de la inducción de IRAK-M en los MØ.

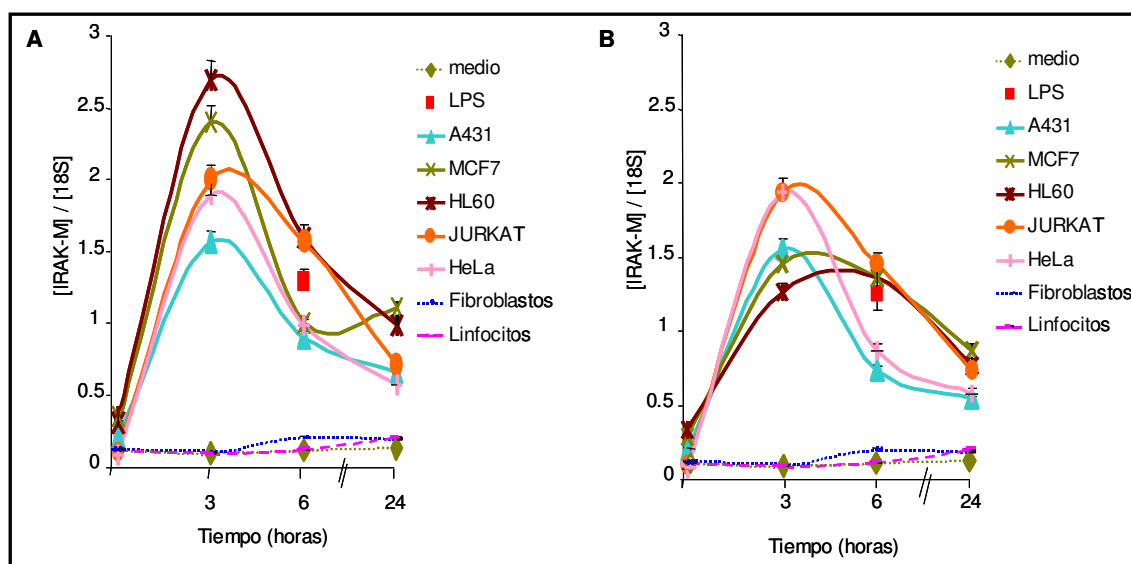


Figura R15. Inducción de IRAK-M debida a factores anclados a membranas de células tumorales o elementos solubles liberados por ellas.

(A): MØ humanos se co-cultivaron con los diferentes tipos celulares fijados indicados durante 24 horas; a los tiempos indicados, aislamos magnéticamente células CD14+. (B): MØ humanos se cultivaron en presencia de medio suplementado con 20% de sobrenadante procedente de cultivos de diferentes células, durante 24 horas. A los tiempos indicados los MØ se lavaron 3 veces con PBS, y se recolectaron. Llegados a ese punto, en ambos casos aislamos ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y 18S, analizando la relación IRAK-M / 18S.

3.3.d.i) Implicación del ácido hialurónico en la inducción de IRAK-M.

El siguiente paso en nuestro estudio, fue buscar candidatos que reunieran las condiciones descritas hasta ahora por el factor inductor de IRAK-M, a saber: capacidad de inducir una respuesta inflamatoria en MØ, debería estar unido a membrana y también ser liberado como un factor soluble. El ácido hialurónico (AH) ha sido descrito como un elemento importante en la

patogénesis tumoral, y reúne todas esas condiciones (Toole, 2004; Yabushita *et al*, 2004). Así, decidimos testar el efecto de este glucosaminglucano sobre la expresión de IRAK-M.

Cultivamos MØ en presencia de dos concentraciones diferentes de AH, y estudiamos la expresión de IRAK-M durante 24 horas. Como control positivo de inducción, expusimos los MØ a LPS durante 6 horas. La Figura R16.A muestra cómo, de manera muy similar en las dos concentraciones estudiadas, el AH induce la expresión de IRAK-M a partir de 3 horas de iniciarse el estímulo. Además, los niveles alcanzados son comparables a los inducidos por el LPS.

También valoramos la expresión de TNF α inducida por el AH, comparándola con la observada en un co-cultivo de MØ y células tumorales A431 (Figura R16.B). En este caso, utilizamos sólo la concentración de 100 μ g/ml de AH, toda vez que el efecto observado sobre IRAK-M a esta concentración, es el mismo que el inducido a 200 μ g/ml. El AH indujo una rápida expresión de TNF α , con un máximo de inducción entre la primera y la segunda hora de estímulo, cinética muy similar a la observada en el co-cultivo.

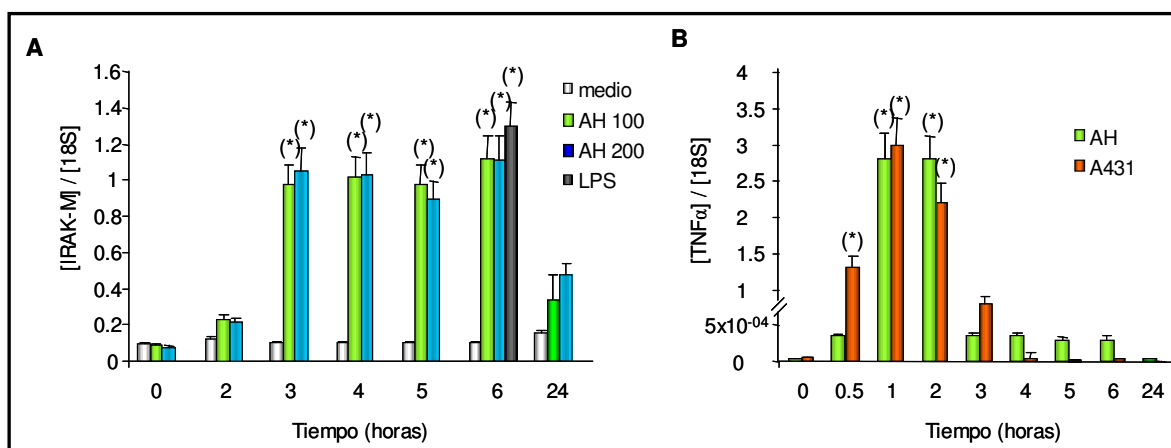


Figura R16. Inducción de IRAK-M y TNF α por ácido hialurónico.

(A): Cultivos de MØ humanos se mantuvieron en medio o se expusieron a 100 o 200 μ g/ml de AH durante 24 horas. También se expusieron a 10 ng/ml de LPS durante 6 horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se recolectaron. Aislamos ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y 18S, analizando la relación IRAK-M / 18S. **(B):** Cultivos de MØ humanos se expusieron a 100 μ g/ml de AH o se co-cultivaron con células A431 durante 24 horas. A los tiempos indicados, en el caso de la exposición a AH, se siguió el mismo proceso que en la figura A. En el caso de los co-cultivos, se aislaron células CD14+, y se lavaron 3 veces con PBS. Seguidamente, purificamos ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de TNF α y 18S, analizando la relación TNF α / 18S. (*) $p < 0.05$ con respecto a MØ no tratados.

Llegados a este punto, y antes de profundizar en este mecanismo, quisimos comprobar que los datos obtenidos hasta ahora a nivel transcripcional sobre IRAK-M, tenían un reflejo en la presencia de la proteína. Para ello co-cultivamos MØ con células A431, tanto vivas como fijadas. También expusimos MØ a medio condicionado tumoral de células A431 (ver punto 3.3.d), a AH y a LPS como control positivo de inducción. En todos los casos, los cultivos fueron de 24 horas y realizamos análisis *Western blot* para detectar IRAK-M.

Tal y como se aprecia en la Figura R17, en todas las condiciones la presencia de la proteína es patente, a niveles comparables con los inducidos por LPS.

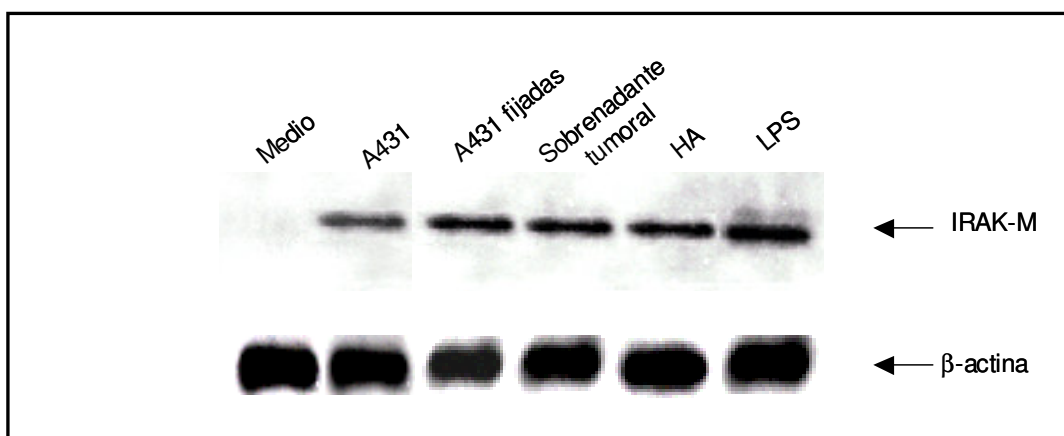


Figura R17. Expresión proteica de IRAK-M en monocitos / macrófagos expuestos a diferentes estímulos en el contexto de la tolerancia a tumores.

MØ humanos se co-cultivaron con células A431, vivas y fijadas, se cultivaron con medio suplementado con un 20 % de sobrenadante procedente de un cultivo de células A431, y se expusieron a 100 µg/ml de AH y a 10 ng/ml de LPS. Todos los tratamientos se realizaron durante 24 horas. Seguidamente, aislamos las proteínas totales y realizamos análisis *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra IRAK-M y β-actina.

3.3.d.ii) El ácido hialurónico induce tolerancia y el silenciamiento de IRAK-M revierte este proceso.

Todos los datos anteriores, sugieren que las células tumorales utilizan el AH para provocar la inducción de IRAK-M en los MØ. En este punto, hipotetizamos que esta inducción provocaría la caída de los MØ en un estado de tolerancia. Con el objetivo de demostrar esta hipótesis, realizamos experimentos de silenciamiento génico de IRAK-M, en base al mismo ARN de interferencia utilizado en el punto 3.3.c.

Inicialmente testamos la eficacia de silenciamiento del ARN de interferencia, ante la inducción de IRAK-M lograda por un estímulo con AH. El

experimento es idéntico al mostrado en la Figura R13, salvo que en lugar de exponer los MØ a las células A431, se estimularon con AH. El resultado fue similar. Cuando los MØ se transfectaron con 5 o 25 nM del ARN de interferencia, se alcanzó una reducción en la expresión de IRAK-M hasta un nivel del 25 %, comparándose con la inducción lograda transfectando con un ARN control irrelevante (datos no mostrados).

Una vez validado el sistema, impusimos a MØ transfectados el modelo de tolerancia, utilizando como estímulo AH. Realizamos un pre-tratamiento de 6 horas con el glucosaminglucano, para después de lavar, reestimar de nuevo con AH durante 2 o 18 horas. En esos MØ valoramos la expresión de TNF α a nivel transcripcional (Figura R18.A) y traduccional (Figura R18.B) respectivamente.

En los casos de MØ transfectados con el ARN control o con 0.5 nM del ARN de interferencia, el pre-tratamiento reduce la expresión de TNF α inducida por un segundo estímulo de AH. Sin embargo, en aquellos MØ transfectados con 5 o 25 nM del ARN de interferencia contra IRAK-M, no ocurre ese efecto.

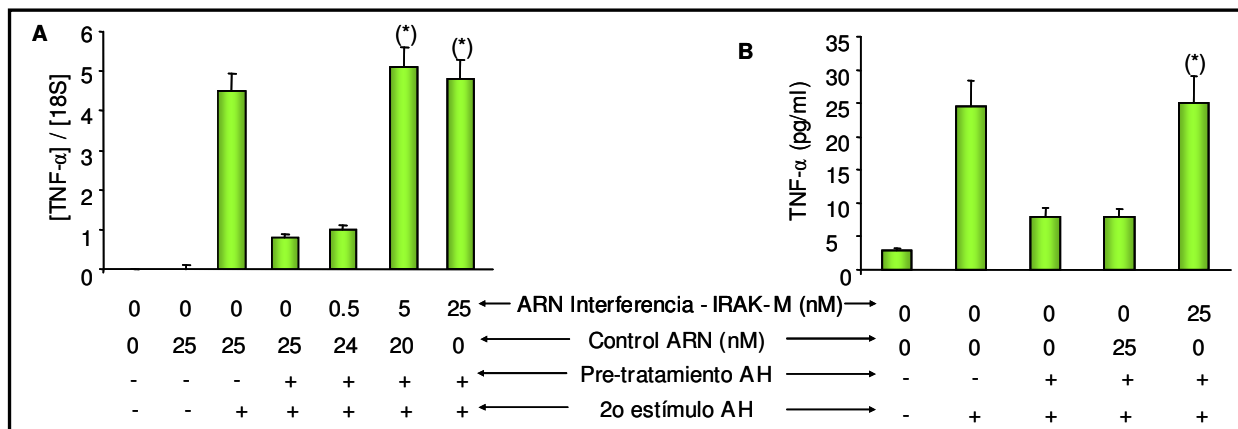


Figura R18. Expresión de TNF α en el modelo de tolerancia inducido por ácido hialurónico, en presencia de ARN de interferencia contra IRAK-M.

Cultivos de MØ humanos se transfectaron con las concentraciones indicadas de ARN control o de interferencia. Posteriormente, se expusieron a 100 μ g/ml de AH durante 6 horas (Pre-tratamiento AH), se lavaron 3 veces con PBS y se reexpusieron a AH (2o estímulo AH) durante 2 horas (A) o 18 horas (B). (A): Recolectamos los MØ, purificamos ARN total y por PCR-Q valoramos la expresión de TNF α y 18S, analizando la relación TNF α / 18S. (B): Cuantificamos TNF α en el medio de cultivo por ELISA. (*) $p < 0.05$ con respecto a MØ con el mismo tratamiento, transfectados con el ARN control.

Este resultado indica que la reducción en la expresión de IRAK-M con el ARN de interferencia, bloquea el efecto del pre-tratamiento con AH, evitando la caída de los MØ en un estado de tolerancia.

3.3.d.iii) CD44 y TLR4 intervienen en la inducción de IRAK-M por ácido hialurónico.

Una vez caracterizada la implicación de AH en la inducción de IRAK-M, decidimos estudiar las vías por las cuales actuaba este compuesto. CD44 es el principal receptor de AH en la superficie celular (Ahrens, *et al*, 2001), pero también el TLR4 ha sido descrito como receptor de este glucosaminglucano (Akira, *et al*, 2004). Por ello, planteamos la hipótesis de que el AH induce IRAK-M tras ser reconocido por estos dos receptores.

Para abordar esta hipótesis, pre-tratamos durante una hora MØ humanos con dosis crecientes de anticuerpos bloqueantes contra CD44 y TLR4. Seguidamente, realizamos un tratamiento con AH durante 3 horas y testamos la expresión de IRAK-M. Como control de la especificidad del posible efecto observado, también realizamos pre-tratamientos con un anticuerpo bloqueante contra TLR2. Como se aprecia en la Figura R19, la sola presencia de los anticuerpos, no supuso un cambio significativo en la expresión de IRAK-M. Sin embargo, el pre-tratamiento con los anticuerpos contra CD44 (Figura R19.A) y TLR4 (Figura R19.B), redujeron de una manera dosis-dependiente la expresión de IRAK-M inducida por el AH. Este efecto no se observó en el caso de que el pre-tratamiento fuera con anti-TLR2.

Como último paso en el estudio de este mecanismo, quisimos comprobar que el efecto de los anticuerpos bloqueantes también se daba en MØ co-cultivados con células A431. Además también testamos el efecto de un pre-tratamiento conjunto con los dos anticuerpos. El experimento se diseñó de la siguiente manera: pre-tratamos MØ durante una hora, con las dosis más bajas utilizadas de anticuerpos bloqueantes contra CD44 y TLR4, tanto por separado como conjuntamente. Después, realizamos un co-cultivo con células A431 durante 6 horas, aislamos MØ y estudiamos la expresión de IRAK-M. De nuevo utilizamos como control el pre-tratamiento con anti-TLR2.

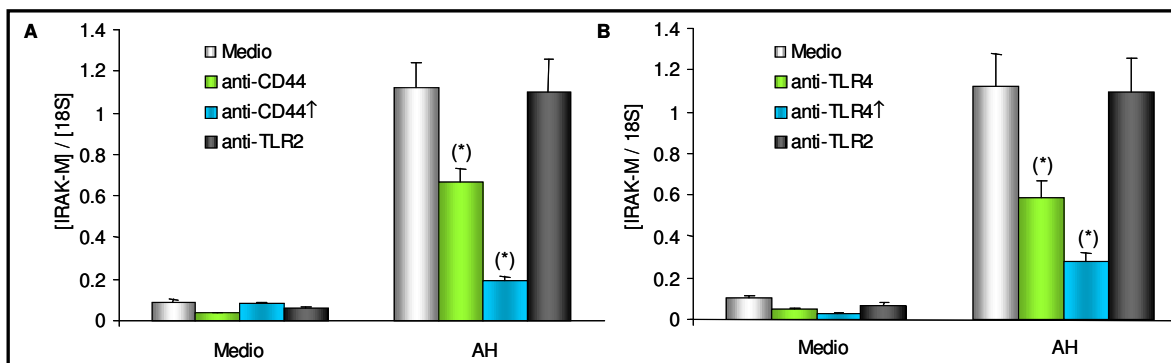


Figura R19. Efecto bloqueante de los anticuerpos anti-CD44 y anti-TLR4 sobre la expresión de IRAK-M inducida por ácido hialurónico.

(A): Cultivos de MØ humanos se pre-trataron con 0.1 µg/ml o 10 µg/ml (↑) de anti-CD44 o 10 µg/ml de anti-TLR2 durante una hora. (B): Cultivos de MØ humanos se pre-trataron con 0.5 µg/ml o 5 µg/ml (↑) de anti-TLR4 o 10 µg/ml de anti-TLR2 durante una hora. En ambos casos, seguidamente los MØ se expusieron a 100 µg/ml de AH por espacio de 3 horas. A continuación, se lavaron 3 veces con PBS y se recolectaron. Aislamos ARN total y por PCR-Q, valoramos la expresión de IRAK-M y 18S, analizando la relación IRAK-M / 18S. (*) p<0.05 con respecto a MØ pre-tratados con medio.

La Figura R20 muestra cómo cada uno de los anti-CD44 y anti-TLR4 por separado, logran reducir la expresión de IRAK-M inducida por las células A431. De nuevo, este efecto no se dio en el caso de usar anti-TLR2. De manera muy significativa, se observa que un pre-tratamiento conjunto con sendos anticuerpos anti-CD44 y anti-TLR4, muestra un efecto aditivo en el bloqueo de la inducción de IRAK-M por las células tumorales.

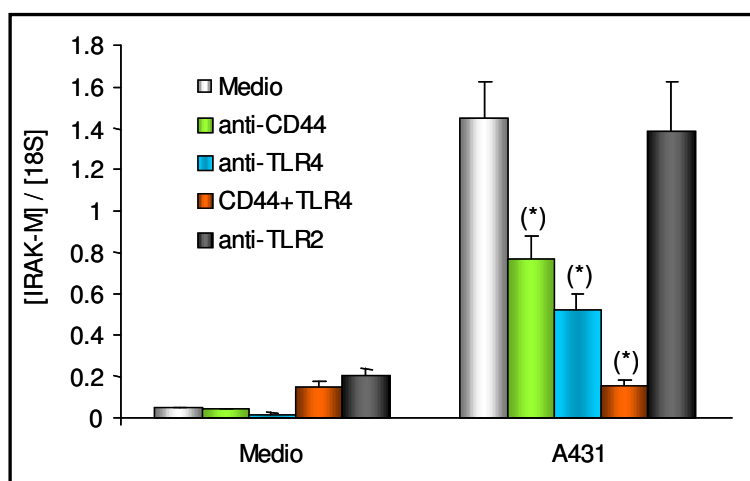


Figura R20. Efecto aditivo de los anticuerpos anti-CD44 y anti-TLR4 sobre la expresión de IRAK-M inducida por células A431.

Cultivos de MØ humanos se pre-trataron con 0,1 µg/ml de anti-CD44, 0,5 µg/ml de anti-TLR4, con ambos a la vez o con 10 µg/ml de anti-TLR2. A continuación, se co-cultivaron con células A431 durante 6 horas. Seguidamente, aislamos magnéticamente células CD14+, las lavamos 3 veces con PBS y purificamos ARN total. Partiendo de esa muestra, por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M y 18S, analizando la relación IRAK-M / 18S. (*) p<0.05 con respecto a MØ pre-tratados con medio.

3.3.e) Expresión de IRAK-M en monocitos / macrófagos aislados de pacientes con cáncer.

Como reflejo del modelo de "TT" en una situación *in vivo*, estudiamos a nivel transcripcional, la expresión de TNF α e IRAK-M en M \emptyset de pacientes que sufrían diversos procesos tumorales. Partimos de muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia mieloide crónica, cáncer de colon metastásico y no metastásico. Aislamos magnéticamente células CD14+ de estas muestras y comparamos su comportamiento con M \emptyset aislados de sangre de donantes sanos. Como control de inducción expusimos M \emptyset sanos a LPS durante 1 y 6 horas.

En todos los casos, las células obtenidas de pacientes con leucemia expresaron de manera muy clara IRAK-M, mientras que no expresaban TNF α . Algo similar ocurría en el caso de las muestras procedentes de pacientes con tumor de colon metastásico, expresando si cabe niveles bajos de TNF α . Sin embargo, contrastando con los anteriores, en M \emptyset aislados de pacientes con tumor de colon no metastásico, no observamos expresión de IRAK-M, y sí detectamos una ligera expresión de TNF α (Figura R21).

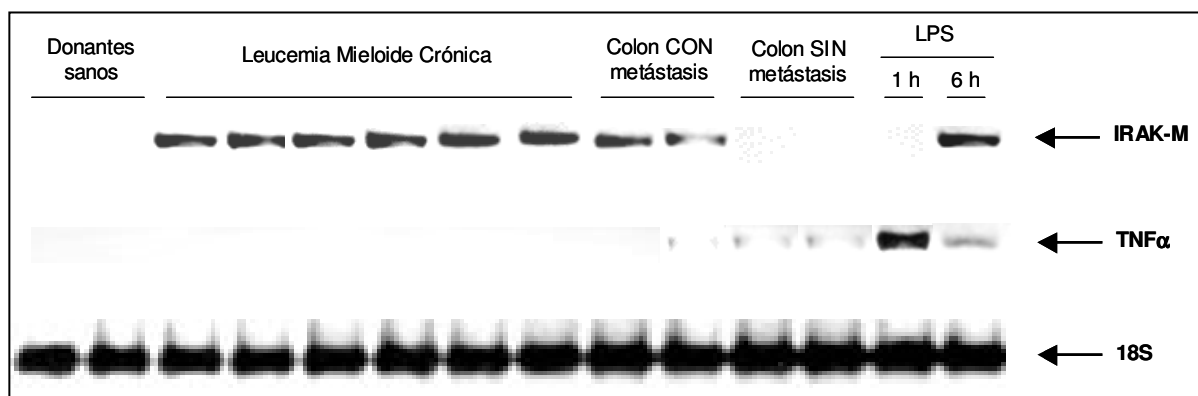


Figura R21. Expresión de TNF α e IRAK-M en monocitos / macrófagos de pacientes con diversos tumores.

Partiendo de células CD14+ aisladas de sangre periférica de donantes sanos y pacientes diagnosticados con los procesos tumorales indicados, aislamos ARN total. Utilizamos como control de inducción células CD14+ aisladas de donantes sanos expuestas a 10 ng/ml de LPS durante 1 y 6 horas. Por PCR-Q valoramos la expresión de IRAK-M, TNF α y 18S, analizando las relaciones IRAK-M / 18S y TNF α / 18S. La figura muestra los productos finales de la PCR-Q, resueltos en un gel de agarosa.

Es decir, en aquellos procesos tumorales en los que los MØ circulantes están en contacto con las células cancerosas (leucemia y proceso metastásico), se observa expresión de IRAK-M. Sin embargo, en el caso de un tumor localizado y en los donantes sanos, donde las células CD14+ circulantes no presentan ese contacto frecuente con las células tumorales, IRAK-M no se expresa.

Estos datos *in vivo*, se correlacionan con los obtenidos en el modelo *in vitro* de "TT", en lo que a la inducción de IRAK-M por células tumorales se refiere.

DISCUSIÓN

4.- Discusión

Desde que se describió a IRAK-M, como un regulador negativo de la cascada de señalización iniciada por diversos TLR y clave en el desarrollo de “TE” (Kobayashi, *et al*, 2002), el estudio de esta molécula ha despertado gran interés. Sin embargo, la mayoría de los estudios básicos publicados sobre esta pseudoquinasa, se han realizado en modelos de roedores, tanto *in vitro* (Nakayama, *et al*, 2004; Pathak, *et al*, 2005; Taylor, 2005) como *in vivo* (Li, *et al*, 2005; Deng, *et al*, 2006; Su, *et al*, 2007). En el presente trabajo, hemos abordado el estudio básico de la expresión de IRAK-M y los mecanismos que subyacen en su regulación, en MØ primarios de origen humano.

Para llevar a cabo este estudio, partimos del establecimiento de un modelo *in vitro* donde simular las condiciones de tolerancia. Este modelo presenta unas características generales descritas en la Tabla R1, generando cuatro condiciones experimentales en base a dos estímulos. Teóricamente, la primera estimulación induce las condiciones de tolerancia, de forma que atenuará la respuesta inflamatoria generada por el segundo estímulo. Este efecto es observado en el resultado tanto del modelo de “TE” (Figuras R1 y R2) como en el modelo de “TT” (Figura R9). En ambos casos, el primer estímulo, reduce de manera significativa la producción de TNF α , inducida por la segunda estimulación. Estos resultados confirman que nuestros modelos reproducen el fenómeno de tolerancia, es decir, una capacidad reducida por parte de los MØ de generar una respuesta inflamatoria óptima ante un determinado estímulo, como consecuencia de un primer enfrentamiento al mismo.

Centrándonos en el estudio de la expresión de IRAK-M en respuesta al LPS, una única exposición de los MØ a la endotoxina induce la expresión a nivel transcripcional de la pseudoquinasa, con un máximo a las 6 horas de iniciarse el estímulo (Figura R3). A nivel proteico, detectamos a IRAK-M 24 horas después de iniciarse la estimulación (Figura R5). Esta cinética de expresión mostrada por la pseudoquinasa en nuestro modelo *in vitro*, queda confirmada por los datos publicados en un estudio, en el que la inyección intravenosa de LPS a donantes sanos, indujo la expresión de IRAK-M, con un máximo entre 4 y 6 horas después de iniciarse el estímulo (Calvano, *et al*,

2005). La concordancia entre estos experimentos *in vivo* y los datos mostrados en el presente trabajo, indica la validez del modelo *in vitro* utilizado.

El comportamiento observado por IRAK-M en MØ humanos es diferente del mostrado en modelos de roedores, donde a nivel transcripcional se detecta tan solo 3 horas después de la estimulación con LPS, y la proteína se empieza a visualizar 6 horas después de iniciarse ese estímulo (Kobayashi, *et al*, 2002). Este dato hace hincapié en la importancia del estudio de IRAK-M en MØ humanos, ya que su cinética de expresión es diferente del que muestra en roedores.

Durante la “TE”, el segundo estímulo con LPS indujo una rápida transcripción de IRAK-M, con un máximo de expresión sólo una hora después de esta segunda estimulación (Figura R4). Este hallazgo sugiere que el pre-condicionamiento inducido por el primer estímulo con LPS, genera un mecanismo que permite esta rápida transcripción posterior de IRAK-M, dentro del marco de la “TE”. En este contexto, IRAK-M podría ejercer su efecto bloqueante de la disociación del complejo iniciador, propuesto (aunque no demostrado) como posible mecanismo de actuación de la pseudoquinasa (Janssens, *et al*, 2003; López-Collazo, *et al*, 2006). De hecho, la presencia de IRAK-M a nivel proteico, 24 horas después del primer estímulo con LPS, permite sugerir su potencial participación en este proceso, como elemento generado por el pre-condicionamiento con la endotoxina. Es decir, el pre-tratamiento con LPS permitiría que IRAK-M se encontrase disponible, ante un segundo estímulo con la endotoxina, para ejercer su efecto bloqueante de la cascada de señalización. Si bien, IRAK-M se ha postulado con una función desactivadora de la cascada de señalización, más que como un bloqueante de la señal (Su, *et al*, 2007). De momento, hasta poder demostrar el mecanismo por el cual actúa IRAK-M, el presente trabajo muestra una regulación específica de la expresión de la pseudoquinasa durante el proceso de “TE”.

Cabe destacar que los comportamientos de IRAK-M observados, se dieron independientemente de la concentración de LPS utilizada, 10 o 100 ng/ml, tanto a nivel transcripcional (Figuras R3 y R4) como a nivel traduccional (Figura R5). Este efecto indica que la estimulación con 10 ng/ml es ya suficiente para desencadenar la activación de IRAK-M y modular su

comportamiento, sugiriendo que el sistema no es capaz de responder a una concentración mayor de LPS, llegando a saturación. Las dos concentraciones de LPS utilizadas son menores que las empleadas comúnmente en estudios *in vitro*, en los que frecuentemente se realizan estímulos con 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (Visintin, *et al*, 2005; Aneja, *et al*, 2006; Hirasawa, *et al*, 2006), llegando en ocasiones a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Mordmüller, *et al*, 2003). Sin embargo, un trabajo realizado en pacientes a los que se les suministraba LPS *in vivo*, mostró que una concentración de la endotoxina superior a 1 ng/kg de peso corporal, era limitante como consecuencia de los efectos tóxicos que generaba (Engelhardt, *et al*, 1990). Este último dato da idea de lo elevado de las concentraciones de LPS utilizadas en los modelos *in vitro*, y avala a nuestro diseño experimental por su acercamiento a las condiciones fisiológicas.

Con respecto a los mecanismos implicados en la activación de la expresión de IRAK-M, estudiamos dos potencialmente implicados.

El primero de ellos fue la PI3K. Esta enzima se ha descrito como elemento represor de la respuesta inflamatoria (Fukao, *et al*, 2002), actuando en una fase temprana (Fukao, *et al*, 2003). Considerando que el bloqueo de dicha actividad con inhibidores específicos inhibe la inducción de tolerancia al LPS, (Peck, *et al*, 2006), decidimos testar su vinculación con la expresión de IRAK-M. El resultado fue que tras bloquear específicamente PI3K, la exposición de los M \emptyset al LPS indujo una expresión acelerada de IRAK-M, observándose una transcripción significativa de la pseudoquinasa, sólo una hora después de iniciarse el estímulo con la endotoxina (Figura R6).

Este hecho podría explicarse, en principio, de dos maneras. Al dejar de actuar PI3K por efecto del inhibidor, se activa un mecanismo complementario que adelanta la expresión de IRAK-M, para paliar la ausencia de la actividad PI3K. Otra posible explicación, es que la PI3K como regulador temprano, modula la activación de IRAK-M, ya sea bloqueando la expresión temprana o activando la expresión tardía de la pseudoquinasa.

El segundo mecanismo que estudiamos, potencialmente vinculado a la regulación de IRAK-M, fue la implicación de TNF α . Esta citoquina inflamatoria se expresa muy rápidamente cuando se estimula a los M \emptyset con LPS (Figura

R1). Cabe pensar, que dentro de los mecanismos proinflamatorios que activa el $\text{TNF}\alpha$, también induzca elementos antiinflamatorios para compensar su efecto. De este modo, observamos que efectivamente, el $\text{TNF}\alpha$ induce la expresión de IRAK-M cuando los $\text{M}\emptyset$ son estimulados con él (Figura R7). Este hecho describe un mecanismo de autorregulación de la respuesta generada por el $\text{TNF}\alpha$. Atendiendo a cinéticas de expresión secuenciales y acopladas, tras el encuentro de los $\text{M}\emptyset$ con el LPS, responden produciendo rápidamente $\text{TNF}\alpha$ que a su vez, induce la expresión de IRAK-M como elemento clave en la tolerancia. Esquemáticamente: $\text{LPS} \rightarrow \text{TNF}\alpha \rightarrow \text{IRAK-M} \rightarrow \text{tolerancia}$.

A raíz de los datos mostrados en el presente trabajo, podemos indicar que el $\text{TNF}\alpha$ es suficiente para inducir a IRAK-M, ya que su sola presencia induce la expresión de la pseudoquinasa (Figura R7). Sin embargo, no podemos afirmar que la presencia de $\text{TNF}\alpha$ sea estrictamente necesaria para la inducción de IRAK-M, pudiendo existir otros factores implicados de forma directa en la inducción de la pseudoquinasa.

La diferencia en el tiempo necesario para inducir la expresión de IRAK-M al estimular los $\text{M}\emptyset$ con LPS (6 horas) o con $\text{TNF}\alpha$ (2 horas), es atribuible a que en el segundo caso, estamos poniendo en el medio de cultivo la citoquina ya sintetizada y funcional. Sin embargo, al exponer los $\text{M}\emptyset$ a LPS, es necesario el reconocimiento de la endotoxina y la transducción de esa señal, que tiene como consecuencia la liberación de $\text{TNF}\alpha$ al medio, que entonces inicia el proceso de inducción de IRAK-M.

Cabe destacar, que la rápida transcripción de IRAK-M observada después del segundo estímulo con LPS, no puede ser atribuida a la presencia de $\text{TNF}\alpha$, ya que en ese momento, los $\text{M}\emptyset$ se encuentran tolerantes y por ello, sin capacidad de producir la citoquina inflamatoria (Figura R1 y R2). Por tanto, el primer estímulo con LPS, además de inducir la expresión de $\text{TNF}\alpha$ e IRAK-M, debe generar una maquinaria que permita la rápida transcripción de la pseudoquinasa, después de una segunda estimulación con la endotoxina. Un posible mecanismo implicado en esa maquinaria, será discutido más adelante.

En el presente trabajo, decidimos estudiar la implicación de la actividad PI3K y del $\text{TNF}\alpha$ en la regulación de la expresión de IRAK-M por las razones ya mencionadas. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que puedan

existir otros elementos implicados en dicha regulación, como podría ser el interferón β producido en respuesta al LPS, y descrito como posible mediador en la inducción de “TE” (Biswas, *et al*, 2007).

Si integramos los datos obtenidos en cuanto a la particular cinética de expresión de IRAK-M en el contexto de la “TE”, y los dos mecanismos subyacentes estudiados, podemos hipotetizar un esquema en lo que a la activación de IRAK-M se refiere (Figura D1).

El LPS al ser reconocido por un complejo donde el TLR4 tiene un papel central (ver punto 1.1.c), inicia una cascada de señalización que conduce en primer término a la producción de $\text{TNF}\alpha$, el cual es liberado al medio extracelular. Aquí es reconocido de forma auto/paracrina por su receptor, iniciándose una segunda cascada que concluye con la expresión de IRAK-M, la cual ya estaría disponible para llevar a cabo su función en el proceso de tolerancia.

Por otra parte, el LPS también induce la activación de PI3K (David, *et al*, 2005), la cual dentro de su efecto como regulador negativo, frena la producción de $\text{TNF}\alpha$ (Choi, *et al*, 2006). Partiendo de este hecho, una posible explicación al afecto observado por la inhibición de PI3K, sería que en esas condiciones se da una mayor producción de $\text{TNF}\alpha$, lo cual permitiría una activación precoz de IRAK-M tal y como observamos en nuestros resultados (Figura R6). Sin embargo, esta hipótesis no es excluyente ni descarta la posibilidad de que PI3K de manera directa, tenga un efecto represor temprano o activador tardío sobre la expresión de IRAK-M. Tampoco a partir de nuestros datos se puede descartar que la primera cascada de señalización iniciada por el LPS, tenga un efecto directo sobre la activación de la pseudoquinasa. Partiendo de los datos mostrados en el presente trabajo, en lo que a la relación entre PI3K, IRAK-M y el proceso de “TE” se refiere, se hace necesario un estudio más profundo sobre la vinculación existente entre estos tres elementos.

Cabe destacar, que además del teórico efecto represor ejercido por la IRAK-M, expresada como consecuencia del primer estímulo con LPS, debe generarse una maquinaria, cuyos elementos desconocemos, durante ese primer estímulo con la endotoxina, que precondicione a los $\text{M}\phi$ para expresar

IRAK-M de manera muy rápida ante una segunda estimulación. Como se ha mencionado anteriormente, discutiremos un posible mecanismo implicado en este proceso.

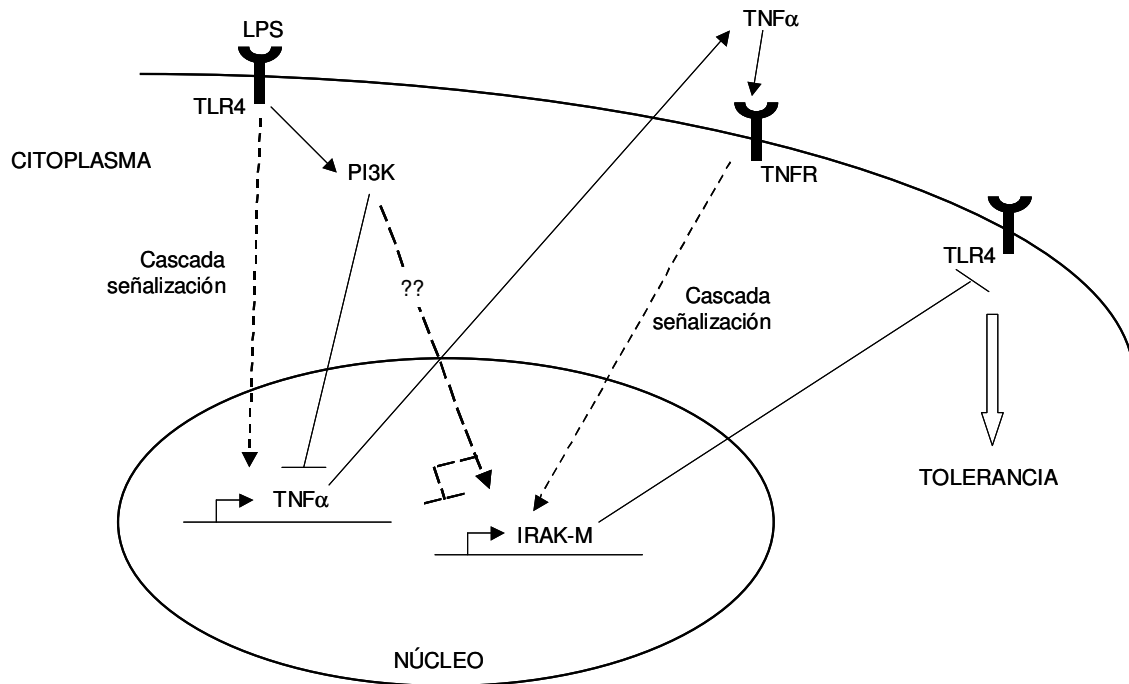


Figura D1. Esquema hipotético general de los mecanismos descritos implicados en la activación de IRAK-M en el proceso de tolerancia a endotoxina.

El LPS es reconocido por el TLR4, lo que activa una cascada de señalización que conduce a la producción de TNF α . Esta citoquina inflamatoria se libera al medio extracelular, donde es reconocida por su receptor (TNFR), lo que genera una ruta de señalización que termina activando la expresión de IRAK-M. La IRAK-M sintetizada, está disponible para bloquear una nueva cascada de señalización iniciada por TLR4, contribuyendo al estado de tolerancia. El reconocimiento inicial de LPS por parte de TLR4, induce la actividad PI3K, la cual es capaz de frenar la producción inicial de TNF α . Además cabe la posibilidad de que ejerza un efecto directo, de tipo bloqueante temprano o activador tardío sobre la expresión de IRAK-M.

Una vez estudiada la expresión de IRAK-M en el modelo *in vitro* de “TE”, buscamos ligar esos resultados a alguna patología, con el objetivo de validar *in vivo* nuestros datos. Para ello, realizamos el estudio de la expresión de IRAK-M en MØ aislados de pacientes diagnosticados con sepsis, patología en la que está descrita la entrada en estados de tolerancia (West, *et al*, 2002; Broad, *et al*, 2006). Partiendo de muestras de nueve pacientes, expusimos MØ de sangre periférica a LPS *ex vivo* durante una hora, evaluando inicialmente la expresión de TNF α . En cinco de estos nueve pacientes, los MØ no expresaron la citoquina inflamatoria, indicando que se encontraban dentro del marco de la “TE”. Por el contrario, el LPS indujo la expresión de TNF α en los MØ de los

cuatro pacientes restantes, mostrando un estado no tolerante. Seguidamente, testamos la expresión de IRAK-M en los MØ de los cinco pacientes tolerantes, observando una clara inducción de la pseudoquinasa (Figura R8), dándose incluso en un paciente (P3), en el que los niveles basales de IRAK-M eran elevados. Ese comportamiento es similar al que muestran MØ estimulados con LPS *in vitro* cuando han sido pre-tratados con la endotoxina, con una rápida inducción de IRAK-M sólo una hora después de iniciarse el segundo estímulo (Figura R4). Es decir, los datos obtenidos *ex vivo* en MØ de pacientes, avalan los resultados del modelo *in vitro*. Además esta observación presenta un claro valor clínico, ya que otorga a IRAK-M un potencial papel como indicador de tolerancia dentro de la patofisiología de la sepsis.

Cabe destacar que ese patrón de expresión, no es atribuible a un posible efecto de la medicación suministrada a estos pacientes, ya que en cuatro de los seleccionados inicialmente, al exponer sus MØ al LPS no observamos un comportamiento tolerante (se indujo TNF α), pero tampoco se expresó de manera significativa IRAK-M.

Resumiendo, IRAK-M presenta una cinética de expresión particular en el modelo de “TE” (Figura R4), que concuerda con su rápida inducción en los MØ procedentes de pacientes tolerantes (Figura R8). Es decir, ese particular patrón de expresión de IRAK-M se da en el marco de una patología que muestra un proceso de tolerancia, de modo que nuestros datos *in vitro* reflejan una situación real.

Atendiendo a un principio de economía celular, agresiones muy diferentes contra el sistema inmune innato, conducen a la activación de las mismas cascadas de señalización (Akira, *et al*, 2006; Page, *et al*, 2006). Además, patógenos tan diferentes como virus (Bowie, 2007), bacterias (Fan, *et al*, 2004) y tumores (Mytar, *et al*, 2003) son capaces de inducir procesos de tolerancia fenotípicamente similares. Partiendo de estos hechos, cabe hipotetizar que los mecanismos que subyacen en el desarrollo de esos procesos tolerantes sean compartidos. Por ello, una vez observada la regulación en la expresión de IRAK-M en el contexto de la “TE”, nos planteamos estudiar a esta pseudoquinasa en un modelo de “TT”.

En este modelo, de manera similar a como ocurre en la “TE”, los MØ generan una respuesta inflamatoria al co-cultivarse con células tumorales. Sin embargo, esa respuesta se atenúa si existe un encuentro anterior de los MØ con el mismo tipo celular (Mytar, *et al*, 2003). Muestra de este efecto en nuestros resultados, es la menor producción de TNF α inducida por el primer co-cultivo de 6 líneas tumorales diferentes y MØ (Figura R9). Además, ese resultado es específico del co-cultivo con células tumorales, ya que no se da con fibroblastos ni linfocitos primarios.

Hay que considerar, que en el caso de la “TE”, se trata de un mecanismo fisiológico para frenar una respuesta inflamatoria exagerada. Si bien, el significado biológico de la “TT” puede ser doble. De un lado, se puede considerar como un mecanismo empleado por las células tumorales para evadir el ataque inmune. En este sentido, existen autores que postulan que las células tumorales, inducen cambios en el sistema inmune innato para contribuir a la progresión tumoral (Mantovani, *et al*, 2006; Sica, *et al*, 2006). Pero también a medida que se profundiza en la relación existente entre inflamación y cáncer (De marzo, *et al*, 2007; Okamoto, *et al*, 2007), la “TT” adquiere un significado fisiológico, con el objetivo de reducir los procesos inflamatorios generados por los fenómenos tumorales, análogamente a como ocurre en el contexto de la “TE”.

Debemos mencionar, que en los resultados de expresión a nivel transcripcional mostrados a partir de la figura R10, utilizamos para normalizar el ARN ribosómico 18S, mientras que hasta ese punto, se había utilizado el ARN correspondiente a la β -actina. Este cambio vino motivado por el modelo experimental de la “TT”. En cada punto de este modelo, debíamos realizar dos aislamientos magnéticos de células CD14+, según lo indicado en el punto 2.2.c. En estos procesos existía una pérdida de material biológico que tenía como consecuencia, disponer de una cantidad limitada de ARN para realizar las cuantificaciones oportunas por PCR cuantitativa. Empleando para normalizar la cuantificación del ARN correspondiente a la β -actina, los valores obtenidos quedaban en la franja inferior de la curva estándar para dicho gen, corriendo el riesgo de perder fiabilidad en la cuantificación. Por ello, buscamos

para normalizar un ARN cuya expresión fuese mayor, como era el caso del ARN ribosómico 18S.

Una vez establecido el modelo de “TT”, procedimos a estudiar la expresión de IRAK-M en el mismo. El co-cultivo de MØ con las diferentes líneas tumorales indujo la expresión de la pseudoquinasa, observándose un máximo a las 6 horas de iniciarse el estímulo (Figura R10). Sin embargo, MØ pre-tratados con el mismo tipo de células tumorales, mostraron un adelanto en la inducción de IRAK-M, detectándose un máximo de expresión sólo dos horas después de iniciarse el segundo co-cultivo (Figura R11). Este hecho sugiere que la primera exposición de los MØ a las células tumorales, no solo genera una respuesta inflamatoria temprana (Figura R12) y activa la expresión de IRAK-M, sino que también genera un mecanismo que preconditiona a esos MØ, de modo que en un segundo co-cultivo, se acelera la expresión de IRAK-M.

Este efecto es muy específico del co-cultivo con células tumorales, ya que fibroblastos y linfocitos primarios no inducen la expresión de la pseudoquinasa (Figura R10), ni preconditionan a los MØ para que se dé el adelanto de la expresión de IRAK-M, ante un segundo co-cultivo con células tumorales (Figura R11).

La cinética de expresión acelerada de IRAK-M en MØ preconditionados, es muy similar a la observada en el modelo de “TE” (Figura R4), sugiriendo que se trata de un mecanismo universal en el desarrollo de procesos tolerantes. Estos resultados, unidos a los publicados en otros trabajos (Kobayashi, *et al*, 2002; Nakayama, *et al*, 2004; Deng, *et al*, 2006), señalan a IRAK-M como un elemento central implicado en la desactivación de la respuesta inflamatoria.

Como se ha indicado, tanto en el modelo de “TE” como en el de “TT”, el primer estímulo proinflamatorio, debe generar una maquinaria que permita la rápida transcripción de IRAK-M tras el segundo estímulo. Un mecanismo que podría explicar esa rápida transcripción, es que la primera estimulación genere cambios epigenéticos a nivel de cromatina. Estas modificaciones, pueden preconditionar a determinados genes para ser rápidamente transcritos tras un segundo estímulo, mientras que también pueden ser responsables del

silenciamiento de otros genes, entre ellos genes pro-inflamatorios durante el desarrollo de “TE” (Foster, *et al*, 2007). Este mecanismo se ha asociado en concreto al silenciamiento del TNF α durante este proceso (El Gazzar, *et al*, 2007). Estos mecanismos constituyen una de las líneas de continuación de nuestro trabajo.

Con el objetivo de comprobar el potencial efecto de IRAK-M en el modelo de “TT”, realizamos experimentos de silenciamiento génico de la pseudoquinasa, en M \emptyset a los que impusimos el modelo de “TT”. Los resultados obtenidos indican que al reducir la expresión de IRAK-M, se revierte el fenotipo tolerante. Esto es, un primer co-cultivo de células tumorales y M \emptyset , no logra reducir la respuesta inflamatoria inducida por un segundo estímulo de idénticas características (Figura R14). Es decir, al reducir la expresión de IRAK-M no se da el fenómeno de “TT”, confirmando el papel central de la pseudoquinasa en el proceso tolerante. Nuestros datos vienen a confirmar en humanos, la importancia de IRAK-M en los procesos de tolerancia, ya indicada en la descripción del ratón knock-out para la pseudoquinasa (Kobayashi, *et al*, 2002) y por diversos modelos de “TE” *in vitro* en roedores (Nakayama, *et al*, 2004; Pathak, *et al*, 2005)

En este punto, decidimos profundizar en el mecanismo por el cual las células tumorales inducen la expresión de IRAK-M. En base a experimentos en los que co-cultivamos los M \emptyset con células tumorales fijadas, llegamos a la conclusión de que existen elementos unidos a las membranas de estas células, que inducen la expresión de la pseudoquinasa (Figura R15.A). También expusimos los M \emptyset a medio suplementado con sobrenadante de cultivos tumorales, observando que existen factores solubles producidos por dichas células, implicados en la inducción de IRAK-M (Figura R15.B). Cabe destacar que en estos dos experimentos, el máximo de expresión de IRAK-M se alcanzó a las 3 horas de estímulo, mientras en el caso de los co-cultivos, ese máximo se daba a las 6 horas (Figura R10). Esta discordancia podría explicarse por la existencia en los co-cultivos de algún factor que retrase la cascada de señalización, de modo que en el caso de los experimentos con células fijadas, no se da y por ello el adelanto en la expresión de IRAK-M. Otro factor a tener en cuenta en los experimentos con medio suplementado tumoral, es que en

ese medio ya se encuentran los factores solubles inductores de IRAK-M, mientras que en los co-cultivos, estos elementos deben generarse, lo que retardaría el efecto.

En los experimentos con medio suplementado tumoral, el grado de inducción de IRAK-M fue un tercio menor que el alcanzado por los co-cultivos (comparar Figuras R10 y R15.B). Este hecho puede explicarse porque el medio suplementado está condicionado con solo un 20 % de sobrenadante tumoral, con lo que la concentración del factor o factores solubles implicados en la inducción de IRAK-M, estará notoriamente disminuida, reduciéndose su efecto.

Considerando los parámetros que hasta este punto conocíamos del factor o factores inductor/es de IRAK-M en los co-cultivos, el AH se mostraba como un firme candidato debido a las siguientes características:

- Es producido por células tumorales (Kim, *et al*, 2004).
- Está presente en la membrana de dichas células y también es liberado al medio (Toole, 2004).
- Interacciona y es reconocido por receptores de membrana específicos presentes en la superficie de MØ, como son el CD44 (Ahrens, *et al*, 2001; Martin, *et al*, 2003) y el TLR4 (Akira, *et al*, 2004).

De esta forma, testamos el efecto del AH sobre MØ, observando que efectivamente, induce la expresión de IRAK-M a partir de las primeras 3 horas de estímulo (Figura R16.A). Ese tiempo necesario de estimulación, concuerda con el observado en los experimentos realizados con medio suplementado tumoral y células tumorales fijadas (Figura R15). A estos resultados hay que unir que el AH induce la expresión de TNF α en MØ, de un modo muy similar a como lo hace un co-cultivo con células tumorales (Figura R16.B) y que la inducción de IRAK-M a nivel proteico por el glucosaminglucano, es muy parecida a todas las condiciones testadas anteriormente (Figura R17). Todo ello sugiere que efectivamente, el AH puede ser el responsable de la inducción de IRAK-M en los co-cultivos de células tumorales y MØ.

Mencionar que las dos concentraciones de AH testadas, 100 y 200 μ g/ml, indujeron la expresión de IRAK-M de un modo similar (Figura R16.A). Este hecho sugiere, análogamente a como ocurría en el caso de la "TE" con el

LPS, que el sistema está saturado con la menor concentración de AH, la cual es suficiente para inducir su efecto específico. Por ello en los restantes experimentos, utilizamos la concentración menor para testar las consecuencias de la exposición de MØ a AH.

Indicar también que el grado de inducción de IRAK-M logrado por la exposición de MØ a AH, es similar al alcanzado en co-cultivos con las células tumorales A431 (comparar Figuras R10 y R16.A). Este dato refuerza el uso de este tipo celular en nuestro modelo. Sin embargo, los co-cultivos con otras líneas tumorales como MCF7 o HL60, indujeron en mayor grado la expresión de IRAK-M (Figura R10). Este hecho podría ser atribuido a una diferente producción de AH, tanto a nivel de cantidad como de la longitud de los fragmentos generados. Como se ha comentado previamente (ver punto 1.1.d), moléculas de diferente tamaño del glucosaminglucano, pueden mostrar efectos distintos (Stern, *et al*, 2006). En cualquier caso, el efecto global del AH sobre MØ humanos en nuestro estudio, es muy similar al inducido por los co-cultivos con células tumorales (comparar R16 con R10 y R12).

Con el objetivo de comprobar la implicación del AH en la inducción de la “TT”, impusimos a MØ las condiciones del modelo de tolerancia, utilizando como estímulo la incubación de los mismos con AH. El resultado indicó que un pre-tratamiento de los MØ con AH, reducía la expresión de TNF α inducida por un único estímulo con el glucosaminglucano (Figura R18). Es decir, el AH presenta la capacidad de inducir un estado tolerante. Este fenómeno adquiere gran relevancia, si consideramos que la detección de AH en pacientes con determinados tipos tumorales, es considerado un factor de pronóstico desfavorable (Franzmann, *et al*, 2003; Bertrand, *et al*, 2005). Estos datos permiten hipotetizar que la inducción por parte del AH tumoral de estados de tolerancia, podría ser un mecanismo crítico en la evasión de la respuesta inmune que se da en estas patologías.

Para comprobar que la inducción de “TT” por el AH está mediada por la activación de IRAK-M, realizamos experimentos de silenciamiento génico de la pseudoquinasa. Los resultados indicaron que la reducción de la expresión de IRAK-M, revierte el fenotipo tolerante inducido por el AH (Figura R18). Este

dato sitúa a IRAK-M, como mediador central del proceso tolerante inducido por el AH, en el modelo de "TT".

Mencionar en este punto, que los efectos inducidos por el AH descritos hasta ahora, no pueden ser atribuidos a posibles contaminaciones con LPS de las soluciones de AH, ya que todas ellas están testadas en cuanto a estar libres de endotoxina (ver Materiales y métodos).

Como hemos mencionado anteriormente, existen al menos dos receptores descritos capaces de reconocer de manera específica al AH, el CD44 (Martin, *et al*, 2003) y el TLR4 (Akira, *et al*, 2004). Por ello quisimos saber si estos dos receptores, están implicados en la inducción de IRAK-M por el AH. Con este objetivo, pre-tratamos a MØ con diferentes dosis de anticuerpos bloqueantes contra sendos receptores, y posteriormente los estimulamos con AH, cuantificando después la expresión de IRAK-M. Los resultados muestran una inhibición dosis-dependiente de la inducción de la pseudoquinasa, con el pre-tratamiento con ambos anticuerpos (Figura R19). Este efecto es específico, ya que no se observó cuando el pre-tratamiento se realizó con un anticuerpo bloqueante contra TLR2. Estos datos indican que la inducción de IRAK-M por AH, se realiza a través tanto de CD44 como de TLR4.

Profundizando aún más en la implicación de los dos receptores en la inducción de IRAK-M, evaluamos el efecto del bloqueo de ambos, en la inducción de la pseudoquinasa por un co-cultivo de MØ y células tumorales. De nuevo realizamos un pre-tratamiento de los MØ, en este caso con las menores concentraciones de anticuerpos bloqueantes utilizadas, introduciendo un nuevo punto experimental donde el pre-tratamiento se realizó con los dos anticuerpos a la vez. El resultado fue similar al anterior, con una clara reducción en la expresión de IRAK-M al bloquear cada uno de los dos receptores (Figura R20). Además, en el caso del bloqueo conjunto de ambos, observamos un efecto aditivo en ese efecto. Estos datos indican que la inducción de IRAK-M lograda por un co-cultivo de células tumorales y MØ, está mediada por CD44 y TLR4, muy probablemente a través del AH generado por las células tumorales.

Englobando todos los datos obtenidos en el contexto de la “TT”, podríamos ilustrar un esquema general de los mecanismos implicados en este proceso (Figura D2).

Las células tumorales producen AH que, ya sea anclado a sus membranas o liberado al medio como factor soluble, es reconocido por los MØ a través de los receptores CD44 y TLR4. Esos receptores inician una cascada de señalización que conduce en último término a la expresión de IRAK-M. También ha de generar un mecanismo que precondicione a los MØ, permitiendo una rápida inducción de la pseudoquinasa ante un segundo estímulo con AH. La producción de IRAK-M y su efecto, media en la caída en un estado de tolerancia ante esa segunda estimulación.

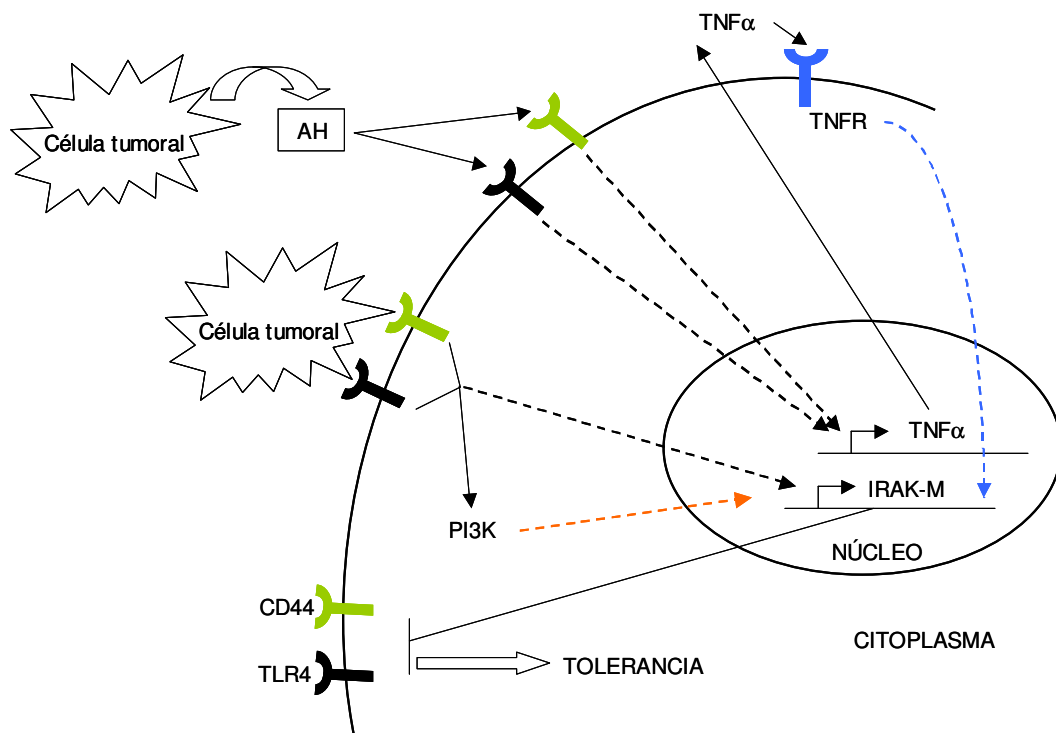


Figura D2. Esquema hipotético general de los posibles mecanismos implicados en la activación de IRAK-M en el proceso de tolerancia a tumores.

El AH unido a las membranas de las células tumorales o liberado al medio por ellas, es reconocido por los receptores CD44 y TLR4 en la superficie de los MØ. Esto activa una cascada de transducción de señal, que conduce a la producción inicial de TNFα, y a la inducción en segundo término de IRAK-M. Esta IRAK-M estará entonces disponible para bloquear una nueva cascada de señalización iniciada por CD44 y TLR4, induciendo el estado de tolerancia. El TNFα producido inicialmente, podría estar implicado en la inducción de IRAK-M y también la actividad PI3K, ya que el reconocimiento de AH por CD44, activa a esta enzima. Estos dos últimos datos, están indicados con líneas discontinuas de colores naranja y azul, ya que indican vías de señalización implicadas en la activación de IRAK-M, descritas en el presente trabajo en el contexto de la “TE”. Se extrapolan a este esquema para explicar un hipotético mecanismo global de la activación de IRAK-M, en el contexto de la “TT”.

Las cascadas de señalización iniciadas por TLR4 y CD44 pueden ser individuales, teniendo un efecto propio sobre la expresión de IRAK-M, o bien pueden confluir en algún elemento, ejerciendo un efecto conjunto. Una posible vía de confluencia entre ambas rutas de señalización, es la activación de PI3K. El reconocimiento por parte de CD44 de su ligando específico, conduce a la activación de esta enzima (Ponta, *et al*, 2003) y en el presente trabajo hemos descrito que PI3K está implicada en el control de la expresión de IRAK-M (ver punto 3.2.c.i). También merece consideración el hecho de que AH, induce la producción de TNF α y que nuestros datos indican que esta citoquina inflamatoria es capaz de inducir la expresión de IRAK-M (Figura R7). Esta ruta también podría estar implicada en el proceso de inducción de la pseudoquinasa en el modelo de "TT".

De manera análoga a como ocurría en el modelo de "TE" con M \emptyset aislados de pacientes sépticos, los datos obtenidos de células CD14+ en pacientes con diversos procesos tumorales, avalan nuestros datos *in vitro* del modelo de "TT". Partiendo de esas células aisladas desde sangre periférica, observamos que en pacientes con un tumor localizado, donde el contacto entre los M \emptyset circulantes y las células tumorales es limitado, no se expresa IRAK-M y sí, de manera muy ligera TNF α . Similar es el comportamiento de M \emptyset procedentes de donantes sanos, donde no se expresan ni IRAK-M ni TNF α . Sin embargo, en los casos de procesos cancerosos con células tumorales circulantes, como la leucemia y cáncer de colon metastásico, los M \emptyset expresan IRAK-M pero no TNF α . Es decir, el contacto continuo o al menos frecuente de células tumorales con M \emptyset *in vivo*, induce en éstos la expresión de IRAK-M, tal y como observamos en el modelo *in vitro*. Estos datos obtenidos *in vivo*, refuerzan la validez de todos aquellos obtenidos por nuestro modelo de "TT", otorgándoles además un importante valor clínico como potencial marcador de tolerancia, dentro de la patofisiología de determinados tipos de cáncer.

Existe un creciente interés sobre IRAK-M, como elemento regulador de la respuesta inmune en el contexto de patologías tumorales. Este hecho es patente por los resultados mostrados en el presente trabajo, tanto en un modelo de "TT" *in vitro*, como en muestras tomadas de pacientes con procesos cancerosos. Además, se ha visto que ratones knock-out para IRAK-M, son

resistentes al crecimiento de tumores, mostrando sus células inmunes un efecto antitumoral, implicando a la pseudoquinasa no sólo en la regulación del sistema inmune innato, sino también ejerciendo un papel en el desarrollo del sistema inmune adaptativo (Xie, *et al*, 2007).

A modo de resumen, en un contexto tumoral las células cancerosas producen AH, que es reconocido en la superficie de los MØ a través de los receptores CD44 y TLR4. Ese reconocimiento específico genera una respuesta inflamatoria inicial, y la expresión de IRAK-M en segundo término.

La pseudoquinasa en este modelo de “TT”, presenta una cinética de expresión particular, muy similar a la mostrada en el modelo de “TE”. Este hecho sugiere que ese patrón de inducción de IRAK-M, juega un papel clave en el desarrollo de procesos tolerantes.

La implicación de IRAK-M en dos fenómenos análogos de tolerancia, con un claro reflejo fisiopatológico en patologías como la sepsis y el cáncer, otorgan a esta pseudoquinasa una gran relevancia clínica. La vinculación de IRAK-M en base a análisis de ligamiento, con una patología caracterizada por una inflamación crónica, como es el asma (Balaci, *et al*, 2007), redundará en la importancia de esta molécula desde un punto de vista clínico. El conocimiento profundo de los mecanismos implicados en su inducción y de la forma precisa en que actúa reduciendo la respuesta inflamatoria, permitirán definitivamente considerar a la IRAK-M como una potencial diana terapéutica.

CONCLUSIONES

5.- Conclusiones

Primera: El LPS induce la expresión de IRAK-M en MØ humanos. Dos elementos implicados en dicha inducción, al menos a nivel transcripcional, son la actividad PI3K y la citoquina inflamatoria TNF α .

Segunda: Diferentes células tumorales inducen la expresión de IRAK-M en MØ humanos. Esa inducción está mediada por AH liberado al medio extracelular y anclado a las membranas de las células tumorales. En el reconocimiento del AH por parte de los MØ humanos, intervienen de manera específica los receptores CD44 y TLR4.

Tercera: IRAK-M es crítica en el desarrollo de la “TT” inducida tanto por células tumorales como por AH, ya que su silenciamiento génico inhibe el desarrollo del proceso tolerante.

Cuarta: Tanto en el modelo de “TE” como en el de “TT”, IRAK-M presenta un patrón de expresión común, existiendo una inducción acelerada de la pseudoquinasa en el marco de ambos procesos tolerantes.

Quinta: Destacando la relevancia clínica de los datos obtenidos, el comportamiento observado de IRAK-M en modelos *in vitro* de “TE” y “TT”, concuerda con el que se da, respectivamente, en pacientes con sepsis y en pacientes con diversos procesos tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

6.- Bibliografía

Abreu, M., Arditi, M. (2004). Innate immunity and Toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *Journal of Pediatrics* 144, 421 - 429.

Ahrens, T., Assmann, V., Fieber, C., Termeer, C., Herrlich, P., Hofmann, M., Simon, J. (2001). CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *The Journal of Investigative Dermatology* 116, 93 - 101.

Akashi-Takamura, S., Miyake, K. (2006). Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *Journal of Infection and Chemotherapy* 12, 233 - 240.

Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews in Immunology* 4, 499 - 511.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783 - 801.

Aneja, R., Odoms, K., Dunsmore, K., Shanley, T., Wong, H. (2006). Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *Journal of Immunology* 177, 7184 - 7192.

Ariyoshi, W., Takahashi, T., Kanno, T., Ichimiya, H., Takano, H., Koseki, T., Nishihara, T. (2005). Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. *Journal of Biological Chemistry* 280, 18967 - 18972.

Balaci, L., Spada, M., Olla, N., Sole, G., Loddo, L., Anedda, F., Naitza, S., Zuncheddu, M., Maschio, A., Altea, D., Uda, M., Pilia, S., Sanna, S., Masala, M., Crisponi, L., Fattori, M., Devoto, M., Doratiotto, S., Rassu, S., Mereu, S., Giua, E., Cadeddu, G., Atzeni, R., Pelosi, U., Corrias, A., Perra, R., Torrazza, P., Pirina, P., Ginesu, F., Marcias, S., Schintu, M., Del Giacco, G., Manconi, P., Malerba, G., Bisognin, A., Trabetti, E., Boner, A., Pescollderungg, L., Pignatti, P., Schlessinger, D., Cao, A., Pilia, G. (2007). IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *American Journal of Human Genetics* 80, 1103 - 1114.

Benjamin, C., Hogaboam, C., Kunkel, S. (2004). The chronic consequences of severe sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 408 - 412.

Berg, D., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, W., Menon, S., Davidson, N., Grunig, G., Rennick, D. (1995). Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *Journal of Clinical Investigation* 96, 2339 - 2347.

Bertrand, P., Courel, M., Maingonnat, C., Jardin, F., Tilly, H., Bastard, C. (2005). Expression of HYAL2 mRNA, hyaluronan and hyaluronidase in B-cell non-Hodgkin lymphoma: relationship with tumor aggressiveness. *International Journal of Cancer* 113, 207 - 212.

Biswas, S., Bist, P., Dhillon, M., Kajiji, T., del Fresno, C., Yamamoto, M., López-Collazo, E., Akira, S., Tergaonkar, V. (2007). Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *Journal of Immunology* 179, 4083 – 4092.

Bol, G., Kreuzer, O., Brigelius-Flohe, R. (2000). Translocation of the interleukin-1 receptor associated kinase-1 (IRAK-1) into the nucleus. *FEBS Letters* 477, 73 - 78.

Bone, R., Balk, R., Cerra, F., Dellinger, R., Fein, A., Knaus, W., Schein, R., Sibbald, W. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644 - 1655.

Bowie, A. (2007). Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clinical and Experimental Immunology* 147, 217 - 226.

Broad, A., Jones, D., Kirby, J. (2006). Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Current Medicinal Chemistry* 13, 2487 - 2502.

Calvano, J., Bowers, D., Coyle, S., Macor, M., Reddell, M., Kumar, A., Calvano, S., Lowry, S. (2006). Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the Toll-like receptor 4 (hTLR4). *Clinical Immunology* 121, 186 - 190.

Calvano, S., Xiao, W., Richards, D., Felciano, R., Baker, H., Cho, R., Chen, R., Brownstein, B., Cobb, J., Tschoeke, S., Miller-Graziano, C., Moldawer, L., Mindrinos, M., Davis, R., Tompkins, R., Lowry, S. (2005). A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437, 1032 – 1037.

Calzado, M., Bacher, S., Schmitz, M. (2007). NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Current Medicinal Chemistry* 14, 367 - 376.

Cao, Z., Henzel, W., Gao, X. (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128 - 1131.

Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P., Bowie, A. (2006). The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signalling. *Nature Immunology* 7, 1074 - 1081.

Cavaillon, J., Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care* 10, 233 - 241.

Chapel, H., Puel, A., von Bernuth, H., Picard, C., Casanova, J. (2005). Shigella sonnei meningitis due to interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency: first association with a primary immune deficiency. *Clinical Infectious Diseases* 40, 1227 - 1231.

Chen, R., Alvero, A., Silasi, D., Mor, G. (2007). Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *American Journal of Reproductive Immunology* 57, 93 - 107.

Chiu, R., Droll, A., Cooper, D., Dougherty, S., Dirks, J., Dougherty, G. (1995). Molecular mechanisms regulating the hyaluronan binding activity of the adhesion protein CD44. *Journal of Neurooncology* 26, 231 - 239.

Choi, E., Jang, H., Kim, J., Kim, H., Kang, H., Paek, Y., Lee, H., Lee, S., Oh, W., Kang, I. (2006). Enhancement of cytokine-mediated NF-kappaB activation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in monocytic cells. *International Immunopharmacology* 6, 908 - 915.

Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, J., Kohara, Y., Ewbank, J. (2004). TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nature Immunology* 5, 488 - 494.

Cui, W., Ke, J., Zhang, Q., Ke, H., Chalouni, C., Vignery, A. (2006). The intracellular domain of CD44 promotes the fusion of macrophages. *Blood* 107, 796 - 805.

David, M., Cochrane, C., Duncan, S., Schrader, J. (2005). Pure lipopolysaccharide or synthetic lipid A induces activation of p21Ras in primary macrophages through a pathway dependent on Src family kinases and PI3K. *Journal of Immunology* 175, 8236 - 8241.

Day, N., Tangsinmankong, N., Ochs, H., Rucker, R., Picard, C., Casanova, J., Haraguchi, S., Good, R. (2004). Interleukin receptor-associated kinase (IRAK-4) deficiency associated with bacterial infections and failure to sustain antibody responses. *Journal of Pediatrics* 144, 524 - 526.

De Marzo, A., Platz, E., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C., Nakai, Y., Isaacs, W., Nelson, W. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews in Cancer* 7, 256 - 269.

del Fresno, C., Soler-Rangel, L., Soares-Schanoski, A., Gómez-Piña, V., González-León, M., Gómez-García, L., Mendoza-Barberá, E., Rodríguez-Rojas, A., García, F., Fuentes-Prior, P., Arnalich, F., López-Collazo, E. (2007). Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *Journal of Endotoxin Research* 13, 39 - 52.

Deng, J., Cheng, G., Newstead, M., Zeng, X., Kobayashi, K., Flavell, R., Standiford, T. (2006). Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *Journal of Clinical Investigation* 116, 2532 - 2542.

Ehlers, M., Ravetch, J. (2007). Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends in Immunology* 28, 74 - 79.

El Gazzar, M., Yoza, B., Hu, J., Cousart, S., McCall, C. (2007). Epigenetic silencing of TNF α during endotoxin tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26857 – 26864.

Engelhardt, R., Mackensen, A., Galanos, C., Andreesen, R. (1990). Biological response to intravenously administered endotoxin in patients with advanced cancer. *Journal of Biological Response Modifiers* 9, 480 - 491.

Faber, J., Meyer, C., Gemmer, C., Russo, A., Finn, A., Murdoch, C., Zenz, W., Mannhalter, C., Zabel, B., Schmitt, H., Habermehl, P., Zepp, F., Knuf, M. (2006). Human toll-like receptor 4 mutations are associated with susceptibility to invasive meningococcal disease in infancy. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 25, 80 -81.

Fan, H., Cook, J. (2004). Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Journal of Endotoxin Research* 10, 71 - 84.

Fitzgerald, K., Palsson-McDermott, E., Bowie, A., Jefferies, C., Mansell, A., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78 - 83.

Foster, S., Hargreaves, D., Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447, 972 – 978.

Franzmann, E., Schoeder, G., Goodwin, W., Weed, D., Fisher, P., Lokeshwar, V. (2003). Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *International Journal of Cancer* 106, 438 - 445.

Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T., Koyasu, S. (2002). PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nature Immunology* 3, 875 - 881.

Fukao, T., Koyasu, S. (2003). PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends in Immunology* 24, 358 - 363.

Gharbi, S., Zvelebil, M., Shuttleworth, S., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J., Waterfield, M. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *The Biochemical Journal* 404, 15 - 21.

Gotte, M., Yip, G. (2006). Heparanase, hyaluronan and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Research* 66, 10233 - 10237.

Grütz, G. (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 3 - 15.

Guha, M., Mackman, N. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 32124 - 32132.

Guo, F., Li, Y., Wu, S. (1999). Antisense IRAK-2 oligonucleotide blocks IL-1-stimulated NF-kappaB activation and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells. *Inflammation* 23, 535 - 543.

Gupta, S., Datta, K. (1991). Possible role of hyaluronectin on cell adhesion in rat histiocytoma. *Experimental Cell Research* 195, 386 - 394.

Harada, K., Isse, K., Sato, Y., Ozaki, S., Nakanuma, Y. (2006). Endotoxin tolerance in human intrahepatic biliary epithelial cells is induced by upregulation of IRAK-M. *Liver International* 26, 935 - 942.

Hayden, M., West, A., Ghosh, S. (2006). NF-kB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758 - 6780.

Hayer, S., Steiner, G., Gortz, B., Reiter, E., Tohidast-Akrad, M., Amling, M., Hoffman, O., Redlich, K., Zwerina, J., Skriner, K., Hilberg, F., Wagner, E., Smolen, J., Schett, G. (2005). CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. *Journal of Experimental Medicine* 201, 903 - 914.

Hirasawa, N., Torigoe, M., Kano, K., Ohuchi, K. (2006). Involvement of Sp1 in lipopolysaccharide-induced expression of HDC mRNA in RAW264 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, 833 - 837.

Huang, Y., Li, T., Sane, D., Li, L. (2004). IRAK-1 serves as a novel regulator essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-10 gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 279, 51697 - 51703.

Huang, Y., Misior, A., Li, L. (2005). Novel role and regulation of the Interleukin-1 Receptor Associated Kinase (IRAK) family proteins. *Cellular and Molecular Immunology* 2, 36 - 39.

Janssens, S., Beyaert, R. (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Molecular Cell* 11, 293 - 302.

Kanakaraj, P., Schafer, P., Cavender, D., Wu, Y., Ngo, K., Grealish, P., Wadsworth, S., Peterson, P., Siekierka, J., Harris, C., Fung-Leung, W. (1998). Interleukin(IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *Journal of Experimental Medicine* 187, 2073 - 2079.

Karp, C., Wysocka, M., Ma, X., Marovich, M., Factor, R., Nutman, T., Armant, M., Wahl, L., Cuomo, P., Trinchieri, G. (1998). Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *European Journal of Immunology* 28, 3128 - 3136.

Kim, H., Wheeler, M., Wilson, C., Iida, J., Eng, D., Simpson, M., McCarthy, J., Bulland, K. (2004). Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44. *Cancer Research* 64, 4569 - 4576.

Kim, T., Staschke, K., Bulek, K., Yao, J., Peters, K., Oh, K., Vandenberg, Y., Xiao, H., Quian, W., Hamilton, T., Min, B., Sen, G., Gilmour, R., Li, X. (2007). A critical role for IRAK4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity. *Journal of Experimental Medicine* 204, 1025 - 1036.

Kobayashi, K., Hernández, L., Galán, J., Janeway C., Medzhitov, R., Flavell, R. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110, 191 - 202.

Kobayashi, K., Flavell, A. (2004). Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 428 - 433.

Konety, B. (2006). Molecular markers in bladder cancer: a critical appraisal. *Urologic Oncology* 24, 326 - 337.

Kumar, S., Jack, R. (2006). Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. *Journal of Endotoxin Research* 12, 278 - 284.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J., Hoffmann, J. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973 - 983.

Levy, M., Fink, M., Marshall, J., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S., Vincent, J., Ramsay, G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine* 29, 530 - 538.

Li, S., Strelow, A., Fontana, E., Wesche, H. (2002). IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99, 5567 - 5572.

Li, H., Cuartas, E., Cui, W., Choi, Y., Crawford, T., Ke, H., Kobayashi, K., Flavell, R., Vignery, A. (2005). IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. *Journal of Experimental Medicine* 201, 1169 - 1177.

Locksley, R., Killeen, N., Lenardo, M. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487 - 501.

Lord, K., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D. (1990). Complexity of the immediate early response of myeloid cells to terminal differentiation and growth arrest includes ICAM-1, Jun-B and histone variants. *Oncogene* 5, 387 - 396.

López-Bojorquez, L., Dehesa, A., Reyes-Teran, G. (2004). Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of septic shock. *Archives of Medical Research* 35, 465 - 479.

López-Collazo, E., Fuentes-Prior, P., Arnalich, F., del Fresno, C. (2006). Physiopathology of interleukin-1 receptor-associated kinase M: Implications in refractory state. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19, 237 - 244.

Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., Sica, A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Reviews* 25, 315 - 322.

Martin, M., Böl, G., Eriksson, A., Resch, K., Brigelius-Flohe, R. (1994). Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *European Journal of Immunology* 24, 1566 - 1571.

Martin, T., Harrison, G., Mansel, E., Jiang, W. (2003). The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 46, 165 - 186.

McDonald, D., Brown, D., Bonilla, F., Geha, R. (2006). Interleukin receptor-associated kinase-4 deficiency impairs Toll-like receptor-dependent innate antiviral immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118, 1357 - 1362.

McGettrick, A., O'Neill, L. (2004). The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Molecular Immunology* 41, 577 - 582.

Medvedev, A., Lentschat, A., Kuhns, D., Blanco, J., Salkowski, C., Zhang, S., Arditi, M., Gallin, J., Vogel, S. (2003). Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *Journal of Experimental Medicine* 198, 521 - 531.

Medzhitov, R., Janeway, C. Jr (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in Immunology* 10, 351 - 353.

Miyake, K. (2006). Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* 12, 195 - 204.

Mockenhaupt, F., Cramer, J., Hamann, L., Stegemann, M., Eckert, J., Oh, N., Otchwemah, R., Dietz, E., Ehrhardt, S., Schroder, N., Bienzle, U., Schumann, R. (2006). Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103, 177 - 182.

Mordmüller, B., Krappmann, D., Esen, M., Wegener, E., Scheidereit, C. (2003). Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF- κ B-p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO Reports* 4, 82 - 87.

Muzio, M., Ni, P., Feng, P., Dixit, V. (1997). IRAK (Pelle) family members IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612 - 1615.

Mytar, B., Woloszyn, M., Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Ruggiero, I., Wieckiewicz, J., Zembala, M. (2003). Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 74, 1094 - 1101.

Nakano, Y., Kuroda, E., Kito, T., Yokota, A., Yamashita, U. (2006). Induction of macrophagic prostaglandin E2 synthesis by glioma cells. *Journal of Neurosurgery* 104, 574 - 582.

Nakayama, K., Okugawa, S., Yanagimoto, S., Kitazawa, T., Tsukada, K., Kawada, M., Kimura, S., Hirai, K., Takagaki, Y., Ota, Y. (2004). Involvement of IRAK-M in peptidoglycan-induced tolerance in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6629 - 6634.

Naor, D., Sionov, R., Ish-Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research* 71, 241 - 319.

Neumann, D., Kollwe, C., Resch, K., Martin, M. (2007). The death domain of IRAK-1: an oligomerization domain mediating interactions with MyD88, Tollip, IRAK-1 and IRAK-4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 1089 - 1094.

Neurath, M., Becker, C., Barbulescu, K. (1998). Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 43, 856 - 860.

O'Neill, L., Bowie, A. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews in Immunology* 7, 353 - 364.

Okamoto, T., Sanda, T., Asamitsu, K. (2007). NF- κ B signaling and carcinogenesis. *Current Pharmaceutical Design* 13, 447 - 462.

Osarogiagbon, U., McGlave, P. (1999). Chronic myelogenous leukemia. *Current Opinion in Hematology* 6, 241 - 246.

Page, K., Scott, A., Manabe, Y. (2006). The expanding realm of heterologous immunity: friend or foe?. *Cellular Microbiology* 8, 185 - 196.

Pathak, S., Basu, S., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Kundu, M., Basu, J. (2005). Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent interleukin-12p40 production in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42794 - 42800.

Peck, O., Zingarelli, B., Fan, H., Teti, G., Tempel, G., Halushka, P., Cook, J. (2006). The phosphatidylinositol 3 kinase pathway regulates tolerance to lipopolysaccharide and priming responses to *Staphylococcus aureus* and lipopolysaccharide. *Shock* 26, 31 - 36.

Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 4, 33 - 45.

Prehm, P. (1983). Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase. *The Biochemical Journal* 211, 181 - 189.

Prud'homme, G. (2004). Altering immune tolerance therapeutically: the power of negative thinking. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 586 - 599.

Puccetti, P., Belladonna, M., Grohmann, U. (2002). Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Critical Reviews in Immunology* 22, 373 - 390.

Pugin, J. (2007). Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Foundation Symposium* 280, 21 - 27.

Randow, F., Syrbe, U., Meisel, C., Krausch, D., Zuckermann, H., Platzer, C., Volk, H. (1995). Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine* 181, 1887 - 1892.

Rieser, C., Papesh, C., Herold, M., Bock, G., Ramoner, R., Klocher, H., Bartsch, G., Thurnher, M. (1998). Differential deactivation of human dendritic cells by endotoxin desensitization: role of tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2. *Blood* 91, 3112 - 3117.

Rosati, O., Martin, M. (2002). Identification and characterization of murine IRAK-M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, 1472 - 1477.

Ruckdeschel, K., Mannel, O., Schrottner, P. (2002). Divergence of apoptosis-inducing and preventing signals in bacteria-faced macrophages through myeloid differentiation factor 88 and IL-1 receptor-associated kinase members. *Journal of Immunology* 168, 4601 - 4611.

Sherwood, E., Tolive-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best practice and research* 18, 385 - 405.

Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer* 42, 717 - 727.

Siedlar, M., Szaflarska, A., Szczepanik, A., Ruggiero, I., Frankenberger, M., Szatanek, R., Czupryna, A., Popiela, T., Zembala, M. (2005). Depressed tumor necrosis factor alpha and interleukin-12p40 production by peripheral blood mononuclear cells of gastric cancer patients: Association with IL-1R-associated kinase-1 protein expression and disease stage. *International Journal of Cancer* 114, 144 - 152.

Soares-Schanoski, A., Gómez-Piña, V., del Fresno, C., Rodríguez-Rojas, A., García, F., Glaría, A., Sánchez, M., Vallejo-Cremades, M., Baos, R., Fuentes-Prior, P., Arnalich, F., López-Collazo, E. (2007). 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: A putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *Journal of Leukocyte Biology* 82, 700 – 709.

Soma, Y., Grotendorst, G. (1989). TGF- β Stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *Journal of Cellular Physiology* 140, 246 - 253.

Stern, R. (2004). Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology* 83, 317 - 325.

Stern, R., Asari, A., Sugahara, K. (2006). Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European Journal of Cell Biology* 85, 699 - 715.

Su, J., Xie, Q., Wilson, I., Li, L. (2007). Differential regulation and role of interleukin-1 receptor associated kinase-M in innate immunity signaling. *Cellular Signalling* 19, 1596 – 1601.

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G., Millar, D., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750 - 756.

Takeda, K., Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 17, 1 - 14.

Takeda, K. (2005). Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research* 11, 51 - 55.

Taylor, P., Martínez-Pomares, L., Stacey, M., Brown, G., Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Reviews in Immunology* 23, 901 - 944.

Taylor, A. (2005). The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) suppresses LPS-stimulated TLR4 with IRAK-M in macrophages. *Journal of Neuroimmunology* 162, 43 - 50.

Tazi, K., Quioc, J., Saada, V., Bezeaud, A., Lebrec, D., Moreau, R. (2006). Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: Possible role of Akt and IRAK-M. *Journal of Hepatology* 45, 280 - 289.

Thomas, J., Allen, J., Tsen, M., Dubnicoff, T., Danao, J., Liao, X., Cao, Z., Wasserman, S. (1999). Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 resector-associated kinase. *Journal of Immunology* 163, 978 - 985.

Toole, B. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews* 4, 528 - 539.

Tosi, M. (2005). Innate immune responses to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, 241 - 249.

Trinchieri, G., Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nature Reviews* 7, 179 - 190.

Verstak, B., Hertzog, P., Mansell, A. (2007). Toll-like receptor signalling and the clinical benefits that lie within. *Inflammation Research* 56, 1 - 10.

Vincent, J., Taccone, F., Schmit, X. (2007). Classification, incidence, and outcomes of sepsis and multiple organ failure. *Contributions to Nephrology* 156, 64 - 74.

Visintin, A., Halmen, K., Latz, E., Monks, B., Golenbock, D. (2005). Pharmacological inhibition of endotoxin responses is achieved by targeting the TLR4 coreceptor, MD-2. *Journal of Immunology* 175, 6465 - 6472.

Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C., Stark, G., Cao, Z. (1999). IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *Journal of Biological Chemistry* 274, 19403 - 19410.

West, M., Heagy, W. (2002). Endotoxin tolerance: A review. *Critical Care Medicine* 30, S64 - S73.

West, M., Koons, A., Crandall, M., Skinner, R., Worley, M., Shapiro, M. (2007). Whole blood leukocyte mitogen activated protein kinases activation differentiates intensive care unit patients with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Journal of Trauma* 62, 805 - 811.

Wolk, K., Docke, W., von Baehr, V., Volk, H., Sabat, R. (2000). Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 96, 218 - 223.

Xie, Q., Gan, L., Wang, J., Wilson, I., Li, L. (2007). Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. *Molecular Immunology* 44, 3453 - 3261.

Yabushita, H., Noguchi, M., Kishida, T., Fusano, K., Noguchi, Y., Itano, N., Kimata, K., Noguchi, N. (2004). Hyaluronan synthase expression in ovarian cancer. *Oncology Reports* 12, 739-743.

Yadavalli, G., Auletta, J., Gould, M., Salata, R., Lee, J., Heinzl, F. (2001). Deactivation of the innate cellular immune response following endotoxin and surgical injury. *Experimental and Molecular Pathology* 71, 209 - 221.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signalling. *Journal of Immunology* 169, 6668 - 6672.

Yamin, T., Miller, D. (1997). The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 272, 21540 - 21547.

Zhang, Y., Dong, C. (2005). MAP Kinases in immune responses. *Cellular and Molecular Immunology* 2, 20 - 27.

Zhong, B., Tien, P., Shu, H. (2006). Innate immune responses: Crosstalk of signaling and regulation of gene transcription. *Virology* 352, 14 - 21.

6.1.- Artículos publicados con los datos del presente trabajo.

López-Collazo, E., Fuentes-Prior, P., Arnalich, F., del Fresno, C. (2006). Physiopathology of interleukin-1 receptor-associated kinase M: Implications in refractory state. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19, 237 - 244.

del Fresno, C., Otero, K., Gómez-García, L., González-León, M., Soler-Ranger, L., Fuentes-Prior, P., Escoll, P., Baos, R., Caveda, L., García, F., Arnalich, F., López-Collazo, E. (2005). Tumor cells deactivate human monocytes by Up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *Journal of Immunology* 174, 3032 - 3040.

del Fresno, C., Gómez-García, L., Caveda, L., Escoll, P., Arnalich, F., Zamora, R., López-Collazo, E. (2004). Nitric oxide activates the expression of IRAK-M via the release of TNF-a in human monocytes. *Nitric Oxide* 10, 213 - 220.

Escoll, P., del Fresno, C., García, L., Vallés, G., Lendínez, M., Arnalich, F., López-Collazo, E. (2003). Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 465 - 472.

6.2.- Artículos adicionales publicados durante el desarrollo del presente trabajo.

Brú, A., del Fresno, C., Soares-Schanoski, A., Albertos, S., Brú, I., Porres, A., Rollán-Landeras, E., Dopazo, A., Casero, D., Gómez-Piña, V., Gómez-García, L., Arnalich, F., Alvarez, R., Rodríguez-Rojas, A., Fuentes-Prior, P., López-Collazo, E. (2007). Position-dependent expression of GADD45a in rat brain tumours. *Medical Oncology* (aceptado, en prensa).

Biswas, S., Bist, P., Dhillon, M., Kajiji, T., del Fresno, C., Yamamoto, M., López-Collazo, E., Akira, S., Tergaonkar, V. (2007). Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *Journal of Immunology* 179, 4083 – 4092.

Gómez-Piña, V., Soares-Schanoski, A., Rodríguez-Rojas, A., del Fresno, C., García, F., Vallejo-Cremades, M., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., López-Collazo, E. (2007). Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from LPS-stimulated human monocytes. *Journal of Immunology* 179, 4065 – 4073.

Soares-Schanoski, A., Gómez-Piña, V., del Fresno, C., Rodríguez-Rojas, A., García, F., Glaría, A., Sánchez, M., Vallejo-Cremades, M., Baos, R., Fuentes-Prior, P., Arnalich, F., López-Collazo, E. (2007). 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: A putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *Journal of Leukocyte Biology* 82, 700 – 709.

del Fresno, C., Soler-Rangel, L., Soares-Schanoski, A., Gómez-Piña, V., González-León, M., Gómez-García, L., Mendoza-Barberá, E., Rodríguez-Rojas, A., García, F., Fuentes-Prior, P., Arnalich, F., López-Collazo, E. (2007). Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *Journal of Endotoxin Research*. *Journal of Endotoxin Research* 13, 39 – 52.

González-León, M., Soares-Schanoski, A., del Fresno, C., Cimadevilla, A., Gómez-Piña, V., Mendoza-Barberá, E., García, F., Marín, E., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., López-Collazo, E. (2006). Nitric oxide induces SOCS-1 expression in human monocytes in a TNF-alpha-dependent manner. *Journal of Endotoxin Research* 12, 296 - 306.

