

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**TREM-1: Una “puerta” a la inflamación  
perpetua en monocitos humanos circulantes**

TESIS DOCTORAL

Vanesa Gómez Piña

Madrid, 2009



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

**TREM-1: Una “puerta” a la inflamación  
perpetua en monocitos humanos circulantes**

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

Vanesa Gómez Piña  
Licenciada en Ciencias Biológicas

Director de tesis:  
Dr. Eduardo Manuel López Collazo

Unidad de Investigación  
Hospital Universitario de 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. VANESA GÓMEZ PIÑA, titulado “TREM-1 una puerta a la inflamación perpetua en monocitos humanos circulantes”, 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, 7 de Mayo de 2009

Fdo. Dr. Eduardo López -Collazo



*A mis padres*





*“Lo poco que he aprendido carece de valor,  
comparado con lo que ignoro  
y no desespero en aprender.”*

Descartes



## AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis y amigo Dr. Eduardo López-Collazo por aceptarme en su laboratorio, por motivarme a crecer profesional y personalmente. Gracias a ti he adquirido el pensamiento científico. Nunca olvidaré esta etapa de mi vida que para mí ha sido muy especial.

Al Dr. Francisco Arnalich y al Dr. Francisco García-Río por su gran esfuerzo en conciliar la práctica clínica con la investigación básica, con todas las complicaciones que ello trae consigo. Por proporcionarnos toda su ayuda y conocimientos. Gracias por clasificar y el reclutar a los pacientes que han sido de vital importancia para la ejecución de este trabajo y de otros muchos.

Al Dr. Pablo Fuentes- Prior por el tiempo que ha dedicado a este trabajo, sin sus análisis estructurales y su meticulosa revisión de los datos no habría sido posible su realización.

A mi querida compañera y amiga Alecita. Son tantas cosas las que tengo que agradecerte que no fuera posible escribirlas todas en este texto. Sin embargo, no puedo desaprovechar la ocasión para agradecerte todo el apoyo profesional y personal. Gracias por ayudarme en los momentos más difíciles y que aún en la distancia lo sigas haciendo. Gracias por el tiempo que dedicaste a enseñarme y por tu paciencia. Por ser mi profesora y amiga. Tú eres la mayor responsable de que afronte la ciencia con pasión. Eres para mí todo un ejemplo de lucha, perseverancia e inteligencia. Contigo he aprendido a ver las cosas desde otro prisma. Siempre tendrás un hueco en mi corazoncito.

A mis compañeros de laboratorio de los que tanto he aprendido y con los que tan buenos momentos he pasado. A Irene y Teresa, chicas en estos últimos meses nos hemos conocido más, gracias por ello, gracias a vosotras el trabajo diario se ha hecho muy agradable. Gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado. Espero que sigáis manteniendo esa actitud crítica al enfrentar los problemas científicos, podéis aportar mucho. A Carlos por discutir de ciencia haciendo de ello nuestro día a día y por enseñarme muchas de las técnicas que hoy conozco. También agradecer a aquellos compañeros que fueron parte de nuestro grupo en algún momento: Elena, Alex, Ernest

A mis compañeros de la Unidad del Hospital la Paz que estuvieron a lo largo del desarrollo de este trabajo. Gracias por hacer el trabajo más llevadero y ayudar en todo lo que ha estado a vuestro alcance: Loli, Maite, Yolanda, Gema, Luz, Susana, Mariano, Esther y Martita. De manera muy especial a la flor, Carolina, siempre recordaré los momentos de risas que hemos tenido.

A mis queridos Biólogos. Gracias por aguantar mis pataletas, por darme siempre el apoyo que necesitaba y escucharme en los momentos más difíciles. Llevamos muchos años juntos y sois en gran parte responsables de que hoy esté escribiendo esta tesis, siempre me animasteis a ello. A Sandra, Alex, Miguel Ángel y Sandra Guerrero que os voy a contar que no sepáis, os quiero chicos.

A mis amigos de batalla en el ámbito comercial, Erica y Rafa, siempre habéis estado dándome vuestro apoyo a lo largo de estos años, a pesar de no entender muy bien que implica mi profesión habéis hecho un gran esfuerzo por entenderlo. Las vacaciones no serían igual sin vosotros. De manera muy especial a Dani, siempre me has demostrado una amistad honesta y sincera, tú sabes lo que me importas.

A mis padres, Luis y Paqui, son tantas las cosas que tengo que agradeceros y que nunca os digo que no cabrían ni en tres tesis. Sois los grandes responsables de que sea como soy, siempre me habéis apoyado en todas mis decisiones a pesar de que pudierais estar en desacuerdo con ellas, me habéis mostrado un amor incondicional. Para mí sois un ejemplo de lucha, alegría y optimismo. Me habéis contagiado esos valores a lo largo de toda mi vida. Sin vosotros nada de esto sería posible. Sois el motor que me mueve en muchas ocasiones. Para mí sería un honor ser un reflejo de vosotros. Gracias por ser como sois.

Este trabajo ha podido realizarse gracias a los fondos proporcionados por la Comunidad de Madrid, por el Ministerio de Educación y Ciencia, la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz y la Fundación de la Mutua Madrileña Automovilística.

A lo largo del presente trabajo he disfrutado de una beca de investigación de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de La Paz.

## RESUMEN

La tolerancia a endotoxina se define como “desensibilización” de los monocitos/macrófagos frente a agentes patógenos como bacterias Gram negativas.

La familia de receptores TREM agrupa un conjunto de moléculas de superficie que poseen un dominio extracelular inmunoglobulina. El primer miembro identificado, TREM-1, se expresa principalmente en monocitos y neutrófilos. El lipopolisacárido y otros productos microbianos inducen la sobre-expresión de este receptor en la superficie celular y, posteriormente, la liberación de su forma soluble conocida como sTREM-1. Esta proteína ejerce diferentes funciones dependiendo de su forma, mientras TREM-1 en la membrana celular amplifica la inflamación, la forma soluble tiene un claro efecto anti-inflamatorio. Este trabajo demuestra que las metaloproteasas de matriz son responsables del corte proteolítico del dominio extracelular de TREM-1 lo que genera la forma soluble, sTREM. El mantenimiento de TREM-1 en la superficie celular, y la falta de sTREM-1 en el sobrenadante de los cultivos, revierten parcialmente el fenotipo tolerante en monocitos humanos de sangre periférica expuestos a lipopolisacárido. En este caso se observa una restauración de la expresión de diversas citoquinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e IL-23p19, todo ello debido a la activación de la vía señalización de PI3K.

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva, consecuencia de la mutación del gen CFTR que codifica para un tipo de canal de cloro. Estos pacientes se caracterizan por presentar una infección crónica de las vías respiratorias. En nuestro trabajo mostramos que los monocitos de sangre periférica de pacientes que padecen fibrosis quística se encuentran en un estado tolerante que no se debe a alteraciones en el complejo de receptor del lipopolisacárido (TLR4/MD2/CD14). Estos pacientes presentan bajos niveles de expresión del receptor TREM-1 en sus monocitos y la forma soluble sTREM-1 no se detecta en sus sueros. Nuestros datos sugieren que estas observaciones son propias de la fibrosis quística y no una característica general de las enfermedades respiratorias, ya que los niveles de TREM-1 son normales en pacientes que padecen enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Estos resultados apuntan a TREM-1 como uno de los posibles agentes causantes del estado tolerante en pacientes aquejados de fibrosis quística.

En conjunto, nuestros datos indican que TREM-1 es un elemento importante implicado en el control del desarrollo de procesos tolerantes en monocitos humanos.



## SUMMARY

Endotoxin tolerance is defined as the state of reduced responsiveness to endotoxin challenge after a primary bacterial insult.

TREMs (Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cell) are a family of cell surface receptors with an ectodomain homologous to Ig-like modules. The first protein described, TREM-1, is expressed mainly on monocytes and neutrophils. Upon challenge with LPS and other microbial stimuli, there is an up-regulation of TREM-1 at the cell surface and a subsequent cleavage of its soluble form, sTREM-1. This protein has different effects depending on its condition; TREM-1 at the cell surface has been identified as an amplifier of the immune response that enhances leukocyte activation in the presence of microbial products, whereas sTREM-1 is mainly anti-inflammatory. The data presented in this thesis suggests that membrane-metalloproteinases are responsible for shedding TREM-1 ectodomain from the cell membrane, most likely through cleavage of a single peptide bond within its long juxtamembrane linker. We have demonstrated that the inhibition of TREM-1 proteolysis, and therefore the lack of sTREM-1, in LPS-challenged human MØ, leads to a partial restoration of the tolerant phenotype. The expression of cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e IL-23p19 is restored due to activation of PI3K pathway.

Cystic Fibrosis is an inherited pleiotropic disease that results from mutations in the gene encoding for the chloride channel, CFTR. Cystic fibrosis patients are frequently colonized by several pathogens. In this thesis, we demonstrate that blood peripheral monocytes isolated from cystic fibrosis patients are in an endotoxin tolerance state; however, this is not due to a deficient TLR activation. On the other hand, the levels of TREM-1, an amplifier of the inflammatory response, are down-regulated in monocytes from cystic fibrosis patients compared to healthy volunteers. Furthermore, sTREM-1 was not detected in the sera of these patients. Additionally, in another pulmonary disease such as Chronic Obstructive Pulmonary Disease, we found normal levels of TREM-1. Therefore, we conclude that the down-regulation of TREM-1 expression in cystic fibrosis patients, and not the pulmonary disease itself, is responsible for the endotoxin tolerance state.

Our data indicates that TREM-1 could be involved in the control of the LPS-refractory state in the monocyte.





# INDICE

LISTADO DE FIGURAS .....	<b>21</b>
LISTADO DE FIGURAS .....	<b>23</b>
ABREVIATURAS.....	<b>25</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>31</b>
1.1 Sistema inmune innato.....	31
1.2 Familia de receptores “Toll-Like Receptors” .....	32
1.2.1 “Toll-Like Receptor 4” .....	33
1.2.2 Señalización de TLR4.....	34
1.2.2 a) Activación por NFκB. ....	34
1.2.2 b) Activación por MAPK.....	35
1.2.2 c) Activación por PI3K. ....	35
1.3 Familia de receptores TREM.....	37
1.3.1 a) TREM-1 .....	37
1.3.1 b) sTREM-1 .....	38
1.3.1 c) TREM-2 .....	40
1.3.1 d) Ligandos de TREM .....	40
1.4 Respuesta inflamatoria generada por el sistema inmune innato.....	41
1.5 Tolerancia a endotoxina. ....	42
1.5 a) Tolerancia a endotoxinas y producción de citoquinas .....	43
1.5 b) IRAK-M .....	44
1.6 Implicaciones clínicas de la tolerancia a endotoxina.....	45
1.6.1 Fibrosis quística.....	46
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>51</b>
<b>3. Materiales y métodos. ....</b>	<b>55</b>
3.1. Reactivos.....	55
3.1.a) Diseño, síntesis y purificación de péptidos derivados de TREM-1. ....	55
3.1.b) Anticuerpos.....	58
3.2.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica. ....	59
3.3.- Tratamientos.....	59

3.4.- Aislamiento de ARN y proteínas. ....	60
3.4 a) ARN.....	60
3.4. b) Proteína.....	60
3.5.- Cuantificación del ARN mensajero.....	60
3.6. Análisis “Southern blot” .....	62
3.7. Análisis por citometría de flujo. ....	62
3.7.1 Medición intracelular de citoquinas. ....	62
3.8. Inmunohistoquímica.....	63
3.9. Análisis por Western Blot.....	63
3.10. Arrays de anticuerpos. ....	64
3.11. ELISA para TNF- $\alpha$ , IL-6, sTREM-1 y PGE <sub>2</sub> .....	64
3.12. Ensayos de apoptosis.....	64
3.13. Pacientes y voluntarios sanos.....	64
3.14 Análisis estadísticos.....	68

#### **4. Resultados. .... 71**

4.1 El pre-tratamiento de monocitos humanos con LPS induce tolerancia a endotoxina “in vitro”.....	71
4.2 TREM-1 se sobre-expresa en monocitos tolerantes en sus dos variantes. ....	75
4.3. Un inhibidor estándar de metaloproteasa, pero no un inhibidor genérico de proteasas, previene la generación de sTREM-1. ....	76
4.4. La inhibición del corte de TREM-1 por GM6001 es depende de la dosis de inhibidor.....	78
4.5. El “splicing” alternativo de TREM-1 no es detectado en monocitos humanos estimulados con LPS. ....	80
4.6. La masa molecular experimental de sTREM-1 sugiere el corte proteolítico de TREM-1 en un lugar próximo a la membrana.....	81
4.7. GM6001 mantiene la expresión de TREM-1 en la membrana celular e inhibe la generación de sTREM-1 en células tolerantes.....	83
4.8. La presencia mantenida de TREM-1 en la superficie celular modula el fenotipo tolerante.....	84
4.9. La presencia mantenida de TREM-1 en la superficie celular modula el fenotipo tolerante de manera dependiente de la dosis de GM6001. ....	86
4.10. La proteína TREM-1 soluble y completa tienen un efecto anti-inflamatorio e induce parcialmente la tolerancia a endotoxina en monocitos humanos. ....	87
4.11. Las regiones determinantes de complementariedad ejercen una acción similar anti-inflamatoria a sTREM-1. ....	91

4.12. La expresión permanente de TREM-1 en la superficie celular restaura la señalización celular inflamatoria en monocitos tolerantes.....	93
4.13. El inhibidor de PI3K restaura el fenotipo tolerante en monocitos tratados con GM6001.....	95
4.14. Los monocitos circulantes de pacientes con fibrosis quística presentan una respuesta pro-inflamatoria alterada en presencia de LPS.....	99
4.15. Los monocitos circulantes de pacientes con fibrosis quística muestran unos niveles normales de TLR4, MD2 y CD14 en su superficie celular. ....	101
4.16. Los pacientes con fibrosis quística presentan bajos niveles de TREM-1 en monocitos circulantes. ....	102
4.17. Los monocitos circulantes de pacientes con FQ no sobre-expresan TREM-1 tras un estímulo con LPS.....	103
4.18. Los niveles de PGE <sub>2</sub> no explican la baja expresión de TREM-1 en los pacientes con FQ.....	106
4.19. Los pacientes con FQ presentan en sus monocitos circulantes elevados niveles de PU.1.....	107
<b>5. Discusión.....</b>	<b>111</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>129</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>133</b>
7.1 Artículos publicados con el presente trabajo.....	144
7.2 Artículos adicionales publicados en el desarrollo del presente trabajo. ....	145



## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura I1.</b> Visión general de la señalización por LPS/TLR4. ....	33
<b>Figura I2.</b> Señalización MyD88 dependiente. ....	35
<b>Figura I3.</b> TREM-1 y sTREM-1 en inflamación. ....	38
<b>Figura I4.</b> Representación gráfica de la actuación de IRAK-M en la cascada de señalización de TLR4, .....	44
<b>Figura M1.</b> Alineamiento de la secuencia basadas en la estructura de TREM-1 en diferentes especies y los posibles lugares de interacción proteína-proteína. ....	55
<b>Figura R1.</b> Representación gráfica del modelo de TE. ....	70
<b>Figura R2.</b> Los análisis por Q-PCR verifican que el pre-tratamiento MØ con LPS induce tolerancia “in vitro”. ....	71
<b>Figura R3.</b> La expresión de proteína corrobora que el pre-tratamiento MØ con LPS induce tolerancia “in vitro”. ....	72
<b>Figura R4.</b> TREM-1 se sobre-expresa tanto en condiciones tol+LPS como en c+LPS, y se acumula en mayores concentraciones en condiciones tolerantes. ....	74
<b>Figura R5.</b> La producción de sTREM-1 en MØ humanos coincide con la disminución de TREM-1 en superficie. ....	75
<b>Figura R6.</b> Un inhibidor general de metaloproteasas de matriz inhibe el corte proteolítico de TREM-1 en superficie y reduce la producción de sTREM-1 en cultivo de MØ humanos. ....	76
<b>Figura R7.</b> GM6001 inhibe el corte proteolítico de TREM-1 anclado a la superficie celular de una manera dependiente de la dosis. ....	77
<b>Figura R8.</b> GM6001 inhibe el corte proteolítico de TREM-1 de membrana celular sin afectar a la viabilidad celular. ....	78
<b>Figura R9.</b> Por Southern blot se detectó un solo transcrito de ARNm correspondiente al tamaño completo del receptor TREM-1. ....	79
<b>Figura R10.</b> Detección de sTREM-1 en el sobrenadante de cultivo de MØ humanos por Western blot. ....	80
<b>Figura R11.</b> GM6001 estabiliza la expresión de TREM-1 en la membrana celular e inhibe la generación de sTREM-1 en células tolerantes. ....	81
<b>Figura R12.</b> GM6001 restaura el fenotipo inflamatorio en MØ tolerantes. ....	82
<b>Figura R13.</b> GM6001 restaura la expresión de TNF- $\alpha$ en MØ tolerantes. ....	83
<b>Figura R14.</b> GM6001 no inhibe la generación de IL-10 en MØ tolerantes. ....	84
<b>Figura R15.</b> El fenotipo tolerante se modula dependiendo de la dosis de GM6001. ....	85

<b>Figura R16.</b> La presencia de TREM-1 soluble (s´TREM-1) disminuye la inflamación producida por LPS.....	86
<b>Figura R17.</b> s´TREM-1 induce parcialmente un fenotipo tolerante en MØ humanos. .	87
<b>Figura R18.</b> s´TREM-1 restaura el fenotipo tolerante en MØ tolerantes a nivel de IL-12. ....	88
<b>Figura R19.</b> Representación en 3D de TREM-1 Ig y la localización de los posibles lugares de unión proteína-proteína.....	89
<b>Figura R20.</b> Los péptidos sintéticos derivados de TREM-1 presentan una actividad anti-inflamatoria.....	90
<b>Figura R21.</b> GM6001 revierte la cinética tolerante de IRAK-M a nivel de ARNm.....	91
<b>Figura R22.</b> GM6001 revierte la cinética tolerante de IRAK-M a nivel de proteína. ....	92
<b>Figura R23.</b> GM6001 restaura la cinética de fosforilación en MØ tolerantes. ....	93
<b>Figura R24.</b> La inhibición de PI3K restaura el fenotipo tolerante en MØ humanos tratados con GM6001.....	94
<b>Figura R25.</b> La inhibición de PI3K restaura el fenotipo tolerante en MØ humanos tratados con GM6001.....	95
<b>Figura R26.</b> La inhibición de PI3K restaura el patrón de activación de las vías de señalización tolerante en MØ humanos tratados con GM6001.....	96
<b>Figura R27.</b> LY294002 no afecta a la expresión de TREM-1 en membrana.....	96
<b>Figura R28.</b> Los MØ de pacientes con FQ no inducen una respuesta pro-inflamatoria cuando se estimulan con LPS. ....	98
<b>Figura R29.</b> Los elementos del complejo receptor del LPS están expresados de manera similar en voluntarios sanos y pacientes con FQ.....	99
<b>Figura R30.</b> Los niveles de expresión de TREM-1 y sTREM-1 son bajos en pacientes con FQ.....	101
<b>Figura R31.</b> Los MØ de los pacientes con FQ pero no con EPOC fallan en inducir la sobre-expresión de TREM-1 después de estimularlos ex vivo con LPS. ....	103
<b>Figura R32.</b> Los MØ de pacientes con FQ no inducen la expresión de TREM-1 después de estimularlos con LPS. ....	104
<b>Figura R33.</b> Los niveles de PGE <sub>2</sub> son similares en VS y pacientes con FQ. ....	105
<b>Figura R34.</b> Los niveles de PU.1 son sobre expresados en pacientes con FQ.....	106
<b>Figura D1.</b> Representación gráfica del corte proteolítico de TREM-1.....	111
<b>Figura D2.</b> Representación gráfica de la alta afinidad de TREM-1 contra la baja afinidad de TREM-2. ....	119

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Tabla I1.</b> Ligandos de los “Toll-Like Receptors .....	31
<b>Tabla M1.</b> Secuencia de péptidos de TREM-1 sintetizado.....	54
<b>Tabla M2.</b> Anticuerpos conjugados.....	56
<b>Tabla M3.</b> Anticuerpos no conjugados.....	56
<b>Tabla M4.</b> Secuencia y Tm de los cebadores utilizados en PCR cuantitativa. ....	59
<b>Tabla M5.</b> Datos clínicos de los pacientes FQ incluidos en nuestro estudio. ....	64
<b>Tabla M6.</b> Datos clínicos de los pacientes EPOC incluidos en nuestro estudio .....	65
<b>Tabla R1.</b> Estructura general del modelo de tolerancia utilizado “in vitro”.....	69





## ABREVIATURAS

**AP-1:** Activation Protein-1

**ASL:** Airway Surface Liquid

**BMDM:** Bone- Marrow-Derived-Macrophages

**CCL2:** Chemokine (C-C motif) Ligand 2

**CDR:** Complementarity Determining Regions

**CFTR:** Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

**CVF:** Capacidad Vital Forzada

**CMSP:** Células Mononucleares de Sangre Periférica

**CXCL10:** Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10

**DAP12:** DNAX Activation Protein 12

**DD:** Death Domain.

**EPOC:** Enfermedad pulmonar Obstructiva Crónica

**FQ:** Pacientes con Fibrosis Quística

**GOLD:** Global Initiative for the Diagnosis, Management and Prevention of Obststructive Lung Diseases

**ICAM-1:** Intercellular Adhesion Molecule 1

**IgG:** Inmunoglobulina G

**ERK:** Elk-Related Tyrosine Kinase

**GM-CSF:** (Granulocyte-Macrophage) - Colony Stimulating Factor

**GRB2:** Growth Factor Receptor Binding Protein 2

**HMGB1:** High-Mobility Group Box 1

**HSP-X:** Heat Shock Protein-X

**I $\kappa$ B:** Inhibitor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B cell.

**IKK:** Inhibitor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B cell Kinase

**IL-X:** Interleuquina-X

**IRAK:** Interleukin-1 Receptor Associated Kinases

**LBP:** LPS-Binding Protein

**LPS:** Lipopolisacárido

**LRR:** Leucine-Rich-Repeat

**MCR:** Medical Research Council

**MD2:** Myeloid Differentiation 2

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase

**MMP:** Metaloproteinasas

**MØ:** Monocitos/Macrófagos

**MyD88:** Myeolid Differentiation 88

**NFκB:** Nuclear Factor κB

**NK:** Natural Killer

**NO:** Nitric-Oxide

**NOS:** Nitric-Oxide Synthase

**PAMP:** Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E2

**PI3K:** Phosphatidyl Inositol 3'- Kinase

**PLCγ:** Phospholipase Cγ

**Q-PCR:** PCR cuantitativa

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**SYK:** Spleen Tyrosine Kinase

**SI:** Sistema Immune

**SII:** Sistema Immune Innato

**SIRS:** Systemic Inflammatory Response Syndrome

**sTREM-1:** TREM-1 soluble

**s<sup>h</sup>TREM-1:** TREM-1 soluble y completa

**TE:** Tolerancia a endotoxina

**TIR:** Toll/IL-1R homology

**TLP-2:** Tumor Progression Locus-2"

**TLR:** Toll-Like Receptor

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

**TRAF-6:** TNF Receptor-Associated Factor 6

**TREM:** Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cell

**VEF:** Volumen Espiración Forzada

**VS:** Voluntarios Sanos

**ZAP70:** Zeta-chain (TCR) Associated Protein kinase 70kDa



## ***INTRODUCCIÓN***



# 1. Introducción

## 1.1 Sistema inmune innato.

A lo largo de su vida, un individuo está expuesto a multitud de agentes infecciosos; sin embargo, en la mayoría de las situaciones no se instaura un proceso infeccioso debido a la eficiente actuación del sistema inmune (SI). En mamíferos el sistema inmune se divide en inmunidad innata y adaptativa. El objetivo de la inmunidad innata es evitar el progreso del proceso infeccioso; si éste se produce, dicho mecanismo inmunitario logra establecer un “ambiente” para que se desarrolle una respuesta adaptativa. El sistema inmune innato (SII) fue descrito por primera vez hace más de un siglo, filogenéticamente se conserva y está presente en todos los organismos multicelulares (1). Este sistema representa la primera línea de defensa de nuestro organismo frente a diferentes agresiones tales como quemaduras, intervenciones quirúrgicas o infecciones (2). En esta respuesta inicial son claves las células mononucleares, entre ellas destacan los monocitos (MØ) como precursores circulantes de los macrófagos y los macrófagos tisulares (3). Estas células desarrollan diversas funciones fundamentalmente en la respuesta inmune temprana como son liberación de citoquinas inflamatorias, fagocitosis y presentación de antígenos (4).

Inicialmente y durante mucho tiempo el SII se consideró como “inespecífico” concepción que cambió debido a la descripción inicial en *Drosophila melanogaster* del producto del gen *Toll* (5). Este trabajo demostró que *Toll* tiene un papel central en la respuesta inmune de la *Drosophila* adulta, la vía de señalización de *Toll* es necesaria para inducir la transcripción de un gen que da lugar a un péptido antifúngico denominado drosomicina en respuesta a una infección por hongos. El hallazgo hacía pensar que la respuesta inmune innata, dependía del reconocimiento específico de agentes ajenos por receptores concretos. Posteriormente, se han identificado en plantas y en mamíferos una serie de proteínas homologas a la proteína Toll de *Drosophila* y que reciben el nombre de TLR (del inglés “Toll-Like Receptors”) (6).

## 1.2 Familia de receptores “Toll-Like Receptors”.

Los TLR en humanos constituyen una familia de al menos 10 receptores con función conocida, todos ellos con la capacidad de reconocer ligandos específicos y activar una respuesta inmune de tipo inflamatorio (7). Son proteínas transmembrana tipo I que presentan un dominio extracelular con varios motivos LRR (del inglés “Leucine-Rich-Repeat”) y un dominio citoplasmático muy conservado dominio TIR (del inglés “Toll/IL-1R homology”) mediante el que interacciona con proteínas de traducción de señal (8, 9).

Los TLR se expresan en un amplio rango de tipos celulares como en macrófagos y en células dendríticas. Estos receptores se han especializado en el reconocimiento de diferentes PAMP (del inglés “Pathogen-Associated Molecular Patterns”), ya sean individualmente o dimerizándose con otros. Los TLRs responsables de la detección de productos bacterianos y ligandos endógenos (TLRs 1, 2, 4, 5 y 6) se expresan en la superficie celular y los sujetos a detectar los componentes virales (TLRs 3, 7, 8 y 9) son localizados intracelularmente en la membrana de los endosomas (Tabla II). Sin embargo se desconoce el ligando de TLR 10 (9).

<i>TLR</i>	<i>Ligando bacteriano</i>	<i>Ligandos endógenos</i>
TLR1/2	Lipoproteínas triacetiladas	ND
TLR2	Ácido lipoteicoico, peptidoglicano, zymosan	ND
TLR2/6	Lipoproteínas diacetiladas	HSP-60, -70, -90
TLR4	Lipopolisacárido	HSP -22, -60
TLR5	Flagelina	ND
TLR9	Motivos CpG	ADN
<i>TLR</i>	<i>Ligandos virales</i>	
TLR2	Hemaglutinina	ND
TLR4	F-proteína (Virus sincitial respiratorio)	ND
TLR3	ARNds	ARNm
TLR7/8	ARNss	ARNss
TLR9	Motivos CpG	ADN

**Tabla II.** Ligandos de los “Toll-Like Receptors. ND, no definido, HSP (del inglés “Heat Shock Protein”)

Debido a que el TLR-4 es parte esencial en el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) y este hecho es eje central en nuestro estudio, describiremos con mayor profundidad este receptor.



### 1.2.1 “Toll-Like Receptor 4”

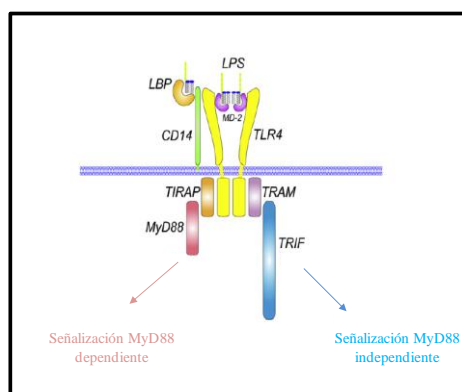
El TLR-4 es el primer miembro de la familia *Toll* que se identificó en mamíferos y el que mejor se ha caracterizado (10). Forma parte del receptor multimérico del LPS en MØ humanos. Por su parte el LPS es el principal componente de la superficie externa de bacterias gram negativas y constituye un potente activador de células del sistema inmune tal como macrófagos, monocitos y células endoteliales. Sin embargo, TLR-4 además de reconocer la endotoxina bacteriana es capaz de detectar diversos ligandos del propio organismo hospedador, como por ejemplo: proteínas de choque térmico, fibrinógeno, ácido hialurónico y  $\beta$ -defensinas (9). Este fenómeno ha hecho pensar en su posible implicación en el desarrollo de tolerancia periférica y procesos autoinmunes (11). La importancia del TLR-4 en la respuesta inmune innata, ha quedado patente con la descripción de patologías asociadas a mutaciones o polimorfismos en este receptor (12-14). Se han vinculado, por ejemplo, con malaria (15) susceptibilidad a infección por meningococo (16) o respuestas diferenciales a endotoxemia sistémica (17).

Si nos centramos en el reconocimiento del LPS por TLR-4 probablemente la primera proteína involucrada en el reconocimiento del LPS es LBP (del inglés “LPS-Binding Protein”), su función es transportar el LPS y formar un complejo ternario con CD14 soluble, tras este evento el LPS puede ser transferido al complejo TLR-4/MD2 (del inglés “Myeloid Differentiation 2”). Este complejo se ha descrito como una estructura con una molécula reconocedora CD14 (exclusivo de células de origen mieloide), y un complejo señalizador (TLR-4/MD2). La molécula CD14 es una proteína anclada a la membrana a través de un resto glicosilfosfatidilinositol que al carecer de dominio citoplasmático no puede transmitir la señal al interior celular, el CD14 se une al LPS y lo libera hacia el complejo TLR-4/MD2. La molécula MD2 es una proteína asociada al dominio extracelular del TLR-4 que aumenta la afinidad de este complejo por el LPS (18). Una vez anclado el LPS a su complejo receptor, la señal se traduce al interior celular. Debido a que TLR-4 carece de actividad quinasa, necesita la participación de moléculas adaptadoras y quinasas de transducción de señal, que generen una cascada de señalización intracelular, iniciada por el reconocimiento específico del LPS. 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 y quinasas, originando un complejo iniciador de la cascada de señalización (18) que prospera en distintas vías de señalización.

### 1.2.2 Señalización de TLR4.

La activación de TLR4 lleva a la activación de dos vías distintas: MyD88 dependiente (del inglés “Myeloid Differentiation 88”) y MyD88 independiente (Figura 11). Dentro de la vía MyD88 dependiente los efectos funcionales del LPS en los macrófagos son activados a través de las vías NFκB (del inglés “Nuclear Factor κB”), MAPK (del inglés “Mitogen-Activated Protein Kinase”) y PI3K/Akt ( del inglés “Phosphatidyl Inositol 3’- Kinase) (19). Estas vías regulan el balance entre viabilidad celular e inflamación (9, 18).



**Figura 11.** *Visión general de la señalización por LPS/TLR4.* Se observa como el reconocimiento del LPS se debe al complejo TLR-4/MD2/CD14/LBP (Modificada de Lu, Y. C., W. C. Yeh, *et al.* (2008). *Cytokine* **42**(2): 145-51).

#### 1.2.2 a) *Activación por NFκB.*

La unión del LPS al receptor TLR4 cataliza la unión del dominio TIR a MyD88, que activa dicha proteína adaptadora. En un extremo, la proteína MyD88 presenta un dominio TIR a través del cual interacciona con el dominio TIR de TLR-4, en el otro extremo posee un dominio que media las interacciones proteína-proteína conocido como DD (del inglés “Death Domain”) con este dominio es capaz de interaccionar con otras proteínas que también lo posean. MyD88 a través del dominio DD recluta y activa a la quinasa IRAK-4 (del inglés “Interleukin-1 Receptor Associated Kinases 4”) (20). IRAK-4 es responsable del posterior reclutamiento y activación de IRAK-1. IRAK-1 sufre fosforilaciones y autofosforilaciones dando como resultado la inestabilización del

complejo iniciador y la disociación de éste del complejo receptor. Las IRAKs interactuarán con otra molécula adaptadora denominada TRAF-6 (del inglés “TNF Receptor-Associated Factor 6”), dando lugar a la activación de dos tipos de cascadas de señalización: IKK (del inglés “Inhibitor of κ light chain gene enhancer in B cell Kinase”) y MAPK.

Las IKKs inician una cascada de activación de quinasas a través de las cuales dos de ellas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ , que forman el dímero IKK, se activan y fosforilan una proteína de inhibición conocida como I $\kappa$ B- $\alpha$  (del inglés “Inhibitor of κ light chain gene enhancer in B cell”). En condiciones normales I $\kappa$ B- $\alpha$  se une con NF $\kappa$ B en un complejo citosólico e inhibe su translocación al núcleo. La fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  lleva a la degradación de este factor, posteriormente NF $\kappa$ B se libera, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria a LPS como TNF- $\alpha$  (del inglés “Tumor Necrosis Factor α”), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (9, 18) (Figura I2).

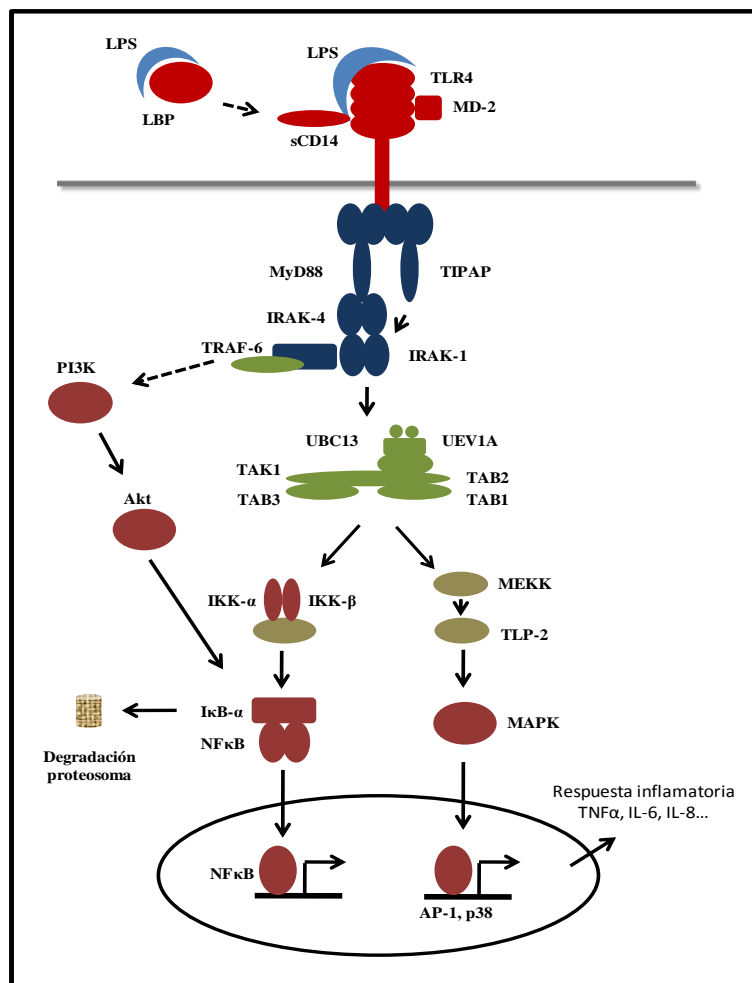
#### 1.2.2 b) Activación por MAPK.

Además de la activación por la vía NF $\kappa$ B, el LPS induce la activación de ERK 1/2 (del inglés “Elk-Related Tyrosine Kinase”) por la vía MAPK, lo que lleva a la translocación nuclear de AP-1 (del inglés “Activation Protein-1”). La respuesta de ERK frente al LPS no está todavía bien caracterizada (21). Mientras en células endoteliales, la activación de AP-1 requiere la activación de TRAF-6 (22), en macrófagos la activación de ERK requiere a una serin/treonin quinasa denominada TLP-2 (del inglés “Tumor Progression Locus-2”) (23). TLP-2 actúa como una MAPK que fosforila y activa a ERK 1/2, y este a su vez activa la translocación de AP-1 al núcleo lo que modula la expresión de genes pro-inflamatorios (21) (Figura I2).

#### 1.2.2 c) Activación por PI3K.

Los M $\phi$  estimulados con LPS activan la vía PI3K a través del receptor CD14/TLR-4/MD2 (Figura I2). Las PI3Ks son una familia de quinasas clasificadas dentro de tres subfamilias de acuerdo con su estructura y sustratos específicos. La subfamilia más ampliamente investigada es la de clase I; estas PI3Ks son activadas por receptores celulares. El prototípico clase I consiste en una subunidad reguladora p85 (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ ) y una subunidad catalítica p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  y p110 $\gamma$ ) (24). Este heterodímero media la fosforilación de fosfoinosítidos. Los productos lipídicos

fosforilados actúan como un segundo mensajero que activan una gran variedad de mediadores, incluyendo a Akt (del inglés “v-Akt murine thymoma viral oncogene”). Akt, inducido por LPS, es un importante componente de la activación de NFκB que ejerce un incremento de la transactivación de p65, y de la expresión de los genes de inducidos por él (25, 26). Además, la sobre-expresión de Akt incrementa la activación de la quinasa IκB-α y de la MAPK p38 (27). Sin embargo, no podemos olvidar el papel dual que juega PI3K en la señalización por LPS, regulando la señalización positiva o negativamente. Diversos estudios muestran como PI3K regula negativamente la producción de mediadores pro-inflamatorios importantes. La wortmanina, un inhibidor específico de PI3K, aumenta la producción de NOS (del inglés “Nitric-Oxide Synthase”) en macrófagos peritoneales de ratón (28). Además PI3K regula negativamente la producción citoquinas pro-inflamatorias y NO (del inglés “Nitric-Oxide”) en pacientes sépticos (29, 30).



**Figura I2.** Señalización MyD88 dependiente. El esquema engloba la activación por NFκB, MAPK y PI3K. (Modificada de Dauphinee, S. M., and Karsan, A. (2006) *Lab Invest* **86**, 9-22.)

Como hemos descrito hasta el momento, tras el reconocimiento del LPS por TLR-4 se activan diferentes vías de señalización intracelular. Esto conduce a la activación de proteínas quinasas, que en último término activan factores de transcripción, generando una respuesta inflamatoria por parte de células del sistema inmune innato. Por otra parte, la acción de TLR-4 se ve modulada por otra familia de receptores, los receptores TREM (del inglés “Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cell”) que describiremos a continuación por ser el eje central de nuestro estudio.

### ***1.3 Familia de receptores TREM***

TREM es una familia de receptores de membrana, de la familia de las inmunoglobulinas, que se expresan en células de origen mieloide: granulocitos, monocitos (31), macrófagos (32), microglía (33), células dendríticas (34), osteoclastos (35) y plaquetas (36). Generalmente estos receptores, parecen tener una función moduladora de la respuesta celular ejerciendo funciones que regulan positiva o negativamente la activación y diferenciación de células mieloides. Esta familia se compone de varios miembros como son TREM-1, TREM-2, TLT-1, TLT-2 y TREM-3, este último sólo descrito en ratón y con función desconocida (37). Describiremos con mayor profundidad a los miembros de esta familia involucrados en la respuesta inflamatoria en monocitos / macrófagos.

#### ***1.3.1 a) TREM-1***

TREM-1 es un receptor de membrana expresado principalmente en MØ y neutrófilos. Estructuralmente se caracteriza por tener un dominio extracelular inmunoglobulina, una región transmembrana y un corto tallo citoplasmático que carece de elementos señalizadores (31, 38). El dominio transmembrana tiene un residuo cargado positivamente que media la formación de un complejo con la proteína DAP12 (del inglés “DNAX Activation Protein 12”) necesaria para la señalización de TREM-1. Las primeras caracterizaciones de este receptor demostraron que su expresión aumentaba en presencia de LPS y otros productos microbianos, siendo capaz de inducir la expresión de citoquinas cuando actuaba sinérgicamente con los receptores TLRs (31, 39, 40). Sin embargo, la cascada de señalización de TREM-1 apenas se conoce. En MØ humanos la activación de TREM-1, ya sea por LPS o anticuerpos agonistas,

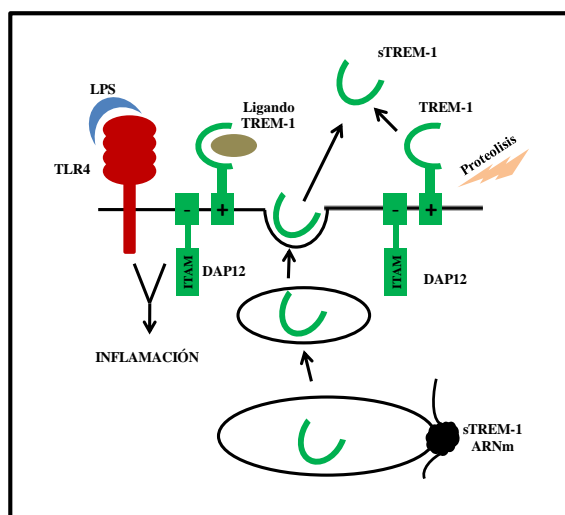
desencadena vías señalización que involucran a ZAP70 (del inglés “Zeta-chain (TCR) Associated Protein kinase 70kDa”) y Syk (del inglés “Spleen Tyrosine Kinase”); que lleva al reclutamiento de tirosina quinasas y moléculas adaptadoras como GRB2 (del inglés “Growth Factor Receptor Binding Protein 2”) y la activación de PLC $\gamma$  (del inglés “Phospholipase C $\gamma$ ”), Akt, I $\kappa$ B- $\alpha$  y ERK 1/2 entre otras (31, 41). Esto se traduce en un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular (31), reorganización del citoesqueleto y aumento en la producción de quimioquinas inflamatorias como MCP-1, IL-8 (31, 40), así como citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p40 (31, 40, 42).

Estudios *in vivo* han confirmado la implicación de TREM-1 en la respuesta inflamatoria caracterizada en los estudios *in vitro*. Este receptor se encuentra sobreexpresado en lesiones inflamatorias como la colitis (43), en pacientes sépticos polimicrobianos (37, 44, 45), en pacientes aquejados de gota (46) y en inflamación sistémica no producida por procesos infecciosos, SIRS ( del inglés “Systemic Inflammatory Response Syndrome”) (47).

Asimismo, estudios clínicos han puesto de manifiesto una variante soluble denominada sTREM-1 detectada tanto en suero de ratón como en suero de lavados broncoalveolares de pacientes sépticos (48, 49).

### 1.3.1 b) sTREM-1

sTREM-1 es una variante soluble de TREM-1. La estimulación *in vitro* de M $\phi$  y neutrófilos con productos microbianos produce la liberación de sTREM-1. Existen dos posibles explicaciones acerca de su origen: traducción de una variante de TREM-1 por *splicing* alternativo o procesamiento proteolítico liberándose la forma soluble por corte del receptor anclado en la membrana celular (37) (Figura I3). Algunos autores han descrito una variante de *splicing* en células de médula espinal CD34+ (50, 51). Sin embargo estos datos no son determinantes, ya que el peso molecular de esta forma de *splicing* es muy inferior al que presenta el sTREM-1 encontrado en el sobrenadante del cultivo de M $\phi$  (41). Además, un gran número de evidencias que indican que la forma soluble se genera vía proteolítica a partir del receptor anclado a membrana. Por ejemplo, con un cuidadoso análisis de los datos publicados, la aparición de sTREM-1 coincide con el descenso de la expresión de TREM-1 anclado a membrana (52).



**Figura I3.** *TREM-1* y *sTREM-1* en inflamación. *TREM-1* modula la señalización de TLR4 amplificando la respuesta inflamatoria. *sTREM-1* puede generarse por corte proteolítico o por *splicing* alternativo. (Modificada de Klesney-Tait, J., Turnbull, I. R., and Colonna, M. (2006) *Nat Immunol* **7**, 1266-1273)

Además de *sTREM-1* se han identificado otras formas solubles de la familia *TREM*, *sTREM-2* se ha detectado en el sobrenadante de cultivo de *MØ* y *sTLT-1* se ha identificado en suero de humanos y ratones (53, 54). Estos estudios sugieren que estas formas pueden constituir un mecanismo de regulación negativa de las señales que traducen los receptores anclados a membrana. Así, aunque el papel de *sTREM-1* no está claro, es posible que su liberación al medio haga que la forma soluble compita con el receptor *TREM-1* por su ligando endógeno lo que llevaría a disminuir la acción del receptor. Estos datos llevaron a pensar que *sTREM-1* ejercía una acción anti-inflamatoria. Estas sospechas se confirmaron con el diseño de una forma soluble de *TREM-1* generada artificialmente, *LP17*. *In vitro*, *LP17* reduce la producción de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  en cultivos de *MØ* humanos con *LPS* (49). *In vivo*, este péptido protege de endotoxemia y peritonitis séptica en modelos de ratón. Donde el pre-tratamiento de ratones con *LP17*, antes de una dosis letal de *LPS*, provoca una mayor supervivencia de los ratones tratados respecto a los controles (31, 39, 55).

Además, las elevadas concentraciones de *sTREM-1* en lavados broncoalveolares de diversos grupos de pacientes con enfermedades de origen infeccioso, ha hecho que esta molécula se postule como un marcador fiable de enfermedades infecciosas tales como neumonía y la sepsis (48). La importancia clínica de *TREM-1* se ha confirmado en varios estudios clínicos en los cuales *sTREM-1* se detecta en pacientes con

enfermedad pulmonar obstructiva crónica (56), enfermedades ulcerosas (57) o enfermedades inflamatorias del intestino (43). Algunos autores sugieren que el progresivo descenso de la concentración sTREM-1 en plasma es un signo de una evolución favorable durante las fases de recuperación de la sepsis (58).

#### 1.3.1 c) *TREM-2*

Se describió por primera vez en células dendríticas derivadas de MØ. Este estudio demostraba que TREM-2 promovía la migración celular debido a que inducía la sobre-expresión de CCR7 (34). Sin embargo, TREM-2 no se ha detectado ni en células dendríticas primarias y si en macrófagos infiltrados en el peritoneo y en macrófagos con una activación alternativa (59). Estos datos sugieren que TREM-2 está involucrado en la regulación de la actividad macrofágica (60). Estudios en ratones deficientes de TREM-2 revelaron la acción de este receptor, donde los macrófagos de estos ratones producían una mayor expresión de citoquinas inflamatorias tales como TNF- $\alpha$  e IL-6 en respuesta a los agonistas de los TLR como LPS, zimosan y CpG, demostrando que TREM-2 inhibía la respuesta inflamatoria en macrófagos (60). Sin embargo, poco se sabe de las vías de señalización de TREM-2 y los factores transcripcionales que regulan su expresión.

#### 1.3.1 d) *Ligandos de TREM*

El mayor obstáculo para lograr un entendimiento más completo de la acción de TREM-1 es la identificación de sus ligandos endógenos. Los datos demuestran que el choque endotóxico es mediado a través de la interacción TLR4-LPS (61). Así la interrupción de la señalización mediada por sTREM en choque endotóxico se deba probablemente por la competición de sTREM-1 y TREM-1 por el ligando endógeno (37), como ya mencionamos anteriormente. Existen evidencias que sugieren que el ligando de TREM-1 podría originarse en plaquetas (62), pero estos autores no demuestran si el ligando que proponen es capaz de unirse a sTREM-1 o en su defecto a LP17. Por otro lado, existen evidencias de que HMGB1 (del inglés “High-Mobility Group Box 1”) y HSP70 podrían ser ligandos de TREM-1 (63). Este estudio demuestra que HMGB1 y HSP70 liberado por células necróticas aumenta la secreción de citoquinas, en MØ estimulados con LPS, de una manera TREM-1 dependiente. Por otro lado, para TREM-2 han sido postulados una gran variedad de posibles ligandos. Entre



ellos se encuentra la Plexina-A1, de vital importancia en la osteoclastogénesis, que forma una interacción en *cis* Plexina A1- TREM-2. Por otro lado, en sistemas tan alejados como cultivos de BMDM (del inglés “Bone Marrow Derived Macrophages”) se muestran evidencias de la secreción del ligando endógeno de TREM-2 por estas células (60). Así, cultivos puros de BMDM deficientes en TREM-2 aumentan la producción de citoquinas, demostrando que el posible ligando de TREM-2 es producido por las BMDM, pero aún no se ha identificado.

Como hemos descrito hasta el momento, el reconocimiento del LPS por parte TREM-1/TLR-4 conduce a la activación de diferentes cascadas de señalización que concluyen en la expresión, en MØ humanos, de citoquinas pro-inflamatorias como son TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-23. Por ello describiremos de manera muy general el significado biológico de esta respuesta inflamatoria del sistema inmune innato.

#### **1.4 Respuesta inflamatoria generada por el sistema inmune innato.**

La inflamación es un proceso de acción inespecífica cuyo objeto último es eliminar el agente perjudicial, como microorganismos patógenos, complejos inmunes, células dañadas y restos necróticos. El tipo de inflamación en el que centraremos nuestro estudio es la inflamación aguda que comprende la acción temprana del sistema inmune innato sobre el agente patógeno como pueden ser las bacterias Gram negativas. Es conocido que los patógenos son inmediatamente reconocidos, atrapados, englobados y destruidos por macrófagos. Como describimos anteriormente, el reconocimiento del patógeno, activa vías de transducción de señal que inducen la expresión de una gran variedad de genes de la respuesta inmune, donde se destacan los genes que codifican para citoquinas inflamatorias y quimioquinas. Los MØ son los principales productores de citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  y además liberan otras moléculas como: la enzima activadora de plasminógeno y fosfolipasa, radicales de oxígeno, peróxido, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, como por ejemplo: prostaglandinas y leucotrienos (64).

Las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  promueven la expresión de moléculas de superficie tales como ICAM-1 (del inglés “Intercellular Adhesion Molecule 1”) y selectinas sobre células endoteliales, para contribuir a la acumulación de leucocitos en sitios locales de

inflamación (65). Además, el TNF- $\alpha$  activa al endotelio vascular e incrementa su permeabilidad, lo cual provoca un incremento en la entrada de IgG, complemento y células a los tejidos e incrementa el fluido de drenaje hacia los nódulos linfoides. Una vez atraídas las células al lugar del daño, el TNF- $\alpha$  estimula a los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos que ejercerán su acción bactericida. Por otra parte, la IL-6 sirve como factor de crecimiento para las células B activadas, activa las células T y la cascada del complemento (65). Los MØ también inducen la producción de IL-12, quien colabora con la IL-18 para incrementar la función citolítica de células NK (del inglés “Natural Killer”) y linfocitos T CD8+ activados (65-67). Por otra parte la IL-12 estimula la secreción de IFN- $\gamma$  por células T y NK, y el desarrollo de respuestas tipo Th1 (66). Esta citoquina es un importante vínculo entre inmunidad innata e inmunidad adaptativa contra virus y bacterias (65-67).

La regulación de esta intrincada red de citoquinas está controlada, entre otras moléculas, por la IL-10. Su función es interferir la síntesis de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6 y GM-CSF (del inglés “Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor”) por células T y regular negativamente la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$  por macrófagos (68). Por lo tanto el fino equilibrio de estas citoquinas dará como resultado una respuesta adecuada del hospedador frente a un agente agresor.

Podemos afirmar que si bien, en lo que a la respuesta inmune 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 (69), cuyo reflejo clínico es la entrada en choque séptico y fallo multiorgánico (70).

## **1.5 Tolerancia a endotoxina.**

La tolerancia a endotoxinas (TE) es un fenómeno ampliamente observado tanto en la investigación básica como en la clínica. Descrito por primera vez en 1946 por Besson, consiste en una desensibilización del sistema inmune innato frente a infecciones causadas por agentes patógenos (70-73). Más tarde en 1988, Freudenberg y Galanos, demostraron la implicación de los macrófagos en este proceso (74). El fenómeno de la TE se traduce en modelos *in vitro*, con MØ aislados, o *in vivo* en los

MØ de roedores, en una respuesta inflamatoria atenuada de estas células cuando se exponen a un segundo estímulo inflamatorio.

El significado biológico de este proceso viene dado por el hecho de que las citoquinas pro-inflamatorias, además de su función bactericida, presentan sistemas de auto-regulación positiva, de modo que su liberación, potencia la producción de mayores cantidades de citoquinas (75). La entrada en estados de tolerancia, evita este fenómeno de “perpetuación”, limitando los efectos deletéreos de una inflamación excesiva. Esto se refleja como una disminución en la producción de citoquinas pro-inflamatorias frente a nuevas infecciones (73) lo cual impide la evolución a un choque séptico (70).

La contrapartida que muestra el proceso TE, es la permisibilidad que supone a sucesivas infecciones debido a que la respuesta inmune no es del todo efectiva, hasta el punto de que existen autores que postulan la estimulación inmunológica como estrategia terapéutica en la sepsis (76). Por tanto, un fenotipo tolerante está asociado a la susceptibilidad a la infección lo que le confiere una gran importancia en la práctica clínica. Según varios estudios, los estados refractarios se pueden definir como una ventana temporal durante la cual el paciente sufre un estado de TE y, por lo tanto, no manifiesta una respuesta pro-inflamatoria estándar a estímulos infecciosos (70, 77, 78).

### ***1.5 a) Tolerancia a endotoxinas y producción de citoquinas***

Inicialmente el proceso de tolerancia era considerado como una inmunosupresión o inmunoparálisis, es decir, una carencia de respuesta al estímulo inductor (79, 80). Sin embargo, actualmente se considera un proceso de reprogramación de la respuesta, existiendo numerosos mecanismos moleculares que se activan cuando se da este fenómeno (70, 75).

La reprogramación monocítica se refleja como una caída significativa de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 (79). Llama la atención que no todas las citoquinas se ven afectadas en su expresión de igual manera. La expresión de unas se suprime como IL-12p40, CXCL10 (del inglés “Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10”) y CCL2 (del inglés “Chemokine (C-C motif) Ligand 2”) (64, 79), mientras que otras como la IL-10 se sobre-expresan (70). La producción autocrina de la citoquina inmunomoduladora IL-10 es un ejemplo paradigmático. Así, los ratones knock-out para IL-10 aún presentan el fenómeno de TE (81), lo que indica que existen mecanismos

alternativos en el desarrollo del proceso tolerante que la sobre-expresión de citoquinas anti-inflamatorias o la caída de las pro-inflamatorias.

Los MØ pueden clasificarse según su respuesta al LPS en un fenotipo M1, si su respuesta a endotoxina da como resultado la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, o M2 (también conocido como activación alternativa) caracterizados por presentar una elevada expresión de IL-10 y bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias (82). Por lo tanto los MØ M1 se caracterizan por presentar un fenotipo IL-12<sup>alto</sup>, IL-23<sup>alto</sup>, IL-10<sup>bajo</sup> mientras que los M2 presentan un perfil IL-12<sup>bajo</sup>, IL-23<sup>bajo</sup>, IL-10<sup>alto</sup> con una capacidad variable de producir citoquinas pro-inflamatorias, una elevada capacidad fagocítica y una baja capacidad de presentación antigénica (83, 84). En conclusión varios datos de nuestro laboratorio ponen de manifiesto que los MØ tolerantes parecen manifestar un fenotipo M2 (85).

Sin embargo, las modificaciones de las expresiones de citoquinas en un estado TE no es más que un reflejo de las modificaciones que se producen en las cascadas de señalización que involucran la expresión de dichas citoquinas. Trabajos previos revelan que la ruptura de la vía de señalización TLR/MyD88/IRAK-4/IRAK-1/TRAF (71), y muchas moléculas han sido implicadas en este proceso. En este sentido, un estudio desarrollado en un modelo *in vivo* de bacteremia con voluntarios sanos, sugiere que en humanos la IRAK-M tiene un papel rector sobre otras candidatas como pueden ser SHIP-1 o ST2 (86).

### **1.5 b) IRAK-M**

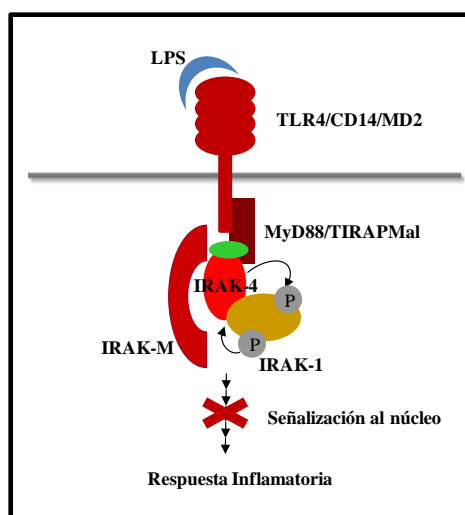
IRAK-M ha sido descrita como un miembro de la familia de las IRAKs, carente de actividad quinasa, expresada principalmente en células de origen monomielo-cítico. IRAK-M tiene la capacidad de asociarse a IRAK-4 (87) y existen evidencias de su capacidad de unirse a IRAK-1 (88), rompiendo la vía de señalización TLR/MyD88/IRAK-4/IRAK-1/TRAF y por tanto la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

El mecanismo por el cual IRAK-M actúa bloqueando la cascada de señalización aún no se conoce. Un minucioso análisis estructural y evidencias indirectas, sugieren que IRAK-M potencia la unión del complejo MyD88/IRAK-4/IRAK-1, evitando la disociación de dicho complejo y por ello, la iniciación de la cascada de señalización (FiguraI3) (71). 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 (71).

Funcionalmente, IRAK-M se ha descrito como un regulador negativo de la señalización inducida por diversos TLR, no induciéndose el fenotipo de TE en ratones deficientes para este gen (89). Estos datos orientaron el estudio de esta pseudoquinasa hacia su implicación en diversos procesos de tolerancia.

En general, la IRAK-M parece estar asociada a diversos procesos, tanto fisiológicos como patológicos, donde se dan fenómenos de tolerancia. En estos procesos se puede mediar la inducción de esta pseudoquinasa. Así, se ha observado la sobreexpresión de IRAK-M en diversas patologías que presentan periodos de TE como procesos sépticos (90), síndromes coronarios agudos (91), cáncer (92), osteoporosis (93), enterocolitis necrotizante (94) y enfermedades biliares (95).



**Figura I4.** Representación gráfica de la actuación de IRAK-M en la cascada de señalización de TLR4, bloqueando la cascada se impidiendo que progrese la señalización.

### 1.6 Implicaciones clínicas de la tolerancia a endotoxina.

Como hemos mencionado anteriormente, la TE se caracteriza por una respuesta reducida a endotoxina tras un primer encuentro con ella. Por una parte, el proceso de TE ha sido asociado a un incremento en la resistencia y protección contra daños en tejido e incluso en modelos que producen mortalidad como isquemia hepática, isquemia renal, oclusión coronaria o choque hemorrágico (70). Esta protección contra el

daño a situaciones de estrés ilustran como el proceso de tolerancia va aún más lejos de una simple respuesta inflamatoria alterada.

Por otra parte, enfermedades con un gran componente inflamatorio son candidatas a sufrir periodos de TE, debido a que el exceso de inflamación puede ser causa directa de la desregulación del sistema inmune. Se han documentado periodos de tolerancia en enfermedades de etiologías muy dispares como pacientes aquejados de síndromes coronarios agudos (91), cáncer (92) y SIRS (del inglés Systemic Inflammatory Response Sndrome) generado por trauma, cirugía, *bypass* cardiovascular, infarto cardiaco con resucitación y choque hemorrágico. Todas ellas asociadas a un aumento a la sensibilidad a infecciones nosocomiales (70). También han sido documentada ampliamente, una respuesta alterada de los MØ circulantes en pacientes sépticos, donde la reactividad normal nunca no se llega a restaurar en pacientes que no sobreviven (70). Además los pacientes supervivientes de un choque séptico sufren complicaciones por las infecciones secundarias debido a que un significativo subgrupo de ellos manifiestan TE lo que incrementa la frecuencia de infecciones hospitalarias (70).

Existen por tanto diversas enfermedades que potencialmente pueden presentar, a lo largo de la evolución de la enfermedad, varios periodos de estados refractarios o TE, siendo un indicio de ello las múltiples colonizaciones por patógenos de diversa índole. Dentro de este grupo de enfermedades cabe destacar las enfermedades pulmonares. Las exposiciones a LPS en las vías respiratorias cursan con una respuesta temprana frente a las toxinas inhaladas, esto implica el reclutamiento de macrófagos a los pulmones, donde llevan a cabo la fagocitosis y seguidamente son eliminados por el arrastre ciliar del epitelio respiratorio. Este proceso se ve afectado en pacientes de fibrosis quística (FQ).

### **1.6.1 Fibrosis quística**

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva letal más frecuente en la raza caucásica; de evolución crónica, progresiva y compromiso multisistémico. Un avance crucial en el entendimiento de la FQ fue la clonación del gen causante de esta enfermedad denominado CFTR (del inglés “Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator”) (96). La proteína que codifica para este gen se localiza en la porción apical de la membrana de las células epiteliales y en las células secretoras,

senos paranasales, pulmones, páncreas exocrino, hígado e intestino. Por ello la mutación en esta proteína produce el deterioro de estos órganos y las complicaciones secundarias como malnutrición y diabetes (96). Se han identificado al menos 1523 mutaciones de este gen que producen distintas manifestaciones clínicas, la más común en la raza caucásica se denomina  $\Delta F508$ . Aunque es considerable el conocimiento molecular de CFTR, aún no se sabe exactamente cuál es la conexión entre la mutación del gen y la enfermedad pulmonar (96). El CFTR es un canal de cloro responsable del transporte de iones y otras moléculas diferentes al cloro. Funciona como un exportador de membrana dependiente de AMP cíclico regulando la “exportación de iones” mediante la rectificación del canal, además de autoregular los canales sensibles de sodio (96, 97). El transporte de electrolitos es parcialmente responsable de la cantidad y composición del fluido en la superficie de la vía aérea, ASL (del inglés “Airway Surface Liquid”). El ASL es una fina capa de 20-25  $\mu\text{m}$  de profundidad de los cuales sólo 10  $\mu\text{m}$  es líquido y el resto mucosidad. El ASL proporciona una barrera defensiva frente a toxinas y agentes infecciosos, además de mantener un estado de hidratación “normal”. La alteración del ASL lleva a continuas colonizaciones en las vías aéreas de los pacientes. *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* son las bacterias más frecuentemente aisladas en el tracto pulmonar de niños con FQ (98). A diferencia de otras enfermedades, la FQ exhibe una clara distribución de gérmenes adquiridos en función de la edad (98). El *S. aureus* es usualmente el primer patógeno aislado de la vía aérea de los pacientes con FQ, con una tasa de infección que disminuye con la edad, mientras que por su parte la tasa de *P. aeruginosa* se incrementa (96-98). La presencia de *S. aureus* en el tracto respiratorio de forma intermitente debe obligar a su erradicación completa por ser quien mayor destrucción produce en la vía aérea (96, 97). Existen varias hipótesis de como la alteración del ASL facilita una infección temprana y persistente de las vías aéreas. La primera hipótesis afirma que la deshidratación de la vía interfiere con el trabajo de limpieza ciliar, produciendo un incremento de las bacterias e iniciando un proceso de inflamación. La segunda hipótesis defiende que la alteración de la proteína CFTR produce elevadas concentraciones de cloro y sodio en las vías aéreas, este hecho da como resultado la inactivación de las  $\beta$ -defensinas presentes en dichas vías. La inactividad de estos péptidos bactericidas potencia la instauración de patógenos en las vías aéreas (96, 97, 99). Sin embargo, no se ha demostrado si la ineficiencia en la eliminación de agentes patógenos en las vías aéreas se deba a un fallo en la primera línea de defensa del organismo, es decir, que los

macrófagos de estos pacientes se encuentren en un estado de TE y no respondan desarrollando una respuesta inmune innata eficiente, pregunta que intentaremos responder en este trabajo.



## ***OBJETIVOS DEL ESTUDIO***



## 2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar la implicación de TREM-1 y sTREM-1 en el proceso de tolerancia a endotoxina, usando modelos *in vitro* y una patología asociada, la fibrosis quística.

Concretamente:

- Planteamos definir el origen de la variante soluble de TREM-1.
- Determinar la cinética y la dinámica de TREM-1 en un modelo de tolerancia a endotoxina, así como su implicación en la modulación de este fenómeno.
- Profundizar en el mecanismo molecular que subyace al fenómeno de tolerancia a endotoxina y su relación con TREM-1.
- Evaluar la implicación de TREM-1 en una patología que presenta periodos de tolerancia como es la fibrosis quística.



## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Reactivos.

Todos los reactivos utilizados, se compraron a las siguientes casas comerciales: Merck (Darmstadt, Alemania), Boehringer (Mannheim, Alemania), y Sigma (San Luis, MO, EEUU).

El medio de cultivo utilizado fue el DMEM (Dulbecco's MEM) de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). El medio estaba suplementado con 100 UI/ml de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB). Ambos antibióticos y el suero procedían de Invitrogen.

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 cóctel inhibidor estándar de proteínas (st-INH) se obtuvo de Roche Diagnostics (Penzberg, Alemania), y el inhibidor general de metaloproteasas (MMP) denominado GM6001 se adquirió de Chemicon Internacional (Temecula, CA). El inhibidor de la actividad PI3K, LY294002, se obtuvo de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). La proteína recombinante completa y soluble de TREM-1 (s<sup>7</sup>TREM-1) se obtuvo de Abnova (Walnut, CA, EEUU). La brefeldina A se adquirió de Biolegend (San Diego, CA, EEUU).

Todas las soluciones, medios de cultivo e inhibidores estaban libres de contaminación por LPS, testándolo por el test de limulus, utilizando el Limulus Amebocyte Lysate kit de Cambrex (East Rutherford, NJ, EEUU).

#### ***3.1.a) Diseño, síntesis y purificación de péptidos derivados de TREM-1.***

Para identificar las áreas de TREM-1 que median las interacciones proteína-proteína, comparamos independientemente las estructuras de los dominios Ig de TREM-1 en mamíferos (entradas PDB 1Q8M, 1U9K and 1SMO) que se encontraban en los servidores PPI-Pred ([http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/ppi\\_pred/](http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/ppi_pred/)) y Q-SiteFinder (<http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/qsitefinder/>). Los resultados de estos análisis están resumidos en la Figura M1; las tres regiones que contienen la mayoría de los residuos potencialmente involucrados en interacciones incluyen *loops* topológicamente equivalentes a las regiones determinantes en complementariedad de inmunoglobulinas CDR (del inglés “Complementarity Determining Regions”).

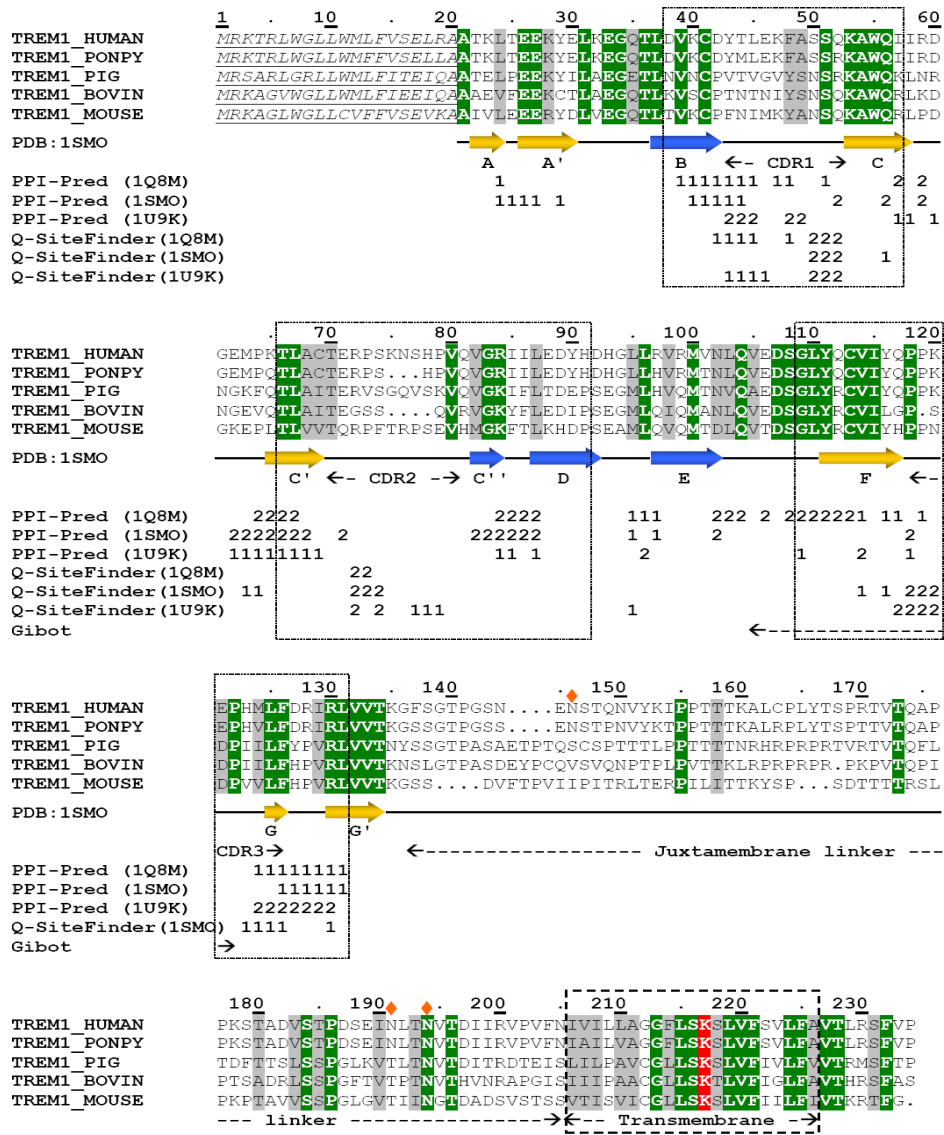
Estas regiones se eligieron para la síntesis de los péptidos y fueron denominados CDR1, CDR2 y CDR3. Analizando la estructura en 3D de TREM-1 llevamos a cabo una serie de sustituciones conservativas de aminoácidos lo que nos permitía tener una mejor aproximación a la estructura nativa de estos dominios en la proteína de origen. Se puede observar que la sustitución del residuo Trp<sup>55</sup> por una cisteína podría seguir formando un puente disulfuro con la Cys<sup>41</sup> (péptido CDR1). De manera similar, remplazando dos residuos que están ocultos en la estructura nativa, Ala<sup>68</sup> y Val<sup>82</sup> por cisteínas podría también facilitar la formación de un puente disulfuro en el interior del péptido (CDR2). El residuo Cys<sup>69</sup> fue remplazado por su homólogo en ratón (Val) para evitar la dimerización de péptidos. Finalmente no se introdujo una unión por puentes disulfuro en el caso del tercer péptido (CDR3), ya que de manera general las láminas  $\beta$ F y  $\beta$ G' se conectan por varios puentes de hidrógenos de lámina  $\beta$  a lámina  $\beta$ , así cabría esperar que esto ayudase a formar el *loop* y adoptar una forma nativa en solución. Para evitar la oxidación, el residuo Cys<sup>113</sup> fue reemplazado por una serina isotérica y Met<sup>125</sup> por una valina. CDR3 es un péptido equiparable al utilizado en publicaciones anteriores y denominado LP17 (41, 49). La secuencia de los péptidos diseñados se representan en la Tabla M1.

Péptido	Secuencia
CDR1	<b>D<sup>38</sup>VKCDYTLKFASSQKACQI<sup>57</sup></b>
CDR2	<b>T<sup>66</sup>LCVTERPSKNSHPVQCGRILEDYH<sup>91</sup></b>
CDR3	<b>G<sup>109</sup>LYQSVIYQPPKEPHVLFDRIRL<sup>131</sup></b>

**Tabla M1.** Secuencia de péptidos de TREM-1 sintetizado.

Los *loops* topológicamente equivalentes a los CDRs se encuentran destacados en negrita. Los péptidos fueron sintetizados, oxidados, purificados y su pureza fue verificada por un análisis de aminoácidos por espectrometría de masas en el Parc Científic de Barcelona (Barcelona, Madrid).





**Figura M1.** Alineamiento de la secuencia basadas en la estructura de TREM-1 en diferentes especies y los posibles lugares de interacción proteína-proteína. Los residuos conservados son blancos son resaltado de color verde, menos los residuos de lisina requeridos para la unión de DAP12 que son rojos; las sustituciones conservativas son resaltadas en color gris. Están numeradas las referencias del receptor completo en humanos. Los péptidos señal están en *itálica* y subrayados. La hélice transmembrana está seleccionada con un cuadrado punteado. Los elementos estructurales secundarios para el dominio Ig por debajo de los alineamientos corresponden a la estructura cristalizada de TREM-1 (100), las tendencias son coloreadas de acuerdo con la lámina  $\beta$  a la que pertenecen. Los sitios potenciales de N-glicosilación están marcados con rombos naranjas. Los residuos que coinciden en las predicciones de interacción proteína-proteína de los servidores PPI-Pred y Q-SiteFinder, son marcados como 1 y 2 respectivamente. Las tres áreas de interacción más probable están incluidas en las regiones hipervariables topológicamente equivalentes a los CDRs en inmunoglobulinas; se ha usado la nomenclatura de la Ig para el diseño de los péptidos. La secuencia de los péptidos sintetizados está indicada.

### 3.1.b) Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en el presente trabajo, su tipo, especie de procedencia, y empresa suministradora se muestran en la Tabla M2 y M3.

Anticuerpo	Tipo	Especie	Empresa
Anti-TREM-1-PE	Monoclonal conjugado a PE	Ratón	R&D System (Miniápolis, MN, EEUU)
Anti-TLR4/MD2-FITC	Monoclonal conjugado a PE	Ratón	
Anti-IL-12p35/p70-APC	Monoclonal conjugado a APC	Ratón	Miltenyi Biotec (Auburn, CA, EEUU)
Anti-CD14-APC	Monoclonal conjugado a APC	Ratón	
Anti-CD14-FITC	Monoclonal conjugado a FITC	Ratón	Serotec  (Oxford, UK)
Anti-CD1a-FITC	Monoclonal conjugado a FITC	Ratón	
Anti-CD16b-FITC	Monoclonal conjugado a FITC	Ratón	
Anti-CD89-FITC	Monoclonal conjugado a FITC	Ratón	
Anti-cabra-FITC	Policlonal	Conejo	

**Tabla M2.** Anticuerpos conjugados.

Anticuerpo	Tipo	Especie	Empresa
Anti-TREM-1	Monoclonal	Cabra	R&D System (Miniápolis, MN, EEUU)
Anti-TLR4	Monoclonal	Ratón	
Anti-TNF $\alpha$	Policlonal	Conejo	Santa Cruz  (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-I $\kappa$ B	Policlonal	Conejo	
Anti-pI $\kappa$ B	Monoclonal	Ratón	
Anti- $\beta$ -Actina	Monoclonal	Ratón	
Anti-ERK1/2	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling  (Danvers, MA)
Anti-pERK1/2	Monoclonal	Conejo	
Anti-AKT	Monoclonal	Conejo	
Anti-p-AKT	Monoclonal	Conejo	
Anti-NF $\kappa$ B-p65	Monoclonal	Ratón	
Anti-pU.1	Monoclonal	Conejo	
Anti-IRAK-M	Policlonal	Conejo	Chemicon (Temecula, CA, EEUU)

**Tabla M3.** Anticuerpos no conjugados.

### 3.2.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

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

Partiendo de *buffy coats* y sangre periférica extraída de voluntarios sanos (VS), pacientes con Fibrosis Quística (FQ) y con Enfermedad pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), aislamos CMSP por centrifugación en gradiente de densidad, utilizando el reactivo Ficoll-Hypaque Plus de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU).

Tanto en el caso de utilizar *buffy coats* para experimentos *in vitro* o sangre periférica de donantes, purificamos MØ por el siguiente método: una vez obtenidas las CMSP, las cultivamos durante una hora en DMEM con antibiótico y sin suero a una densidad de  $20 \times 10^6$  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 medio de cultivo esta vez suplementado con un 10 % SFB. Se dejaron reposar durante 16 horas, y posteriormente, se iniciaron los tratamientos oportunos.

En todos los cultivos se testó la homogeneidad, analizando la expresión superficial del marcador CD14 por citometría de flujo. Las células adheridas expresaban el marcador en un  $(85.6 \pm 2.3 \%)$  (Media  $\pm$  Desviación Estándar;  $M \pm DE$ ).

Esta metodología se ha usado en varios trabajos en nuestro laboratorio (78, 85, 91, 92)

### 3.3.- Tratamientos

Los cultivos de MØ humanos sobre los que se realizaron los diferentes tratamientos, siempre se llevaron a cabo en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y 1% de antibiótico. Los tratamientos con LPS se realizaron a una dosis de 10 ng/ml.

En el modelo de TE, los MØ humanos se pre-trataron durante 8 horas con LPS (tiempo de tolerización  $t_{tol}$ ). Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS (del inglés “Phosphate Buffered Saline”) y se mantuvieron en medio durante 16 horas (tiempo de recuperación  $t_{rec}$ ). Después las células fueron re-estimuladas con LPS por periodos de

tiempo comprendidos entre 1 a 72 horas (tiempo de estimulación  $t_{est}$ ). En este trabajo, las células no tratadas se indican con la letra “c”. Los tratamientos con el término “tol” corresponden a  $t_{tol}=8h$ ,  $t_{rec}=16h$  y  $t_{rec}$  variará de 1 a 72 h según el parámetro a valorar (101).

Las células que tienen una sola exposición a LPS, sin pre-tratamientos, aparecen indicados como c+LPS. Para algunos experimentos se utilizaron, un coctel de inhibidor de proteasas (st-INH), o un inhibidor general de MMPs indicado como GM6001. Así como inhibidor de PI3K (LY294002) o la proteína recombinante completa de TREM-1 indicado como s<sup>+</sup>TREM-1. El tiempo de estimulación varía según el parámetro a valorar, y aparece indicado en cada caso en los pies de figura.

### **3.4.- Aislamiento de ARN y proteínas.**

#### **3.4 a) ARN.**

Después de cada uno de los tratamientos los MØ humanos, se lavaron tres veces con solución tampón PBS. El aislamiento del ARN total de estas células se llevó a cabo utilizando el kit High Pure RNA Isolation Kit de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), el cual incluye tratamiento con ADNs<sup>a</sup> I. Obteniendo la muestra de ARN de partida para sintetizar ADN complementario (ADN<sup>c</sup>).

#### **3.4. b) Proteína.**

Los MØ humanos tras el tratamiento, se lavaron dos veces con PBS. Después se resuspendieron en un buffer de lisis, a 4°C, que contenía: TrisHCl 10mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Triton x-100 1% e inhibidor de proteasa de Sigma (San Luis, MO, EEUU) en la concentración que indicada por el fabricante. Tras esto, para eliminar los restos de la membrana plasmática, se centrifugó a 13000 rpm. Las muestras se congelaron a -80°C hasta su uso.

### **3.5.- Cuantificación del ARN mensajero.**

Partiendo de 1 µg de ARN libre de ADN obtenido según el punto anterior, sintetizamos ADN complementario utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU).

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

(Q-PCR) en tiempo real. Para ello utilizamos el sistema LightCycler de Roche. Las reacciones de Q-PCR se realizaron utilizando el kit Quantimix Easy SYG de Biotools (Madrid, España). Los cebadores específicos detallados en la Tabla M2, todos ellos fueron sintetizados, desalados y purificados mediante HPLC por Bonsai Biotech (Alcobendas, Madrid).

Gen	Cebador Sentido (5' → 3')	Cebador Antisentido (5' → 3')	Tm
TNF $\alpha$	AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	TCCACATCTGCTGGAAGGTGG	62
IL-6	CAAAGAATTAGATGCAATAA	GCCCATTAACAACAACAATCTG	54
IL-12p40	GACATTCAGTGTCAAAGCAGCA	CCTTGTGTCCCTCTGACTCT	52
IL-23p19	GTTCCCATATCCAGTGTGG	GAGGCTTGGAAATCTGCTGAG	60
IL-10	CCCCAAGCTGAGAACCA	TCTCAAGGGGCTGGGTGACG	68
IRAK-M	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA	GCATTGCTTATGGAGCCAAT	62
TREM-1	GGACGGAGAGATGCCCAAGAC	ACCAGCCAGGAGAATGACAAT	62
CCL3	TGC ATC ACT TGC TGC TGA CA	CTT CTG GAC CCC TCA GGC ACT	60
CCL4	AAG CTC TGC GTG ACT GTC CT	GCT TGC TTC TTT TGG TTT GG	60
CCL20	GCA AGC AAC TTT GAC TGC TG	TGG GCT ATG TCC AAT TCC AT	60
CCL22	GAG ACA TAC AGG ACA GAG CAT GGC T	ATG GAG ATC AGG GAA TGC AGA GAG	64
$\beta$ -Actina	GTCCACCTCCAGCAGATGT	CATCTTACCCTCCAGTTT	62

**Tabla M4.** Secuencia y Tm 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  $\beta$ -actina.

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 luego, 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 Q-PCR, 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 analizados 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.

Cada programa de Q-PCR 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.

### **3.6. Análisis “Southern blot”**

El ADNc total se obtuvo de CMSP, de la misma manera que se ha mencionado anteriormente. Se realizó una electroforesis del ADNc (40µg/muestra) en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente se hizo la transferencia a una membrana Immun-Blot de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU) por capilaridad. Se llevó a cabo la hibridación con una sonda marcada con biotina TREM-1 (5´-AAATGACGCGCAGGCTTACC-3´) y β-actina (5´-GTACCACTGGCATCGTGATG-3´) fabricados por Bonsai Biotech (Alcobendas, Madrid). Las membranas fueron bloqueadas, incubadas con conjugados de estreptavidina peroxidasa, y lavadas. La señal correspondiente al ADNc hibridado fue detectada por quimioluminiscencia usando ECL Direct Nucleic Acid Labeling de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU) y un sistema de detección siguiendo protocolos previos establecidos (102).

### **3.7. Análisis por citometría de flujo.**

Los MØ humanos tratados con LPS se lavaron con PBS e incubaron con anticuerpo de 15-20 min en función del anticuerpo, después de este tiempo las células se lavaron con PBS y se analizaron por citometría de flujo usando FACSCalibur de BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU) equipado con un laser de argón de 25mW. Para comprobar la unión específica se utilizó un control de isotipo apropiado.

#### ***3.7.1 Medición intracelular de citoquinas.***

Después de la estimulación de los MØ con LPS durante 1 hora, se incubaron en presencia o ausencia de brefeldina A 1.4 µmol/L durante 6 horas. A continuación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Después se lavaron con PBS y se permeabilizaron con solución permeabilizadora 15 min. (FACS permeabilizing solution II de BD (San Jose, CA, EEUU)), tras este periodo de tiempo las células se lavaron con PBS y se incubaron con CD14-FITC e IL-12-APC durante 30 min a temperatura ambiente y se adquirieron en un citómetro de flujo como el descrito anteriormente.

### **3.8. Inmunohistoquímica.**

Las MØ humanos cultivados en placas de vidrio se fijaron durante 15 min con 2% de paraformaldehído en PBS (pH 7.3). A continuación las muestras se bloquearon usando un suero bloqueante de Universal Quick kit (Vector Laboratories), se aclararon, e incubaron con el anticuerpo anti-TREM-1 (dilución 1/1000 en PBS) durante la noche a 4°C. Las muestras se lavaron dos veces en TTBS (Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 150mM y Tween 20 al 0.2%), después se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (1/4000 en TTBS) durante 1h. A continuación se aclararon con TTBS, y los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (1/8000 en TTBS) de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU), se incubaron durante 5-10 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS; el exceso de buffer se secó y las muestras finalmente se montaron en medio de montaje. Las células se observaron y fotografiaron en un microscopio Leica DMI6000 B de Leica Microsystem.

### **3.9. Análisis por Western Blot.**

Las proteínas obtenidas (ver punto 3.4) 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 TTBS. Después de los lavados, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios oportunos, 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, se detectaron los anticuerpos unidos utilizando el reactivo quimioluminiscente ECL Plus de Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.10. Arrays de anticuerpos.**

Se midieron la concentración de varias citoquinas y quimioquinas del sobrenadante del cultivo de MØ usando RayBio Human Inflammation Ab Array II de RayBiotech (Norcross, GA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos fueron normalizados con un control positivo. Las unidades arbitrarias de intensidad se midieron en cada una de las membranas para cada citoquina.

### **3.11. ELISA para TNF- $\alpha$ , IL-6, sTREM-1 y PGE<sub>2</sub>**

Se determinaron los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6, en el sobrenadante del cultivo de MØ humanos, con el kit suministrado por Preprotech (Rocky Hill, NJ) y un ELISA comercial de Bender MedSystems (Burlingame, CA, EEUU), respectivamente. Las concentraciones en el sobrenadante de los cultivos de MØ de sTREM-1 y PGE<sub>2</sub> se determinaron con ELISAs disponibles comercialmente de R&D Systems (Miniápolis, MN, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **3.12. Ensayos de apoptosis.**

Al finalizar la mayoría de los experimentos del 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. Se marcaron las células, y se analizó la expresión de anexina V e Ioduro 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, y el control de cada experimento.

### **3.13. Pacientes y voluntarios sanos.**

En el estudio se incluyeron 20 adultos no fumadores diagnosticados de FQ en base a los criterios establecidos (genotipado del gen CFTR (del inglés “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator”), la prueba del sudor y el fenotipo clínico (103)), estos pacientes no usaron corticoides inhalados u orales durante los tres meses previos al estudio (Tabla M5). También estudiamos 10 pacientes clínicamente estables con moderada-severa EPOC (post-broncodilatador VEF<sub>1</sub> < 80% de la predicha y VEF<sub>1</sub> /



capacidad vital forzada (CVF)  $\leq 70\%$ ) (104)). Los criterios de exclusión incluían un historial de asma, otras enfermedades pulmonares activas, como fallo cardiaco congestivo, isquemia o cardiopatía vascular y enfermedad neuromuscular. Ninguno de los sujetos de estudio experimentó una exacerbación o infección del tracto respiratorio en las cuatro semanas previas al estudio, y ninguno de ellos experimentó una significativa reversibilidad broncodilatadora ( $> 12\%$  del basal de  $VEF_1$  o  $> 200$  ml). Los sujetos no tenían administración oral en los tres meses anteriores al estudio (Tabla M6). Además, 10 voluntarios sanos de la misma edad y sexo, sin ningún historial de enfermedad por FQ ni enfermedades significativas, se incluyeron como controles.

Las siguientes variables clínicas fueron recogidas en los sujetos de estudio: edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), genotipado CFTR, la escala de disnea del MCR (del inglés “Medical Research Council”), gas de sangre, espirometría basal, exacerbaciones en pacientes con EPOC moderada-severa, severidad del EPOC, microorganismos en el esputo y la terapia utilizada usualmente.

Sujeto	Edad (años)	Sexo	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Mutación CFTR	VEF <sub>1</sub> (%)	VEF <sub>1</sub> /CVF(%)	Microorganismos en el esputo	Broncodilatador inhalado	ADNsa humanas	Antibiótico inhalado
1	23	M	20.2	ΔF508 / ?	59.5	55.9	<i>P. aeruginosa</i>	Formoterol	No	Colimicina
2	39	M	25.1	ΔF508 / ΔF508	87.4	81.4	<i>P. aeruginosa</i>	Salbutamol	2.5 mg/d	Tobramicina
3	28	F	20.1	ΔF508 / ?	66.2	82.2	<i>H. influenzae, S. aureus</i>	Formoterol	No	Nada
4	31	M	17.7	ΔF508 / ΔF508	21.6	48.8	<i>C. albicans</i>	Salmeterol, salbutamol	2.5 mg/d	Nada
5	23	F	18.3	ΔF508 / W1282x	76.3	88.8	<i>H. influenzae, S. aureus, P. aeruginosa</i>	Formoterol	2.5 mg/d	Tobramicina
6	30	F	21.8	ΔF508 / ?	32.8	65.3	<i>P. aeruginosa</i>	Salbutamol,	No	Colimicina
7	30	M	25.2	ΔF508 / ΔF508	73.8	70.6	<i>P. aeruginosa</i>	Salmeterol	No	Tobramicina
8	28	F	18.5	ΔF508 / ?	80.1	75.2	<i>H. influenzae, S. aureus, MAC</i>	Salbutamol	No	Nada
9	28	M	22.3	ΔF508 / ?	81.0	79.1	<i>B. cepacia</i>	Nada	No	Nada
10	21	M	23.2	R553 / 2789+5G->A	85.2	72.9	<i>S. aureus, P. aeruginosa</i>	Nada	No	Tobramicina
11	29	M	21.8	ΔF508 / ΔF508	33.9	48.4	<i>P. aeruginosa</i>	Salmeterol, salbutamol	No	Colimicina
12	68	F	26.3	ΔF508 / ΔF508	65.0	70.3	<i>P. aeruginosa</i>	Salmeterol	No	Nada
13	32	M	22.8	ΔF508 / ΔF508	79.4	75.1	<i>P. aeruginosa</i>	Salbutamol	No	Nada
14	22	F	23.0	ΔF508 / ΔF508	35.9	55.4	<i>S. aureus, P. aeruginosa</i>	Formoterol, salbutamol	2.5 mg/d	Tobramiacin
15	27	F	20.8	R334W / 1069delICA	47.5	66.2	<i>P. aeruginosa</i>	Salmeterol, salbutamol	No	Tobramicina
16	26	M	21.1	ΔF508 / ?	82.4	76.2	<i>H. influenzae, S. aureus, P. aeruginosa</i>	Nada	No	Nada
17	31	M	22.4	ΔF508 / ΔF508	51.2	64.3	<i>P. aeruginosa</i>	Salmeterol	No	Tobramicina
18	24	M	21.7	ΔF508 / ?	83.2	71.7	<i>H. influenzae, S. aureus</i>	Nada	No	Nada
19	23	F	20.3	ΔF508 / ΔF508	43.1	65.9	<i>P. aeruginosa</i>	Formoterol	No	Colimicina
20	28	F	23.7	ΔF508 / ?	39.8	67.0	<i>P. aeruginosa</i>	Salbutamol, salmeterol	No	Tobramicina

**Tabla M5.** Datos clínicos de los pacientes FQ incluidos en nuestro estudio. MAC. *Mycobacterium avium complex*.

Sujeto	Sexo	Edad (años)	IBM (Kg/m <sup>2</sup> )	CVF (%)	VEF <sub>1</sub> (%)	VEF <sub>1</sub> / CVF	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	MRC	Exacerbación en el último año/ Grado	Treatment
1	M	82	23.6	109	73	0.49	55.8	41.6	4	3 / IV	LTOT, salmeterol, fluticasona (2000 mcg), ipratropio NAC, salbutamol
2	M	69	29.1	77	33	0.33	67.5	42.8	2	4 / III	Salmeterol, fluticasona (1000 mcg), tiotropio, salbutamol, NAC
3	M	68	25.2	59	21	0.27	68.8	48.4	3	2 (3) / IV	Salmeterol, fluticasona (1000 mcg), tiotropio, teophiline, NAC, salbutamol
4	M	68	23.5	100	44	0.35	78.0	37.3	2	0 / III	Tiotropio, salbutamol
5	M	65	22.9	77	35	0.35	60.5	55.5	2	1 / III	Formoterol, budesonida (800 mcg), tiotropio, salbutamol
6	M	73	28.0	69	43	0.48	56.1	46.1	2	2 / III	Salmeterol, fluticasona (2000 mcg), tiotropio, salbutamol
7	F	66	30.5	133	75	0.47	73.0	35.2	1	3 / II	Salmeterol, fluticasona (1000 mcg), tiotropio, salbutamol
8	M	59	28.7	84	67	0.63	78.6	34.6	2	2 / II	Tiotropio, salbutamol
9	M	79	29.3	90	68	0.56	69.9	32.0	2	0 / II	Salmeterol, ipratropio
10	M	63	34.8	92	69	0.59	58.3	38.6	4	5 / II	Salmeterol, fluticasona (1000 mcg), ipratropio, teophiline, NAC, salbutamol

**Tabla M6.** Datos clínicos de los pacientes EPOC incluidos en nuestro estudio. NAC, N-Acetyl-Cystein.

### 3.14 Análisis estadísticos.

El número de réplicas para cada uno de los experimentos realizados viene indicado en cada uno de los pies de las figuras.

Para cada experimento donde analizamos la expresión de diversos genes por Q-PCR, partíamos de los datos arrojados por al menos tres réplicas para calcular las medias y desviaciones estándar. En el caso de estudiar la expresión proteica por ELISA, utilizamos los datos proporcionados por dos réplicas. Con estos parámetros, aplicando el estadístico *t de Student*, consideramos una significación estadística en las diferencias de expresión observadas, para valores de  $p < 0,05$  o  $p < 0,01$  indicada, esta significación se indica en las figuras con (\*) o (\*\*), respectivamente. Para los análisis de los datos de pacientes se han utilizado gráficos de cajas llevados a cabo con un U test de Mann-Whitney usando el software GraphPad Prims 4.0.

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 o la gráfica del densitometrado de las bandas.

## ***RESULTADOS***



## 4. Resultados.

### 4.1 El pre-tratamiento de monocitos humanos con LPS induce tolerancia a endotoxina “*in vitro*”.

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 un choque séptico (71).

En los procesos de tolerancia, tras un primer encuentro con el LPS, la respuesta del SII 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 de este sistema.

Los MØ son unos de los primeros efectores de la inmunidad innata durante la infección y se ha demostrado ampliamente su papel en la TE (74, 78, 85). Por tanto serán las células elegidas para llevar a cabo nuestro modelo. El modelo de TE en nuestro caso se esquematiza de manera general en la Tabla R1.

Condición Experimental	1er Estímulo de LPS	Lavado	2o Estímulo LPS
Control (c)	-	+	-
Tolerancia (tol+LPS)	+	+	+
Tratamiento (c+LPS)	-	+	+

**Tabla R1.** Estructura general del modelo de tolerancia utilizado “*in vitro*”.

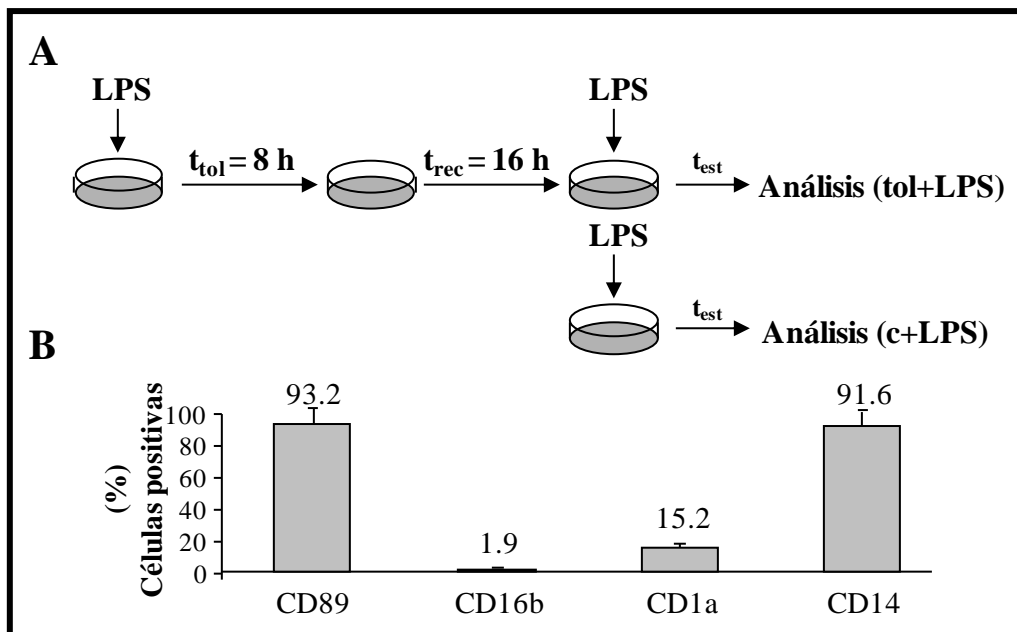
Se representa la estructura general del modelo de tolerancia a endotoxina. Las condiciones experimentales surgen de la implantación (+) o no (-) de cada uno de los dos estímulos que forman el modelo.

El modelo general de tolerancia, está basado en dos estímulos, dando lugar a dos condiciones experimentales y un control en cada experimento. El primer estímulo, simula el encuentro inicial del SII con el LPS, 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 (c).- Control de actividad basal; se trata de las células sin estimular.
- b) Tolerancia (tol+LPS).- Tolerantes. Los cultivos son expuestos a los dos estímulos con LPS. Después de la primera estimulación, las células son lavadas para eliminar dicho agente. Con el segundo estímulo, se refleja el fenotipo tolerante.
- c) Tratamiento (c+LPS).- Controles expuestos a LPS. Representa el estímulo con el agente causante de la inflamación *per se*.

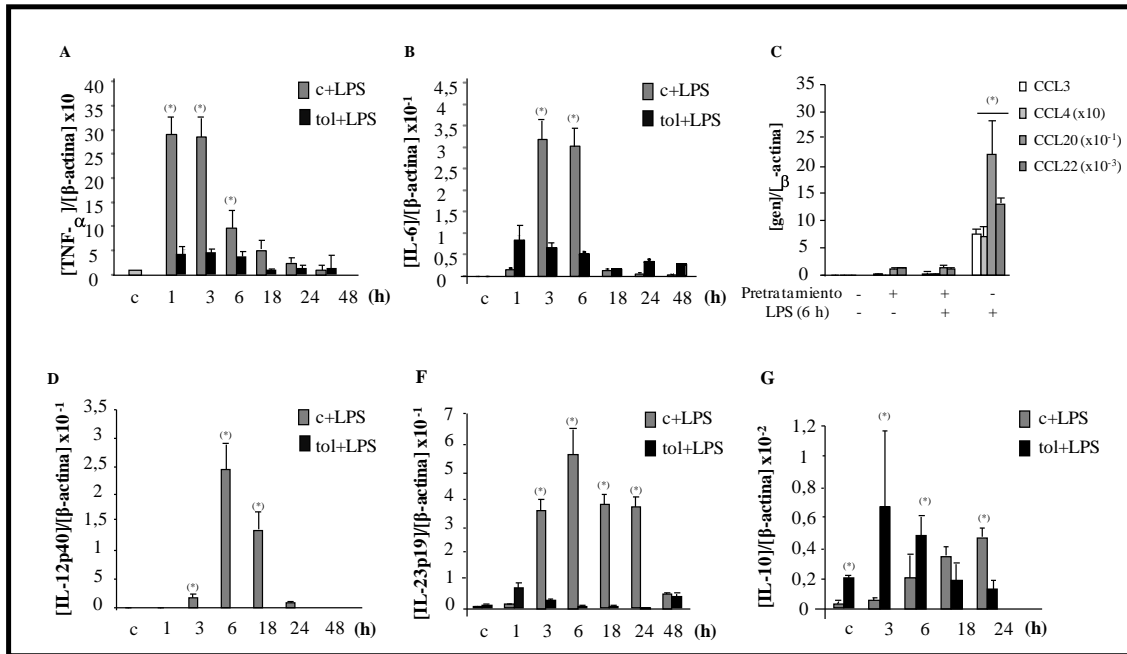
En nuestro caso establecimos previamente un sólido y reproducible modelo de TE en MØ humanos, en el cual los MØ son pre-tratados durante 8 horas con LPS ( $t_{tol}$ ), después se mantienen en reposo o recuperación durante 16h ( $t_{rec}$ ) antes de una segunda estimulación ( $t_{est}$ ) cuyos tiempos dependerán del análisis que se quiera llevar a cabo (Figura R1A) (101). Aislamos estas células partiendo de sangre periférica por ficoll y adherencia y comprobamos su pureza por citometría de flujo, confirmando que tenemos una población monocítica esencialmente pura ( $\cong 90\%$  de células CD14 positivas) y niveles no significativos de CD16b y CD1a (Figura R1B).



**Figura R1.** Representación gráfica del modelo de TE. Los MØ humanos se aislaron de voluntarios sanos. **A.** Representación esquemática del modelo TE usado en este trabajo ( $t_{tol}$ ,  $t_{rec}$  y  $t_{est}$  que indican tiempo de inducción de tolerancia, tiempo de recuperación del sistema y tiempo de estimulación, respectivamente) **B.** La pureza de los cultivos se verificó por marcaje con anticuerpos específicos conjugados con fluoróforos seguido de un análisis por citometría de flujo ( $n=3$ ).



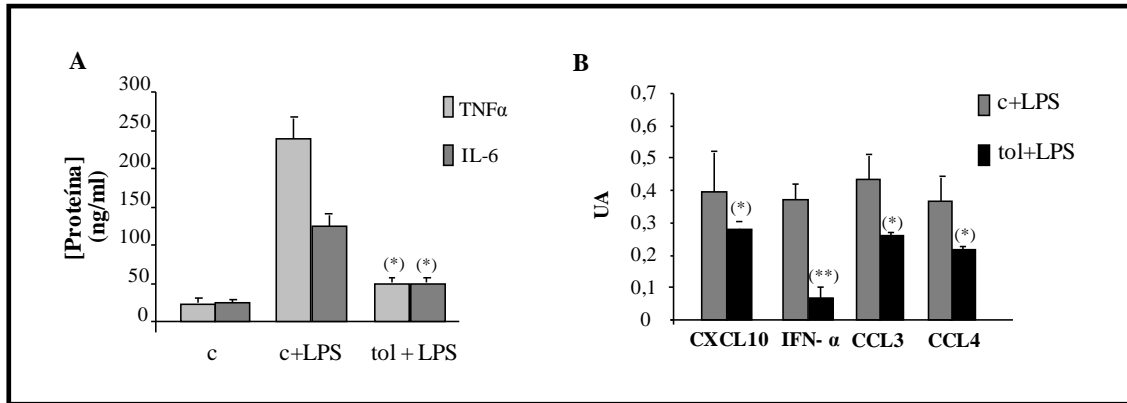
Para verificar que nuestro modelo funcionaba analizamos la expresión de un conjunto de citoquinas y quimioquinas en las condiciones anteriormente mencionadas y pudimos observar que la respuesta inflamatoria en los MØ tolerantes (tol+LPS) se encontraba atenuada respecto a los controles expuestos a LPS (c+LPS) (Figura R2 A-G).



**Figura R2.** Los análisis por Q-PCR verifican que el pre-tratamiento MØ con LPS induce tolerancia “in vitro”. **A, B, D-G.** Los MØ control (c+LPS, barras grises) y tolerantes (tol+LPS, barras negras) se estimularon con 10 ng/ml de LPS para los tiempos indicados. El ARN se aisló, se sintetizó ADNc, y se cuantificó por Q-PCR. La relación [gen]/[β-actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). \*p-valor <0.05 comparando MØ controles (c+LPS) frente a los tolerantes (tol+LPS). **C.** Los MØ fueron pre-tratados (+) o no (-) con 10 ng/ml de LPS y se estimularon con LPS 10 ng/ml durante 6 horas. La relación [gen]/[β-actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3), \*p-valor < 0.01 comparando no pre-tratados (controles) respecto a pre-tratados (tolerantes).

Observamos en la Figura R2 como genes pro-inflamatorios tales como TNF-α, IL-6, IL-12p40 e IL-23p19 son claramente sobre-expresados en MØ controles expuestos a LPS (c+LPS), sin embargo sus niveles se reducen significativamente en MØ tolerantes (tol+LPS). Las citoquinas IL-12 e IL-23 son marcadores clásicos de estados pro-inflamatorios en MØ humanos, y sus bajos niveles de expresión son característicos de una activación alternativa o M2 (83, 84). En nuestro modelo la expresión de estas dos citoquinas se encuentra atenuada hasta las 48 horas (Figura R2D-F). También verificamos en MØ tolerantes la caída de la expresión de un conjunto de quimioquinas

tales como CCL3, CCL4, CCL20 y CCL22 (Figura R2C). Además, observamos como los niveles de expresión de IL-10 son significativamente más altos en MØ tolerantes a tiempos tempranos (Figura R2G). Nuestros datos en conjunto confirman que los MØ tolerantes exhiben un perfil IL-12<sup>bajo</sup>, IL-23<sup>bajo</sup>, IL-10<sup>alto</sup> lo que define una activación M2 (83-85).



**Figura R3.** La expresión de proteína corrobora que el pre-tratamiento MØ con LPS induce tolerancia “*in vitro*”. **A.** Los MØ control (c+LPS) y tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 24 horas y las concentraciones de TNF- $\alpha$  (barras gris claro) e IL-6 (barras gris oscuro) se determinaron por ELISA. La concentración se representa en ng/ml (n=3). **B.** Los MØ control (c+LPS, barras grises) y tolerantes (tol+LPS, barras negras) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 24 horas. La concentración de citoquinas, en el sobrenadante de los cultivos, se determinó usando un *array* de anticuerpos comercial (n=3). UA. Indica unidades arbitrarias. \*p-valor<0.05 y \*\*p-valor<0.01 comparando los MØ tolerantes (tol+LPS) respecto al control estimulado con LPS (c+LPS).

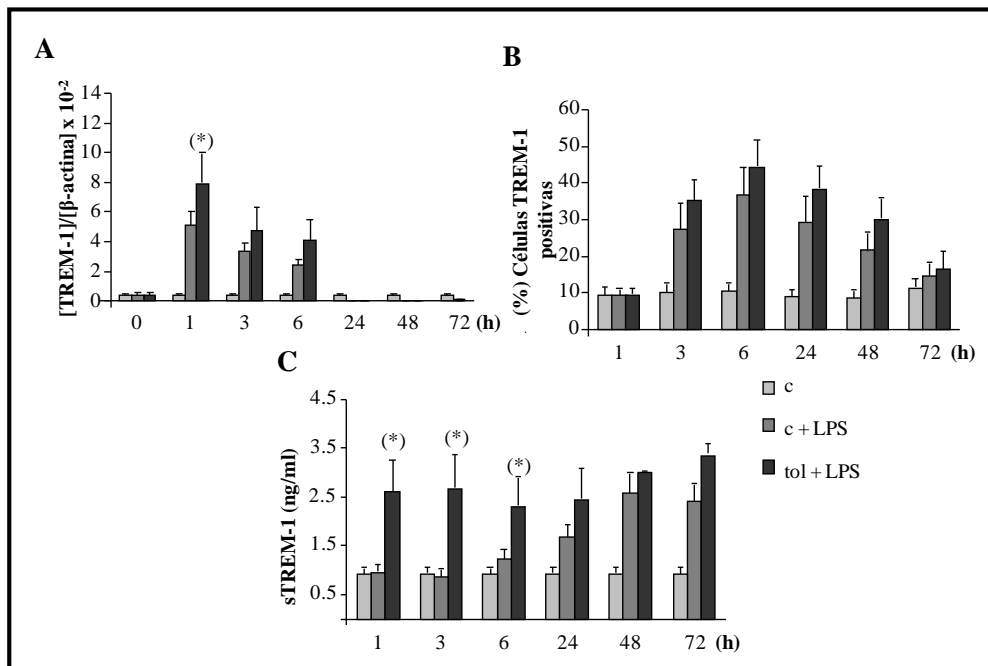
Además de los análisis por Q-PCR, estudiamos la traducción de un conjunto de genes. Identificamos distintos marcadores de TE que muestran una baja concentración en el sobrenadante del cultivo de MØ, los ya conocidos como son TNF- $\alpha$  e IL-6 (FiguraR3A) y unos identificados nuevamente tales como IFN- $\alpha$ , CCL3, CCL4 y CXCL10 (FiguraR3B).

Este conjunto de datos validan nuestro modelo de TE, y confirman que los MØ tolerantes presentan una actividad pro-inflamatoria disminuida con un marcado perfil M2 (83, 84).

## ***4.2 TREM-1 se sobre-expresa en monocitos tolerantes en sus dos variantes.***

Una vez establecido nuestro modelo de tolerancia nos dispusimos a estudiar los eventos asociados a la TE. Como comentamos anteriormente la sepsis presenta periodos TE. Esta enfermedad se caracteriza por tener una fase de “respuesta inmune hiporeactiva”, que en el caso de MØ se traduce en una pérdida de su capacidad para desarrollar una fuerte respuesta pro-inflamatoria, dando lugar a un fenotipo tolerante. Teniendo en cuenta diversos estudios que sugieren el importante valor pronóstico de sTREM-1 en sepsis (44, 48, 58), donde el progresivo aumento de sTREM-1 en plasma es un signo de una evolución desfavorable durante las fases de recuperación de la sepsis (58); y la acción dual de TREM-1 en sus dos variantes, como amplificador o freno de la respuesta inflamatoria (31, 41). Cabe especular que TREM-1 juegue un papel importante en la generación de la tolerancia. Por ello realizamos una serie de comprobaciones para estudiar la implicación de esta molécula en nuestro modelo de TE.

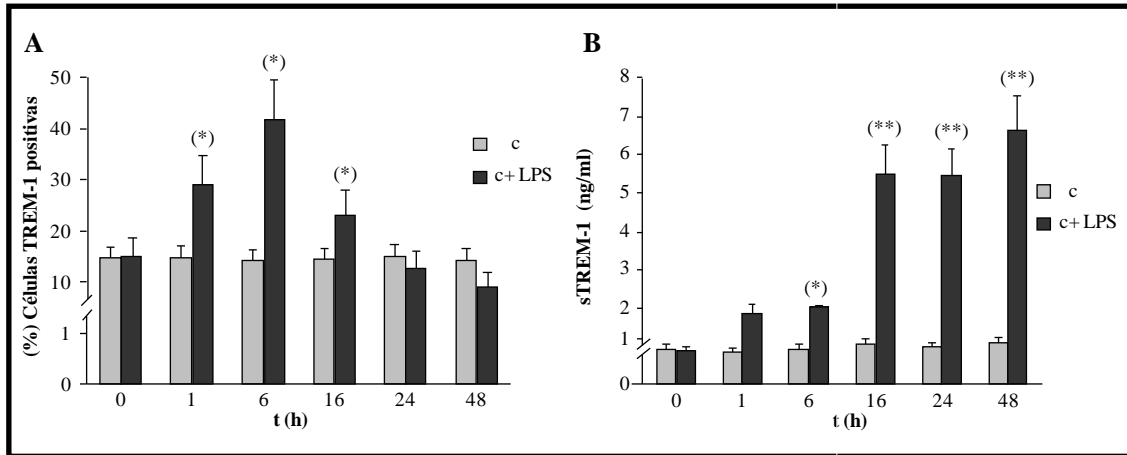
En nuestro modelo de estudio, observamos como la cinética de TREM-1 anclado a membrana es esencialmente la misma, tanto a nivel transcripcional como en la expresión de TREM-1 en la superficie celular en las condiciones “tol+LPS” y “c+LPS” (Figura R4A y B). A nivel transcripcional, las dos condiciones tienen un punto máximo de expresión una hora después de la exposición con la endotoxina (Figura R4A). Mientras que el receptor anclado a membrana tiene una expresión máxima a las 6 horas que cae a niveles basales desde las 24 a las 72 horas (Figura R4B). Estos datos coinciden con publicaciones previas donde se pone de manifiesto la sobre-expresión del receptor en presencia de LPS (37, 52). Sin embargo, lo que resulta llamativo es que por una parte, que en la condición c+LPS la producción de sTREM-1 a las 24 horas coincide con la caída de TREM-1 en la superficie celular y por otra, en la condición tol+LPS la concentración de sTREM-1 después de una hora de estímulo es equivalente a la producida a las 48 horas en la condición c+LPS (Figura R4C). Estos datos nos llevaron a pensar en la existencia de una posible proteólisis del receptor que generase la forma soluble, algo que posteriormente verificaremos.



**Figura R4.** *TREM-1 se sobre-expresa tanto en condiciones tol+LPS como en c+LPS, y se acumula en mayores concentraciones en condiciones tolerantes.* Los MØ controles (c+LPS) y tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10ng/ml LPS de 1 a 72 horas. **A.** Expresión de TREM-1 a nivel de ARNm evaluado por Q-PCR, la relación [TREM-1]/[β-actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). **B.** Las células se marcaron con anti-TREM-1-PE seguido de un análisis por citometría de flujo (n=3). **C.** La concentración de sTREM-1 se determinó en el sobrenadante de cada cultivo por ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml (n=3). \*p-valor<0.05 comparando los MØ tolerantes (tol+LPS) respecto a los controles estimulados con LPS (c+LPS).

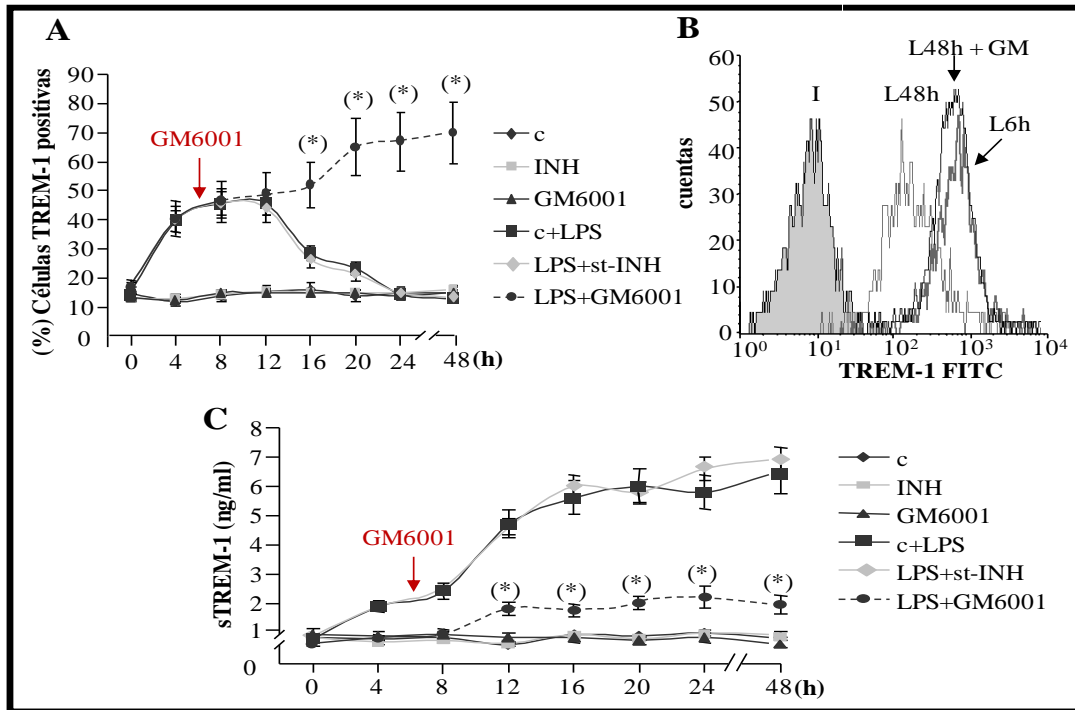
#### **4.3. Un inhibidor estándar de metaloproteasa, pero no un inhibidor genérico de proteasas, previene la generación de sTREM-1.**

Los datos anteriores muestran que en los MØ controles expuestos a LPS (c+LPS), la producción de sTREM-1 coincide con la disminución de TREM-1 en la superficie celular (Figura R4B-C). Hipotetizando que existe una proteólisis del receptor que genera la forma soluble, verificamos nuestra hipótesis en un modelo sencillo de endotoxemia (c+LPS). De este modo, analizamos la expresión de TREM-1 por citometría de flujo y observamos que la presencia de este receptor aumenta con el tiempo. El máximo de expresión se encuentra a las 6 horas después del estímulo con LPS y desciende desde 16 horas hasta las 24 horas (Figura R5A). Sin embargo la forma soluble está significativamente aumentada en el sobrenadante de los MØ tratados con LPS después de 16 horas con dicho estímulo y sus niveles se mantienen, al menos, hasta las 48 h (Figura R5B).



**Figura R5.** La producción de sTREM-1 en MØ humanos coincide con la disminución de TREM-1 en superficie. Los MØ controles se estimularon (c+LPS) o no (c) con 10 ng/ml de LPS. **A.** Las células se marcaron con anti-TREM-1 y se analizaron por citometría de flujo (n=3). \*p-valor<0.05 comparando MØ estimulados con LPS (c+LPS) con respecto al control (c). **B.** La concentración de sTREM-1 de los sobrenadantes de los cultivos se analizaron por un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml (n=3). \*p-valor<0.05 \*\* p-valor<0.01 comparando los MØ estimulados con LPS (c+LPS) con respecto al control sin estimular (c).

Siguiendo con la verificación de la hipótesis de la generación de sTREM-1, estimulamos los MØ con LPS, pero al contrario que en el experimento previo (Figura R5), añadimos 6 horas después del estímulo con LPS una mezcla de inhibidores de proteasas estándar (st-INH) o un inhibidor general de metaloproteasas (MMP), GM6001. En presencia de st-INH no se observaron cambios en la expresión de TREM-1 en la membrana celular; esta mezcla bloquea un gran rango de serín y cisteín proteasas pero no metaloproteasas (Figura R5 A). Sin embargo, en presencia de GM6001, la expresión de TREM-1 en la superficie celular se mantenía al menos hasta las 48h (Figura R6 A y B). Junto con este resultado, observamos un notable descenso de la concentración de sTREM-1 en los sobrenadantes de los cultivos de los MØ estimulados con LPS en presencia de GM6001, pero no en los tratados con st-INH (Figura R6C).

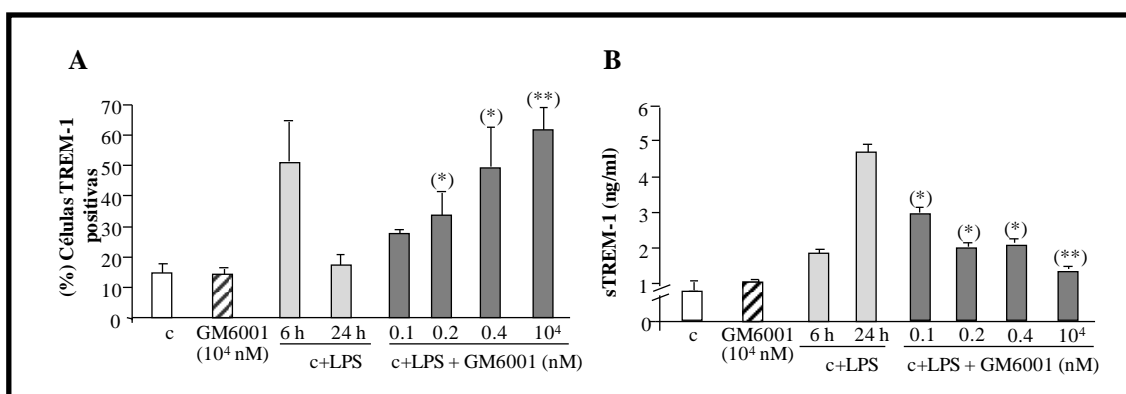


**Figura R6.** Un inhibidor general de metaloproteasas de matriz inhibe el corte proteolítico de TREM-1 en superficie y reduce la producción de sTREM-1 en cultivo de MØ humanos. Los MØ humanos se cultivaron en presencia (c+LPS) o ausencia (c) de 10 ng/ml de LPS en los tiempos indicados. En algunos cultivos un inhibidor estándar (INH) o un inhibidor de MMP (GM6001) (↓) se añadieron después 6h con LPS. **A.** Expresión de TREM-1 en la superficie celular, valorada por citometría de flujo (n=3). **B.** Histograma representativo de la expresión de TREM-1 obtenido del análisis de citometría de flujo (I: isotipo, L6h, L48h: MØ humanos estimulados con 10 ng/ml de LPS 6 y 48h respectivamente, L48h+GM6001: MØ humanos estimulados con 10ng/ml en presencia de 10 µM de GM6001). **C.** La concentración de sTREM-1 de los sobrenadantes de los cultivos se analizaron por un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml (n=3). \* p-valor <0.05 comparando los MØ estimulados con LPS en presencia de GM6001 (LPS+GM6001) respecto a los estimulados con LPS (c+LPS).

#### 4.4. La inhibición del corte de TREM-1 por GM6001 es depende de la dosis de inhibidor.

GM6001 inhibe potencialmente MMPs 1, 2, 3, 8 y 9 de una manera dependiente de la concentración con valores de constante de inhibición ( $K_i$ ) 0.4, 0.5, 27, 0.1 y 0.2 nM, respectivamente. Para verificar que los efectos observados eran debidos a la inhibición de una MMP en particular o, en su defecto, disminuir el rango de las posibles MMPs responsables de la liberación de TREM-1, llevamos a cabo experimentos usando diferentes dosis de GM6001. Los MØ humanos cultivados en presencia de LPS durante

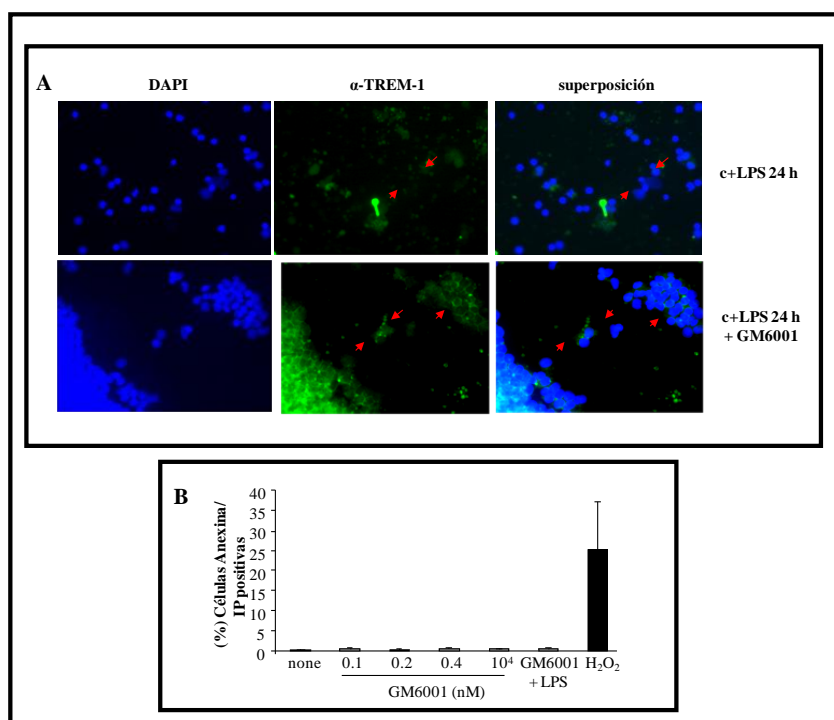
24 horas presentaban niveles basales de TREM-1 en superficie (Figura R7A). Sin embargo, la adición de GM6001 a la concentración comúnmente usada ( $10\mu\text{M}$ ) no solo restauraba la expresión TREM-1, sino que era ligeramente mayor que la alcanzada con un estímulo de LPS durante 6h en ausencia de inhibidor de metaloproteasas de matriz. Además, la disminución de TREM-1 en superficie se daba a concentraciones mucho más bajas de GM6001 (desde 0.1 a 0.4 nM). Igualmente, los niveles de sTREM-1 descendían claramente en el sobrenadante del cultivo de MØ en una manera dependiente de la concentración del inhibidor (Figura R7B).



**Figure R7.** GM6001 inhibe el corte proteolítico de TREM-1 anclado a la superficie celular de una manera dependiente de la dosis. **A.** Los MØ humanos se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados (□), o se trataron con LPS 10 ng/ml y con diferentes dosis de GM6001 6h después de estimularse con LPS y se mantuvieron durante 24h (■). Como controles se incluyen MØ humanos no tratados (□) y MØ tratados con GM6001  $10^4$  nM (▣). La expresión de TREM-1 en la superficie celular se analizó por citometría de flujo (n= 3). **B.** La concentración de sTREM-1 en los sobrenadantes de los mismos cultivos se determinó usando un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml (n=3). \* p-valor<0.05, \*\*p-valor<0.01 comparando los MØ estimulados con LPS en presencia de GM6001 (c+LPS+GM6001) con respecto al tratamiento con LPS (c+LPS).

Con un análisis por inmunofluorescencia se obtuvieron resultados complementarios como se muestra en la Figura R8A. En ellos, se observa como la expresión de TREM-1 se mantiene en superficie celular de MØ tratados con LPS en presencia de GM6001 durante 24h, pero no en ausencia de inhibidor (Figura R8A). Además estos experimentos demuestran claramente la localización de membrana del TREM-1. Por último verificamos que los efectos observados no se debían a la toxicidad de GM6001. Para ello se realizó un ensayo de apoptosis a los MØ tratados con diferentes dosis de GM6001/LPS usando un kit de Anexina<sup>FITC/PI</sup>. Tal y como se

muestra en la Figura R8B, no existe una apoptosis significativa en presencia de estos estímulos.

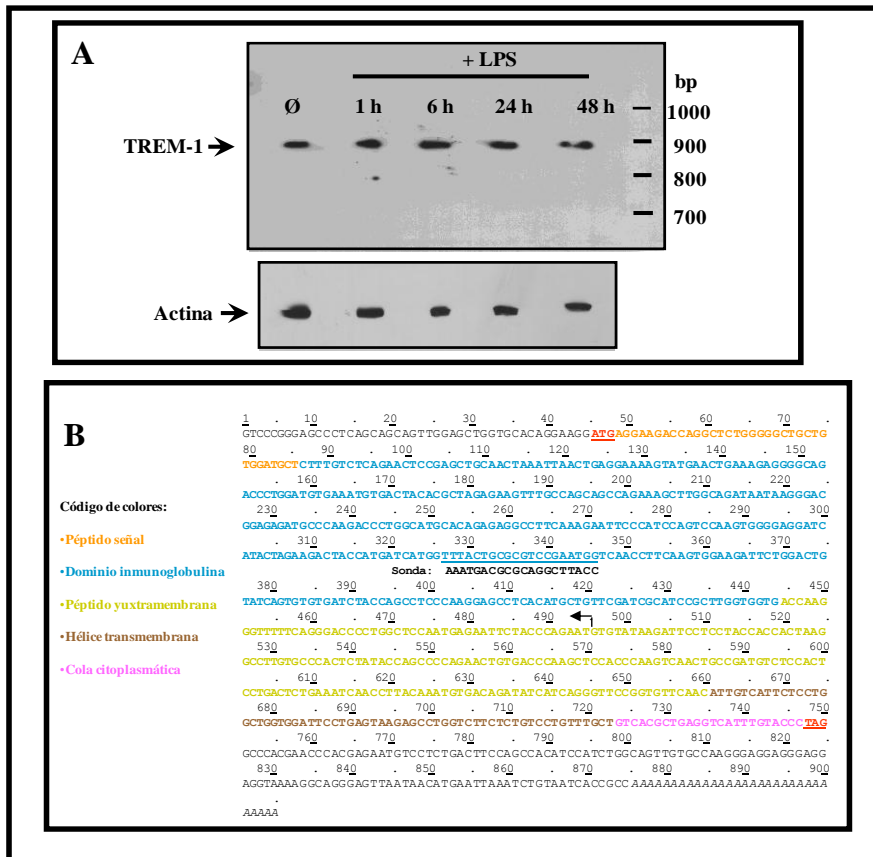


**Figura R8.** *GM6001* inhibe el corte proteolítico de *TREM-1* de membrana celular sin afectar a la viabilidad celular. **A.** Los MØ humanos se trataron con LPS 10 ng/ml durante 24h. En algunos cultivos se añadió *GM6001* 6h después del estímulo de LPS (panel inferior). Las células se tiñeron con anticuerpo anti-*TREM-1* (verde) y los núcleos se localizaron por un marcaje estándar con DAPI (azul) **B.** MØ humanos tratados con *GM6001* durante 24h (□) se tiñeron con yoduro de propidio (IP) y anexina V y se analizaron por citometría de flujo. Se utilizó como control positivo 30µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (■). Las células doblemente positivas se consideran apoptóticas.

#### 4.5. El “*splicing*” alternativo de *TREM-1* no es detectado en monocitos humanos estimulados con LPS.

Para excluir la posibilidad de que la generación de s*TREM-1* se deba a un *splicing* alternativo del ARN mensajero (ARNm) de *TREM-1*, llevamos a cabo un análisis por *Southern blot* de ADNc de *TREM-1*. Para ello utilizamos una sonda marcada con biotina que podría hibridar con la forma completa de *TREM-1* y su posible *splicing* (Figura R9B). Una única banda de ≈900 bases se detectó en los MØ humanos tratados con LPS (Figura R9A). Esta banda corresponde al tamaño completo de ARNm de *TREM-1* según publicaciones previas (31, 50).



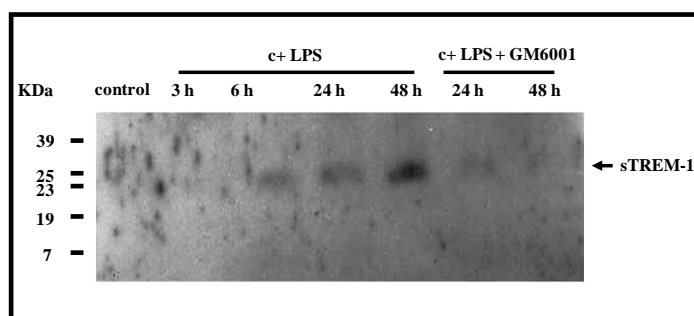


**Figura R9.** Por Southern blot se detectó un solo transcrito de ARNm correspondiente al tamaño completo del receptor *TREM-1*. **A.** Los MØ humanos se estimularon con LPS 10 ng/ml durante los tiempos indicados. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS y su ARN se aisló. El ARN purificado se utilizó para obtener ADNc por transcripción inversa usando oligonucleótidos poli (dT). El ADNc se resolvió en un gel de agarosa y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad. La membrana se hibridó con dos sondas conjugadas con biotina (*TREM-1* panel superior y  $\beta$ -actina panel inferior), se bloquearon, y después se incubaron con estraptavidina-HRP. Posteriormente se llevó a cabo el revelado por quimioluminiscencia (n=3). **B.** Secuencia del ADNc de *TREM-1*. Las regiones que codifican diferentes elementos estructurales están indicadas por colores tal como se indica en la leyenda. La cola de poli(A) está en cursiva en extremo 3' terminal. El posible *splice* alternativo de *TREM-1* se indica con una flecha. Se muestra la zona de hibridación de la sonda utilizada para llevar a cabo el Southern blot

#### 4.6. La masa molecular experimental de *sTREM-1* sugiere el corte proteolítico de *TREM-1* en un lugar próximo a la membrana.

El dominio extracelular de *TREM-1* posee una masa molecular teórica ( $M_m$ ) de 20,8 KDa. Nosotros no hemos sido capaces de reunir suficiente *sTREM-1* para determinar su masa experimental usando espectrometría de masas. Sin embargo, pudimos apreciar una diferencia entre el valor estimado teóricamente y el que se aprecia por el análisis por *Western blot* tras la separación en geles SDS-poliacrilamida

( $\approx 27$  kDa) (Figura R10). Esta diferencia de masa molecular podría ser explicada por la glicosilación en las tres asparaginas en la unión yuxtamembranal cuya secuencia consenso es Asn-XXX-Thr lo que analizaremos más en profundidad posteriormente. Para verificar esta posibilidad, estudiamos la secuencia correspondiente a la región extracelular de TREM-1 con el servidor GlycoMod ([www.expasy.org/tools/glycomod/](http://www.expasy.org/tools/glycomod/)), de los análisis se desprende que TREM-1 puede estar glicosilado por múltiples combinaciones de glicanos complejos o híbridos que dan como resultado una masa experimental de 27 KDa.

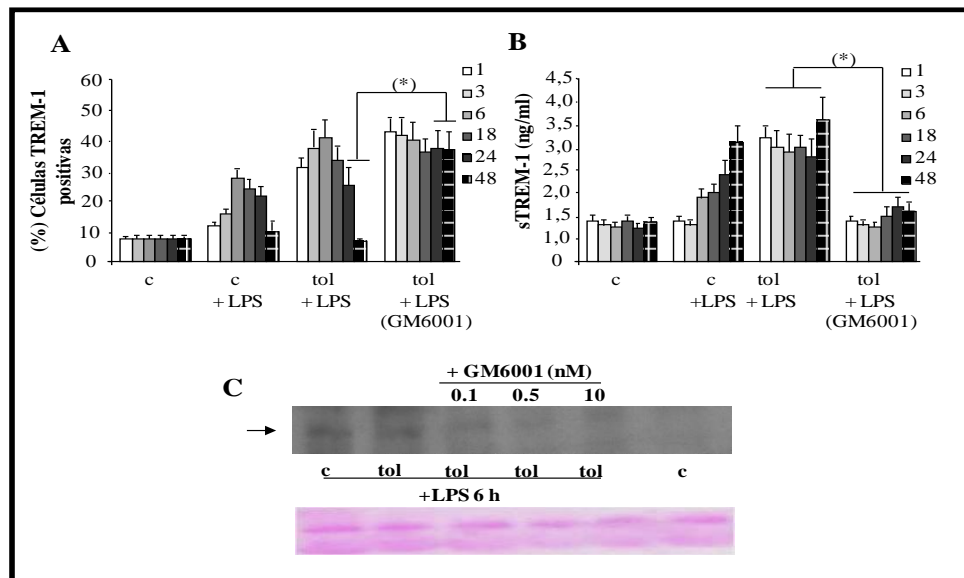


**Figura R10.** *Detección de sTREM-1 en el sobrenadante de cultivo de MØ humanos por Western blot.* Los MØ humanos se trataron con 10 ng/ml de LPS durante los tiempos indicados. En algunos cultivos, GM6001 (10 $\mu$ M) se añadió 6h después del estímulo con LPS (+LPS+GM6001). El *Western blot* se realizó usando un anticuerpo anti-TREM-1 comercial que reconoce el dominio extracelular de TREM-1. Se detectó una banda de  $\approx 27$ kDa después del estímulo con LPS (marcado con una flecha). Se muestra un experimento típico, (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

Así, basándonos en estudios anteriores de espectrometría de masas de varias regiones transmembrana y proteínas solubles humanas observamos que, de manera general, estas proteínas presentan una gran cantidad de modificaciones por derivados glicosilados. La masa experimental de estas proteínas puede oscilar desde 1,8-3,2 KDa, lo que explica las diferencias entre la masa molecular teórica y la observada experimentalmente. Por lo tanto, aunque los análisis de N-glicosilación en TREM-1 no se han llevado a cabo, existen evidencias importantes de puedan darse en su región extracelular N-glicosilaciones complejas. La generación sTREM-1 se da probablemente por el corte proteolítico dentro de la membrana proximal Val<sup>195</sup>-Asn<sup>205</sup> que podrían mantener estos motivos glicosilados, esto explicaría como la masa molecular teórica es inferior a la observada por *Western blot*.

**4.7. GM6001 mantiene la expresión de TREM-1 en la membrana celular e inhibe la generación de sTREM-1 en células tolerantes.**

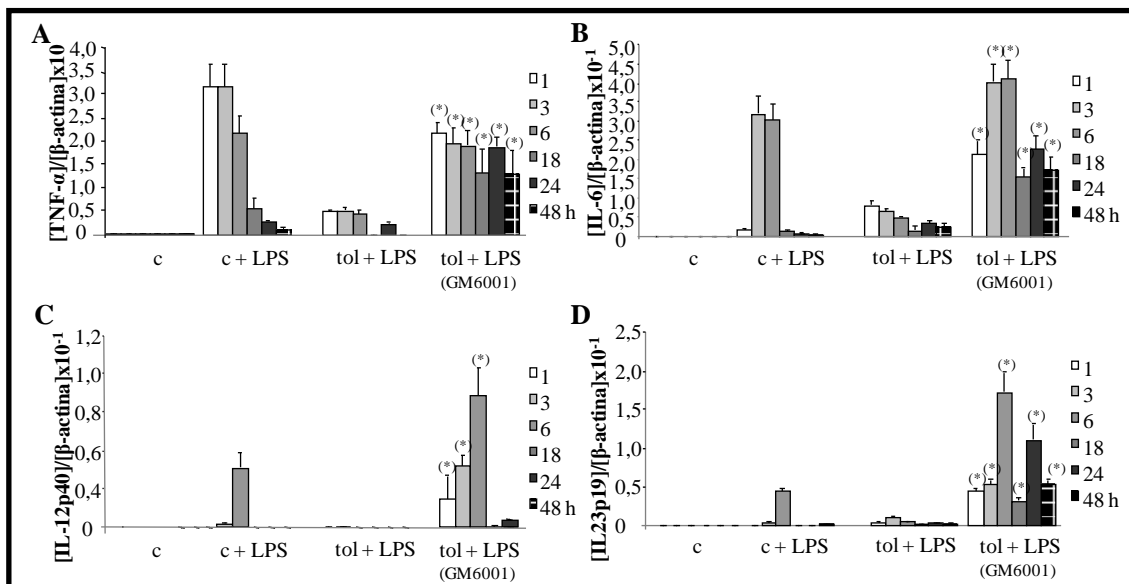
Una vez que demostramos que sTREM-1 se generaba por el corte proteolítico del receptor de membrana. Quisimos comprobar si este efecto sería reproducible en nuestro modelo de tolerancia. Para ello los MØ tolerantes (tol) se estimularon con LPS en presencia, a lo largo de todo el ensayo, o ausencia del inhibidor de metaloproteasas. Los MØ tolerantes expuestos a LPS en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001) mantenían la expresión de TREM-1 en la superficie celular comparados con aquellos MØ tolerantes que se estimularon con LPS en ausencia de GM6001 (tol+LPS) (Figura R11A). Además no aparecían concentraciones apreciables de sTREM-1 en el sobrenadantes de los mismos cultivos (Figura R11B). También comprobamos como los niveles de sTREM-1 descendían claramente en el sobrenadante del cultivo de MØ de una manera dependiente de la concentración (Figura R11C).



**Figura R11.** GM6001 estabiliza la expresión de TREM-1 en la membrana celular e inhibe la generación de sTREM-1 en células tolerantes. Los MØ humanos controles (c+LPS) o tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml, en presencia o ausencia de GM6001, durante los tiempos indicados. **A.** Las células se marcaron con anticuerpo anti-TREM-1-PE, y se analizaron por citometría de flujo (n=3). **B.** La concentración de sTREM-1 de los sobrenadantes de los cultivos se analizaron por un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml (n=3). \*p-valor<0.05, comparando los MØ tolerantes (tol+LPS) con respecto a la misma condición en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001). **C.** En los sobrenadantes de los cultivo se analizó sTREM-1 usando anticuerpo anti-TREM-1. Se muestra una tinción típica de membrana con Rojo Ponceau, que se utilizó como control de carga (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

#### 4.8. La presencia mantenida de TREM-1 en la superficie celular modula el fenotipo tolerante.

Como ya mencionamos anteriormente, TREM-1 puede estar potencialmente implicado en el fenómeno de la TE. Para comprobar este hecho, llevamos a cabo un conjunto de experimentos en los cuales inhibimos el corte proteolítico de TREM-1 con el fin de observar si el fenotipo clásico de TE se veía afectado. Para ello los MØ tolerantes fueron expuestos a LPS de 1 a 48 horas en presencia o ausencia de GM6001. De manera sorprendente, el fenotipo tolerante era revertido por la inhibición de las MMP, como revelan las cuantificaciones de ARNm de la mayoría de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 e IL-12p19; Figura R12 A-D).

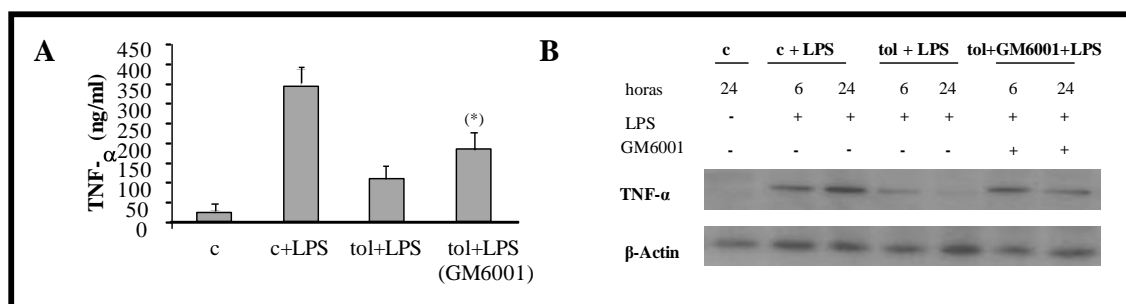


**Figura R12.** GM6001 restaura el fenotipo inflamatorio en MØ tolerantes. Los MØ humanos controles (c+LPS) o tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS, en presencia o ausencia de GM6001, se aisló el ARNm y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-12p40 (C) e IL-23p19 (D), se cuantificaron por Q-PCR usando cebadores específicos. La relación [gen]/[β-actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). \*p-valor<0.05 comparando los MØ tolerantes en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001) respecto a MØ tolerantes (tol+LPS). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

TNF- $\alpha$  presentaba su máximo de expresión a una hora y se mantenía hasta 48 horas después, algo que no ocurre con los MØ tolerantes (c+LPS) (Figura R11A). Por su parte, IL-6, IL-12p40 e IL-12p19 mostraron una expresión máxima a las 6 horas y la expresión se mantenía en general durante más tiempo que en los MØ controles

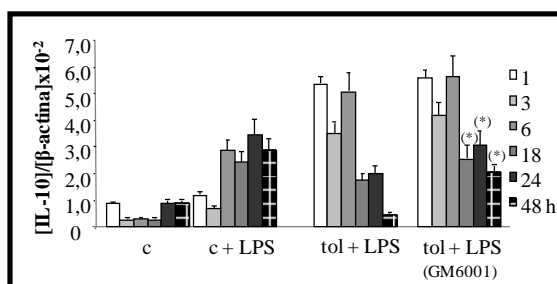
expuestos a LPS (c+LPS). Esto sugiere que no sólo se recupera el fenotipo tolerante sino que la inflamación perdura más en el tiempo.

Igualmente y de acuerdo con los datos en ARNm las concentraciones de TNF- $\alpha$  secretadas eran similares en M $\emptyset$  controles expuestos a LPS (c+LPS) que en los tolerantes tratados con GM6001 (Figura R13A). Este efecto también se observa en concentración de TNF- $\alpha$  intracelular (FiguraR13B).



**Figura R13.** GM6001 restaura la expresión de TNF- $\alpha$  en M $\emptyset$  tolerantes. **A.** Los M $\emptyset$  controles (c+LPS) o tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 24 horas, en presencia o ausencia de GM6001. Las concentraciones de TNF- $\alpha$  se determinaron por ELISA. La concentración se representa en ng/ml (n=3). \*p-valor<0.05 comparando los M $\emptyset$  tolerantes en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001) respecto a los M $\emptyset$  tolerantes (tol+LPS). **B.** Los M $\emptyset$  humanos controles (c+LPS) y tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 6 o 24 horas en presencia o ausencia de GM6001. La proteína total se extrajo y se analizó por Western blot con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  y anti- $\beta$ -actina. Se muestra un experimento (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

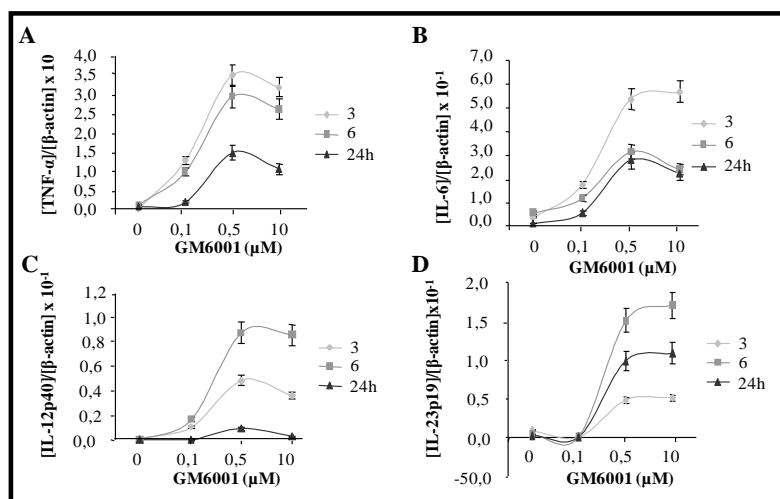
Sin embargo, observamos niveles altos de IL-10, que eran iguales en M $\emptyset$  tolerantes en presencia o ausencia de GM6001 a tiempos cortos y eran mayores en M $\emptyset$  tolerantes en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001) sobre-expresados a tiempos largos (24 y 48 horas) (Figura R14). Esto puede indicarnos que IL-10 no es crucial para la generación del estado de tolerancia, tal y como se ha identificado en otros trabajos (81, 105).



**Figura R14.** *GM6001 no inhibe la generación de IL-10 en MØ tolerantes.* MØ humanos controles (c+LPS) y tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS, en presencia o ausencia de GM6001. Después las células se cosecharon, se aisló el ARNm y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de IL-10, se cuantificaron por Q-PCR usando cebadores específicos. La relación [IL-10]/[β-actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). \*p-valor<0.05 comparando los MØ tolerantes en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001) con respecto a los MØ tolerantes (tol+LPS). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

#### ***4.9. La presencia mantenida de TREM-1 en la superficie celular modula el fenotipo tolerante de manera dependiente de la dosis de GM6001.***

GM6001 inhibe potencialmente las MMPs 1, 2, 3, 8 y 9 de una manera dependiente de la concentración con valores de constante de inhibición (K<sub>i</sub>) 0.4, 0.5, 27, 0.1 y 0.2 nM, respectivamente. Para verificar que la modulación del fenotipo tolerante se debía a la inhibición de una o varias MMPs y por tanto a los niveles de expresión de TREM-1 en la superficie celular, llevamos a cabo experimentos usando diferentes dosis de GM6001. Para ello los MØ tolerantes fueron expuestos a LPS durante 3, 6 y 24 horas en presencia de cantidades crecientes de GM6001. A mayor concentración de inhibidor mayor expresión de TREM-1 en la superficie celular (Figura R7) lo que correlaciona con una elevada expresión de citoquinas inflamatorias tales como TNF-α, IL-6, IL-12p40 e IL-12p19 (Figura R15 A-D).



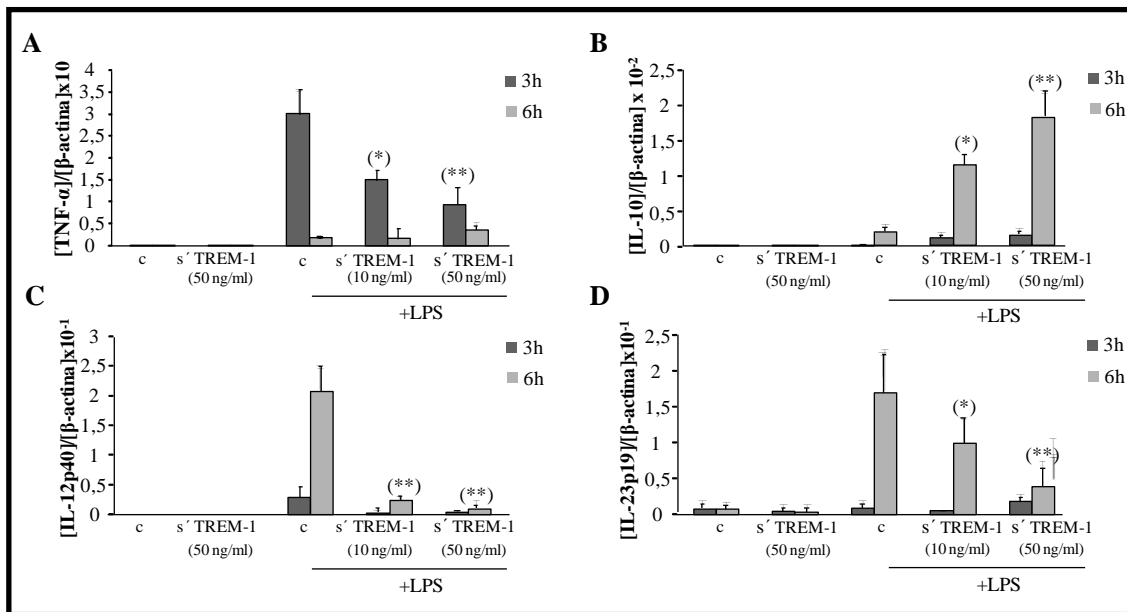
**Figura R15.** El fenotipo tolerante se modula dependiendo de la dosis de GM6001. Los MØ humanos tolerantes se estimularon con 10 ng/ml de LPS, en presencia de diferentes dosis de GM6001 (tol+LPS+GM6001). Después las células se cosecharon, se aisló el ARNm y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-12p40 (C) e IL-23p19 (D), se cuantificaron por Q-PCR usando cebadores específicos. La relación [gen]/[ $\beta$ -actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

#### ***4.10. La proteína TREM-1 soluble y completa tienen un efecto anti-inflamatorio e induce parcialmente la tolerancia a endotoxina en monocitos humanos.***

Los resultados expuestos anteriormente ponen de manifiesto que TREM-1 juega un papel importante en el control de la TE en MØ humanos, de tal manera que cuando inhibimos el corte proteolítico de TREM-1 anclado a membrana se ve afectado el estado refractario (Figura R12 y Figura R13). Estos datos evidencian que efectivamente el mantenimiento de TREM-1 en membrana afecta a la tolerancia, pero debíamos confirmar si además de este hecho lo que realmente afectaba al fenotipo TE era la falta en el medio de sTREM-1 que no se genera en presencia de GM6001; y por tanto si sTREM-1 *per se* estaba involucrado en la generación del fenotipo TE.

Consecuentemente, decimos estudiar si la forma soluble (sTREM-1) se requería para bloquear la activación pro-inflamatoria que se da en TE. Para ello estimulamos los MØ con LPS en presencia o ausencia la proteína completa de TREM-1 de manera soluble (sTREM-1), homólogo a sTREM-1 fisiológico. De acuerdo con publicaciones previas sTREM-1 ejerce una función anti-inflamatoria en MØ humanos estimulados con LPS (41, 49). En nuestro modelo podemos observar como sTREM-1 produce una

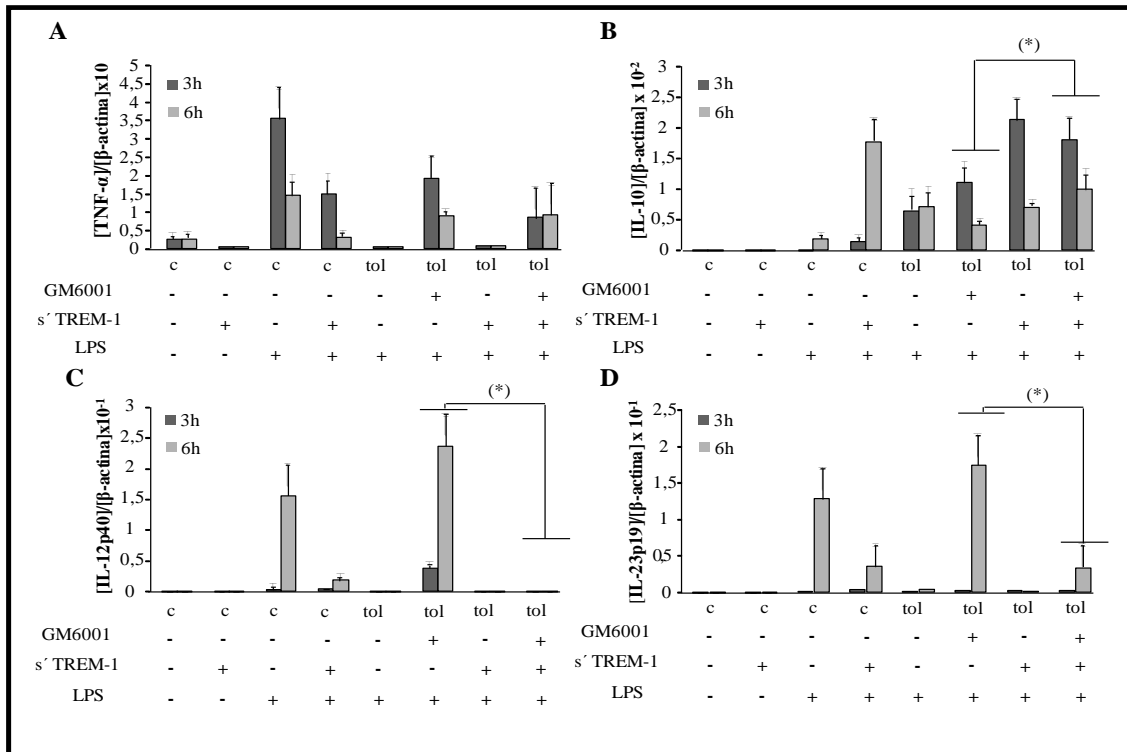
caída en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e IL-23p19 (Figura R16 A, C-D) y aumenta los niveles de IL-10 (Figura R16B) de una manera dependiente de la dosis.



**Figura R16.** La presencia de TREM-1 soluble (sTREM-1) disminuye la inflamación producida por LPS. Los M $\phi$  humanos se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 3 horas (barras gris oscuro) o 6 horas (barras gris claro) en presencia o ausencia de diferentes dosis de sTREM-1. Después se asiló el ARNm celular y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-10, (C) IL-12p40 y (D), IL-23p19 se cuantificaron por Q-PCR usando cebadores específicos. La relación [gen]/[ $\beta$ -actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). \*p-valor<0.05 \*\*p-valor<0.01 comparando los M $\phi$  estimulados con LPS en presencia de sTREM-1 (LPS+sTREM-1) respecto a la misma condición en ausencia de sTREM-1 (c+LPS). GM6001 y sTREM-1 se mantuvieron durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usaron.

Una vez confirmado que sTREM-1 exhibía una actividad anti-inflamatoria, quisimos comprobar si su presencia estaba involucrada en la generación del fenotipo tolerante. Para ello estimulamos los M $\phi$  humanos en presencia o ausencia de GM6001 y en presencia o ausencia de sTREM-1. De tal manera que mantendríamos TREM-1 en la superficie celular y además tendríamos en el medio sTREM-1, este modelo experimental nos permite comprobar si la forma soluble se encuentra involucrada en la generación del fenotipo tolerante.

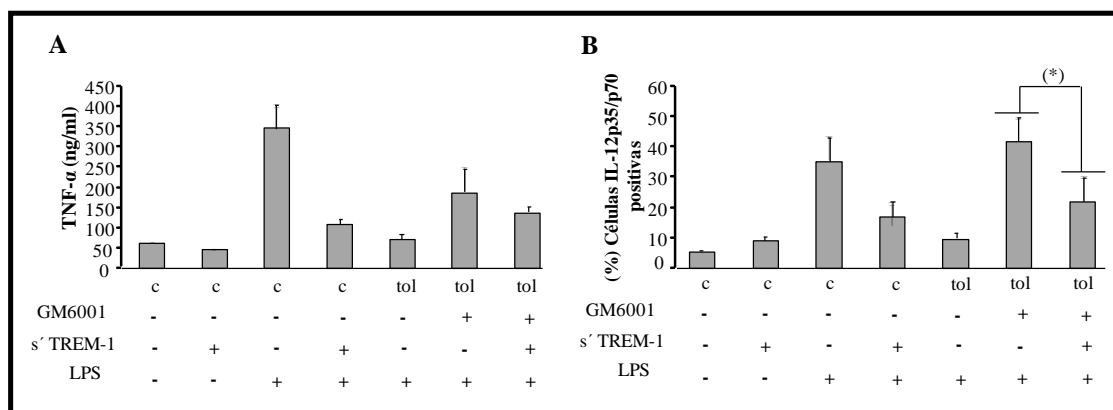




**Figura R17.** s<sup>+</sup>TREM-1 induce parcialmente un fenotipo tolerante en MØ humanos. Los MØ humanos se controles (c) y tolerantes (tol) se estimularon con LPS 10ng/ ml durante 3 horas (barras negras) o 6 horas (barras grises) en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 y/o s<sup>+</sup>TREM-1. Después se asiló el ARNm celular y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-10, (C) IL-12p40 y (D), IL-23p19 se cuantificaron por Q-PCR usando cebadores específicos. La relación [gen]/[ $\beta$ -actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). \*p-valor<0.05 \*\*p-valor<0.01 comparando la condición LPS+GM6001+s<sup>+</sup>TREM-1 respecto a la condición LPS+GM6001. GM6001 y s<sup>+</sup>TREM-1 se mantuvieron durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usaron.

En la Figura R17 podemos observar como la presencia de s<sup>+</sup>TREM-1 en los MØ con una expresión mantenida de TREM-1 en la superficie celular experimentan una caída en tolerancia equiparable a la que se produce en ausencia de GM6001, tanto a nivel de IL-12p40 como a IL-23p19 (Figura R17 B y D), sin embargo aunque TNF- $\alpha$  sufre un descenso en su expresión que no es estadísticamente significativo (Figura R17A), y no alcanza niveles equiparables a los MØ tolerantes en ausencia de GM6001 (tol+LPS). Por otro lado la expresión de IL-10 se encuentra incrementada en presencia de GM6001 y s<sup>+</sup>TREM-1 (Figura R17B). Así cuando los MØ se encuentran en presencia de s<sup>+</sup>TREM-1 se recuperan un perfil M2 caracterizado por IL-12<sup>bajo</sup>, IL-23<sup>bajo</sup>, IL-10<sup>alto</sup>. Esto sugiere que s<sup>+</sup>TREM-1 está vinculado a la regulación de la expresión de estas citoquinas. Por tanto, la reversión del fenotipo tolerante que se observa en MØ

humanos debida a la presencia de GM6001 es consecuencia, en parte, a la no generación de sTREM-1.



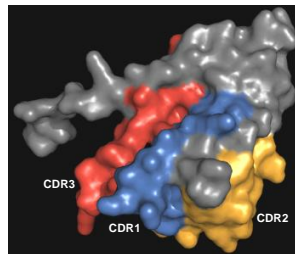
**Figura R18.** *sTREM-1* restaura el fenotipo tolerante en MØ tolerantes a nivel de IL-12. **A.** Los MØ control (c) y tolerantes (tol) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 24 horas en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 y/o *sTREM-1*. Las concentraciones de TNF- $\alpha$  se determinaron por ELISA. La concentración se representa en ng/ml (n=3). **B.** Los MØ se estimularon con LPS 10 ng/ml durante 1 hora en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 y/o *sTREM-1* después de este periodo de tiempo se añadieron al medio de cultivo de todas las condiciones experimentales brefeldina A 1,4  $\mu$ g/ml, y se mantuvieron en cultivo durante 6 horas. Tras este tiempo, las células se fijaron, permeabilizaron y marcaron con CD14+-FITC e IL-12p35/p70-APC y se adquirieron por el citómetro de flujo (n=3). \*p-valor<0.05 comparando la condición LPS+GM6001+sTREM-1 respecto a la condición LPS+GM6001. GM6001 y *sTREM-1* se mantuvieron durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usaron.

Igualmente y de acuerdo con los datos en ARNm las concentraciones de TNF- $\alpha$  secretadas disminuían en los MØ tolerantes en presencia de GM6001 y *sTREM-1* pero las diferencias no eran estadísticamente significativas (Figura R18A). Por el contrario, la expresión de IL-12p35/p70 disminuía en MØ tolerantes en presencia de GM6001 y *sTREM-1* (Figura R18B).

Con los datos mostrados hasta el momento podemos afirmar que *sTREM-1* juega un papel importante en la generación del fenómeno de tolerancia y que la reversión de este fenotipo, debido a GM6001, se debe no sólo al mantenimiento del receptor en membrana que amplifica la respuesta inflamatoria dada, sino a la falta de generación de la forma soluble que ejerce un potente efecto anti-inflamatorio en MØ humanos.

#### ***4.11. Las regiones determinantes de complementariedad ejercen una acción similar anti-inflamatoria a sTREM-1.***

En diferentes publicaciones previas se ha observado una clara acción anti-inflamatoria sTREM-1, esta función se ha testado con un péptido generado sintéticamente denominado LP17 (41, 49, 106). Por ello, nosotros quisimos comprobar cuales eran los dominios funcionalmente activos de TREM-1 y si la función que ejercían estos dominios era equiparable a la de sTREM-1. Para ello, basándonos en publicaciones previas de otros autores y en los análisis de la estructura en 3D (Figura R19), diseñamos tres péptidos derivados de la estructura de TREM-1 que incluían los epítopos topológicamente equivalentes a los CDRs de Ig del dominio extracelular de TREM-1.

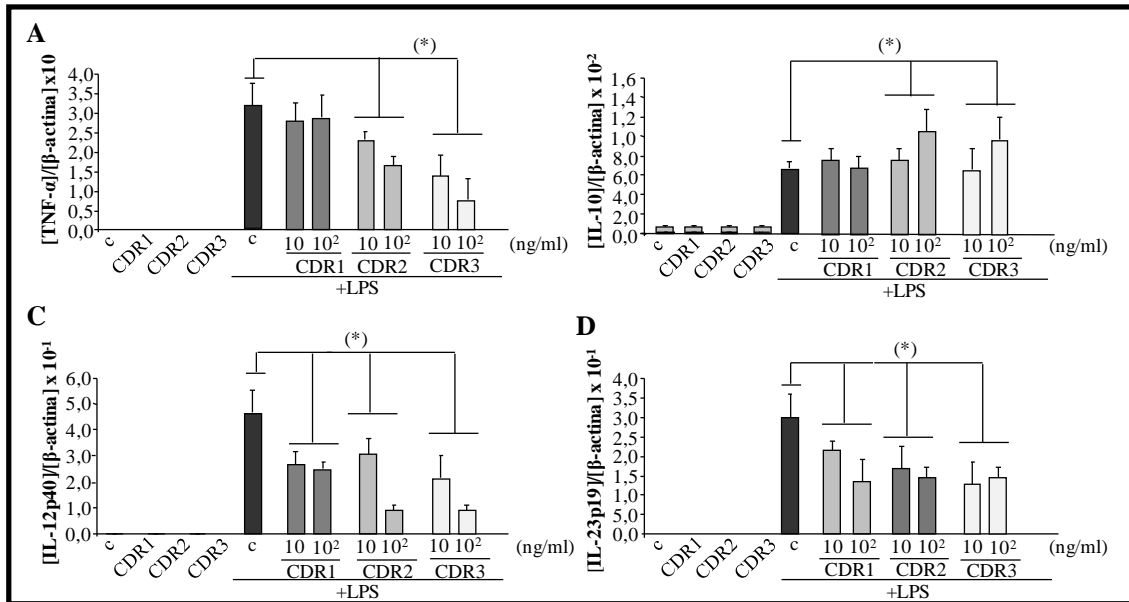


**Figura R19.** Representación en 3D de TREM-1 Ig y la localización de los posibles lugares de unión proteína-proteína. La estructura de la Ig de TREM-1 humana está representada como una superficie gris y los CDRs están codificados por colores (azul, amarillo y rojo, respectivamente).

Estos péptidos fueron diseñados para conservar la estructura terciaria de estos *loops* en solución (Material y métodos Figura M1). De acuerdo con publicaciones previas (41, 49), estos péptidos CDR1, CDR2 y CDR3, en general, mostraban una actividad anti-inflamatoria cuando los MØ humanos eran estimulados en su presencia. En efecto, estos péptidos bajaban la expresión de citoquinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e IL-23p19 mientras que inducían la sobre-expresión de IL-10, dependiendo de la concentración de péptido (Figura R20 A-D). La región CDR1 muestra una marcada actividad anti-inflamatoria a nivel de IL-12p40 e IL-23p19, sin embargo no produce ni la caída de la expresión de TNF- $\alpha$  ni sobre-expresa IL-10 (Figura R20 A-D). Sin embargo, CDR2 y CDR3 ejercen una acción anti-inflamatoria más potente, inducen una caída de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12p40, IL-23p19 (Figura R20 A, C y D, respectivamente) y una sobre-expresión de IL-10 (Figura R20B). No obstante, ninguno de los tres péptidos reproduce los drásticos efectos observados en presencia de

sTREM-1 a la misma concentración (Figura R16 A-D). Además llevamos a cabo experimentos iguales a los desarrollados en el punto 3.10 (no mostrados) donde los MØ tolerantes en presencia de GM6001 y los péptidos no inhibían la expresión de IL-12p40 ni de ninguna otra citoquina, como ocurre en el caso de sTREM-1. Estos datos evidencian que la conformación de la proteína completa es necesaria para ejercer su función adecuadamente.

Aunque el papel de sTREM-1 no está claro, es posible que su liberación al medio haga que la forma soluble compita con el receptor TREM-1 por su ligando lo que llevaría a disminuir la acción del receptor (41, 49). Nuestros datos sugieren que los dominios CDR2 y CDR3 parecen ser de gran importancia en la unión del ligando endógeno de TREM-1, mientras que el dominio CDR1 parece ser un dominio relativamente menos importante.

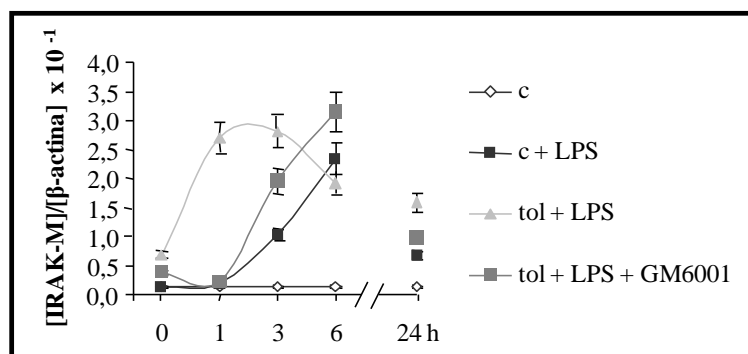


**Figura R20.** Los péptidos sintéticos derivados de TREM-1 presentan una actividad anti-inflamatoria. Los MØ humanos se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 3 (A) y 6 horas (B-D), en presencia o ausencia de diferentes dosis de los péptidos sTREM-1 (CDR1, barra gris oscuro; CDR2 barra gris claro y CDR3 barra blanca). Después las células se cosecharon, se aisló el ARNm y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de TNF-α (A), IL-10 (B), IL-12p40 (C) e IL-23p19 (D), se cuantificaron por Q-PCR usando cebadores específicos. La relación [gen]/[β-actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). \*p-valor<0.05 comparando la condición c+LPS+CDR1 o c+LPS+CDR2 o c+LPS+CDR3 respecto a la c+LPS.

#### 4.12. La expresión permanente de TREM-1 en la superficie celular restaura la señalización celular inflamatoria en monocitos tolerantes.

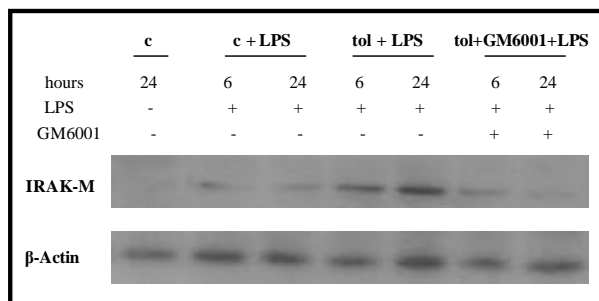
Como hemos demostrado hasta el momento la expresión mantenida de TREM-1 en la membrana celular revierte el fenotipo tolerante, restableciendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo, como ya mencionamos anteriormente este hecho no es más que un reflejo de las modificaciones en distintas vías de señalización. Existen amplios estudios que ponen de manifiesto como varias cascadas de señalización tales como TLR/IRAK, I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B y PI3K/Akt están desreguladas de manera relevante en un estado de TE. En particular, la expresión de IRAK-M y la fosforilación de Akt, I $\kappa$ B- $\alpha$  y ERK 1/2 son drásticamente afectadas durante la TE (70, 72).

Otros autores y nosotros hemos demostrado el papel que juega la pseudoquinasa IRAK-M en el control de TE (71, 91, 92) que es rápidamente sobre- expresada en M $\phi$  tolerantes después de una estimulación con LPS (78). Aplicando el modelo que hemos utilizado a lo largo de todo el trabajo, observamos como los M $\phi$  tolerantes recuperan la cinética de expresión estándar de IRAK-M en presencia de GM6001. Lo que se traduce en que la rápida sobre-expresión de IRAK-M a 1 hora en M $\phi$  tolerantes (tol+LPS) es abolida en presencia de inhibidor de metaloproteasas (Figura R21), siendo el máximo de expresión a las 6 horas que desciende a las 24 horas, tanto en las condiciones c+LPS como tol+LPS+GM6001.



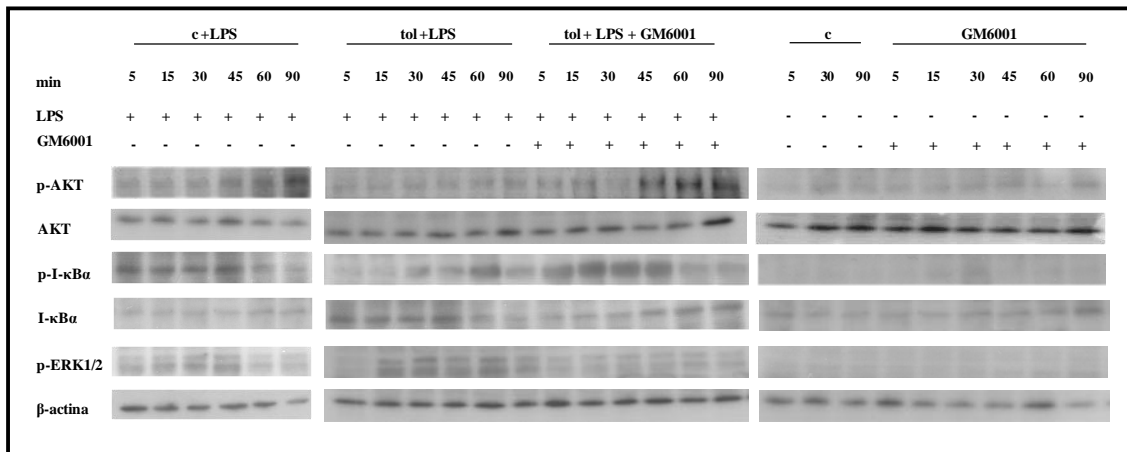
**Figura R21.** GM6001 revierte la cinética tolerante de IRAK-M a nivel de ARNm. Los M $\phi$  humanos controles (c+LPS) y tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS, en presencia o ausencia de GM6001 durante los tiempos indicados. Después las células se cosecharon, se aisló el ARNm y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de IRAK-M se cuantificaron por Q-PCR usando cebadores específicos. La relación [gen]/[ $\beta$ -actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

Este dato se corroboró analizando los niveles de IRAK-M a nivel de proteína, donde podemos observar la reversión de la cinética tolerante con GM6001. Sólo en el caso de MØ tolerantes en ausencia de GM6001 se producía una expresión significativa de IRAK-M (Figura R22).



**Figura R22.** *GM6001 revierte la cinética tolerante de IRAK-M a nivel de proteína.* Los MØ humanos controles (c+LPS) o tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS, en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 durante 6 o 24 horas. Después las células se cosecharon, se extrajo la proteína y se analizaron los niveles de IRAK-M y β-actina por *Western blot* con anticuerpos específicos. Se muestra una membrana típica (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

Trabajos de otros autores han estudiado en profundidad la cinética de fosforilación de Akt, IκB-α y ERK 1/2 después del estímulo con LPS (72). Mientras que ERK 1/2 y IκB-α son rápidamente fosforiladas después del tratamiento de los MØ humanos con LPS, en el caso de Akt la fosforilación solo es significativa después de  $\cong 2$  horas (25). En nuestro modelo, la fosforilación de Akt es prácticamente abolida durante la TE, IκB-α se retarda ( $\cong 30$  minutos), y p-ERK 1/2 se detecta tras 15 minutos de tratamiento con LPS (Figura R23). Por el contrario, la presencia de GM6001 prácticamente restaura la cinética que se produce en los MØ estimulados con LPS (c+LPS) (Figura R23). Mientras que la fosforilación de Akt es bloqueada en MØ tolerantes, en presencia de GM6001 se observa una banda fuerte que corresponde a p-Akt después de 45 minutos de estimulación con LPS. De acuerdo con lo anterior, los cultivos de MØ tolerantes en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001), pERK 1/2 no se detectó (Figura R23). Finalmente, p-IκB-α se detecta a los 5 minutos del estímulo con LPS en MØ tolerantes en presencia de GM6001. Comprobamos por citometría de flujo que TREM-1 permanecía en membrana en aquellos cultivos en los que se adicionó GM6001. En vista de los resultados podemos decir que la cinética de fosforilación en las vías estudiadas es similar en los MØ controles estimulados con LPS (c+LPS) y en los tolerantes estimulados con LPS en presencia de GM6001 (tol+LPS+GM6001).

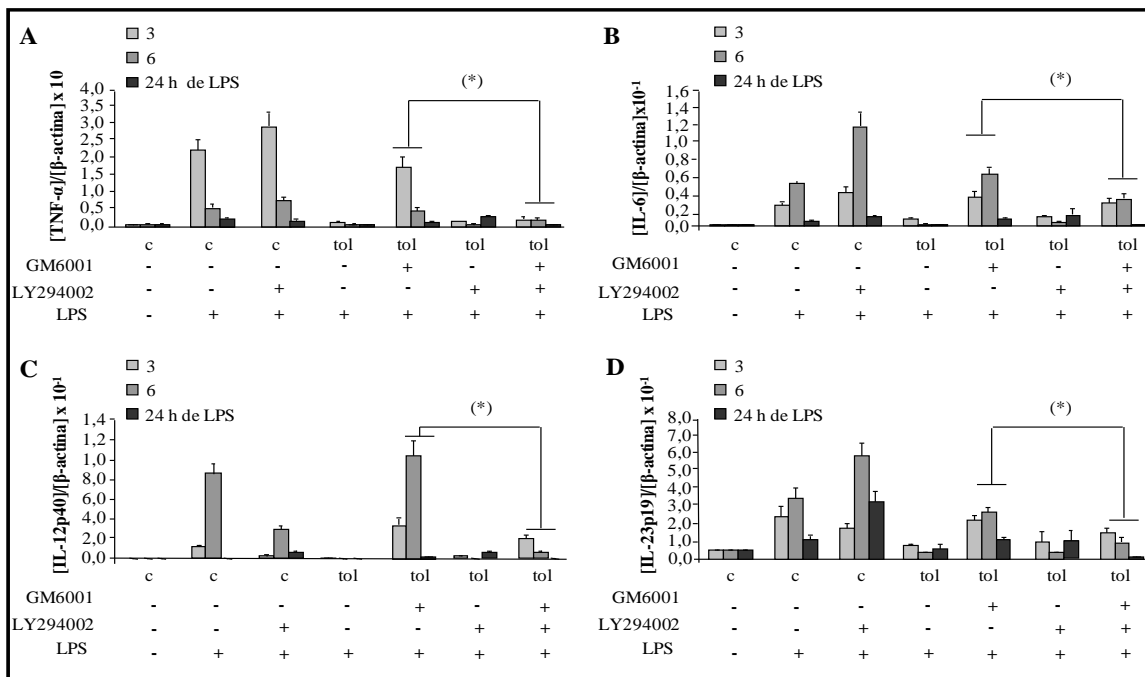


**Figura R23.** *GM6001 restaura la cinética de fosforilación en MØ tolerantes.* Los MØ humanos controles (c+LPS) o tolerantes (tol+LPS) se estimularon con 10 ng/ml de LPS, en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 desde 5 a 90 minutos. Después las células se cosecharon, se extrajo la proteína y se analizaron los niveles de p-Akt, Akt, p-IκB-α, IκB-α, p-ERK 1/2, ERK 1/2 y β-actina por *Western blot* con anticuerpos específicos. Se muestra una membrana típica (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó.

#### **4.13. El inhibidor de PI3K restaura el fenotipo tolerante en monocitos tratados con GM6001.**

La expresión permanente de TREM-1 en membrana impide la entrada de los MØ en un estado refractario, lo que se deriva en un patrón normal de fosforilación de las principales vías implicadas en la activación por TLR-4 (Figura R23), que a su vez se traduce en el desarrollo de una fuerte respuesta inflamatoria sobre-expresando citoquinas inflamatorias como TNF-α, IL-6, IL-12p40 e IL-12p19 (Figura R12). Por otra parte, nuestro grupo demostró en un trabajo anterior que el inhibidor general de PI3K, LY294002, aceleraba la expresión de IRAK-M en MØ humanos tratados con LPS (78). Otros autores han publicado que la producción de citoquinas por TREM-1 está mediada por la vía de señalización de PI3K (107), y que la actividad de PI3K afecta al estado de fosforilación de Akt y IκB-α (72, 108). Nuestros datos indican que la estabilización en membrana de TREM-1 contrarresta la rápida sobre-expresión de IRAK-M en MØ tolerantes (tol+LPS), mientras Akt y IκB-α son fosforiladas de acuerdo a una cinética estándar de exposición a un solo estímulo con LPS (Figura R23). Estas observaciones nos llevaron a hacer un estudio en detallado del papel de PI3K en la modulación del fenotipo tolerante. Los MØ controles (c+LPS) y tolerantes (tol+LPS)

fueron expuestos a LPS en presencia o ausencia de tanto GM6001 como LY294002. Tal como esperábamos la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 e IL-23p19) eran significativamente inhibidas en MØ tolerantes tratados con LPS en presencia de ambos inhibidores, cuando comparamos la misma condición sin LY294002 (Figuras R24 A-D). Por otra parte, LY294002 produce un aumento en la expresión de la mayoría de citoquinas en los MØ expuestos a LPS en presencia dicho inhibidor (c+LPS+LY294002). Sin embargo, no restaura el fenotipo tolerante en ausencia de GM6001, es decir, sin la expresión de TREM-1 mantenida en la superficie celular (tol+LPS+LY294002) (Figuras R24 A, B y C).



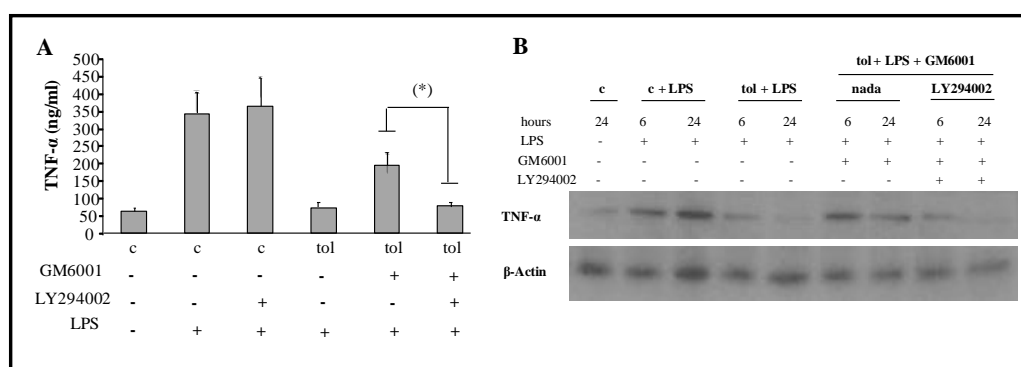
**Figura R24.** La inhibición de PI3K restaura el fenotipo tolerante en MØ humanos tratados con GM6001. Los MØ humanos controles (c) o tolerantes (tol) se estimularon con 10 ng/ml de LPS en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 y/o LY294002 durante 3, 6 o 24 horas. Después las células se cosecharon, se extrajo en ARN total y se sintetizó ADNc. Los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B), IL-12p40 (C), IL23p19 (D) y  $\beta$ -actina se analizaron por Q-PCR, (n=4). \*p-valor<0.05 comparando tol+GM6001+LY294002 respecto a tol+GM6001. La relación [gen]/[ $\beta$ -actina] representa la media aritmética de tres experimentos independientes (n=3). GM6001 se mantuvo durante todo el tiempo que duró el ensayo en las condiciones experimentales donde se usó. LY294002 se introdujo en el sistema una hora antes del estímulo de LPS en controles (c+LPS) y una hora antes del segundo estímulo de LPS en tolerantes (tol+LPS).

Estos datos nos llevan a pensar que la regresión del estado refractario se debe, al menos en parte, a la señalización por PI3K. Esto corrobora la dualidad en cuanto a la



acción de PI3K, como freno o activador de la respuesta inflamatoria, algo que está ampliamente documentado (28-30) y será objeto de discusión.

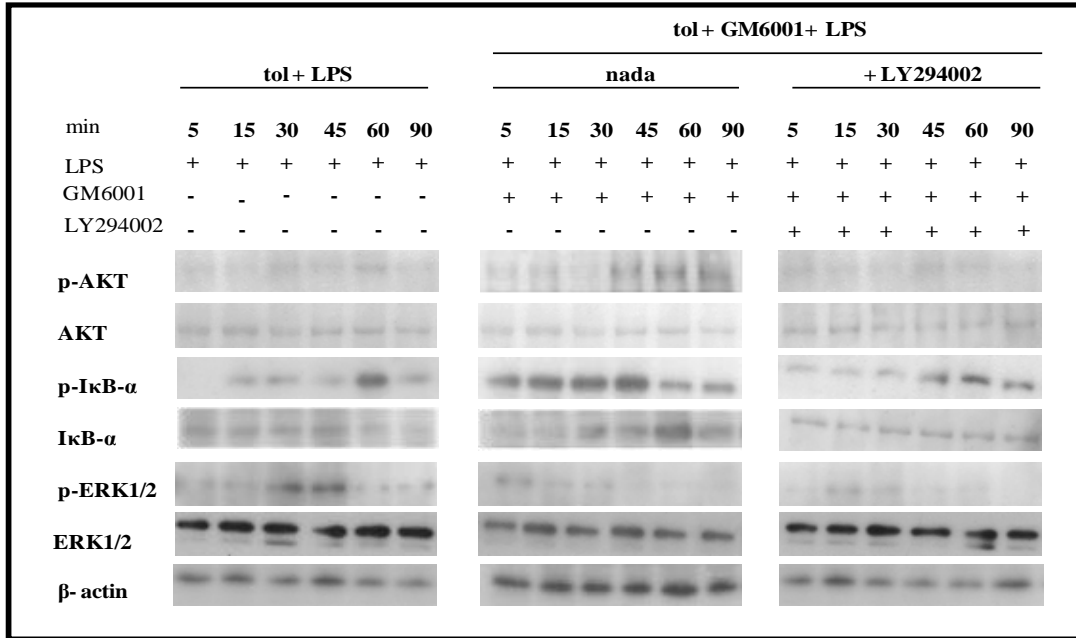
Igualmente los niveles de TNF- $\alpha$  presentaban un perfil de acuerdo a nuestros resultados anteriores. Observamos una caída de la expresión de TNF- $\alpha$  en M $\emptyset$  estimulados con LPS en presencia de ambos inhibidores comparados con los M $\emptyset$  en las mismas condiciones pero en ausencia de LY294002. Esta caída produce un perfil de expresión muy parecido a los M $\emptyset$  tolerantes (Figura R25 A y B). Por lo tanto podemos decir que con el inhibidor de PI3K se recuperaba en fenotipo TE en los M $\emptyset$  tolerantes en presencia de GM6001 y LY294002.



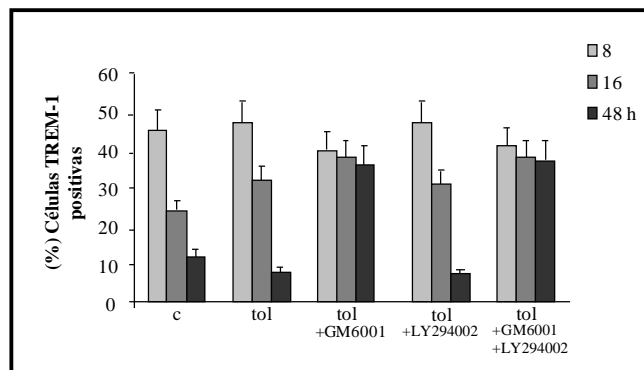
**Figura R25.** La inhibición de PI3K restaura el fenotipo tolerante en M $\emptyset$  humanos tratados con GM6001. **A.** Los M $\emptyset$  control (c) o tolerantes (tol) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 24 horas en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 y/o LY294002 y las concentraciones de TNF- $\alpha$  se determinaron por un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml (n=3). **B.** Los M $\emptyset$  humanos controles (c) o tolerantes (tol) se estimularon con 10 ng/ml de LPS en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 y LY294002 durante 6 o 24 horas. Después las células se cosecharon, se extrajo la proteína total y se analizó la expresión de TNF- $\alpha$  y  $\beta$ -actina por *Western blot* usando anticuerpos específicos. Se muestra una membrana típica (n=3). LY294002 se introdujo en el sistema una hora antes del estímulo de LPS en controles (c+LPS) y una hora antes del segundo estímulo de LPS en tolerantes (tol+LPS).

Finalmente, evaluamos la cinética de fosforilación de Akt, I $\kappa$ B- $\alpha$  y ERK 1/2 en nuestro modelo en presencia o ausencia del inhibidor de PI3K. Podemos observar como en la mayoría de los casos se recupera el fenotipo tolerante con el inhibidor de PI3K excepto en la fosforilación de p-ERK 1/2 (Figura R26). La fosforilación de Akt es prácticamente abolida durante la TE (tol+LPS) y en el caso de I $\kappa$ B- $\alpha$  se retarda ( $\cong$  30 minutos) estas cinéticas se recuperan en los M $\emptyset$  tolerantes en presencia de GM6001 y LY294002 (Figura R26). Por otra parte, descartamos que los efectos observados con

LY294002 se debieran a cambios en la expresión en membrana de TREM-1; ya que los MØ tolerantes en presencia de GM6001 y en presencia o ausencia del inhibidor de PI3K mantenían la expresión de TREM-1 en la superficie celular (Figura R27).



**Figura R26.** La inhibición de PI3K restaura el patrón de activación de las vías de señalización tolerante en MØ humanos tratados con GM6001. Los MØ humanos tolerantes (tol) se estimularon con 10 ng/ml de LPS en presencia (+) o ausencia (-) de GM6001 y/o LY294002 desde 5 a 90 minutos. Después las células se cosecharon, se extrajo la proteína total y se analizó la expresión de p-Akt, Akt, p-IκB-α, IκB-α, p-ERK 1/2, ERK 1/2 y β-actina por Western blot con anticuerpos específicos. Se muestra una membrana típica (n=3). LY294002 se introdujo en el sistema una hora antes del estímulo de LPS en controles (c+LPS) y una hora antes del segundo estímulo de LPS en tolerantes (tol+LPS).



**Figura R27.** LY294002 no afecta a la expresión de TREM-1 en membrana. Los MØ controles (c) y tolerantes (tol) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 8, 16 y 48 horas en presencia o ausencia de GM6001, LY294002 y la combinación de ellos. Después las células se marcaron con anti-TREM-1-PE y se analizó por citometría de flujo. Se representa la fracción de las células teñidas (n=5).

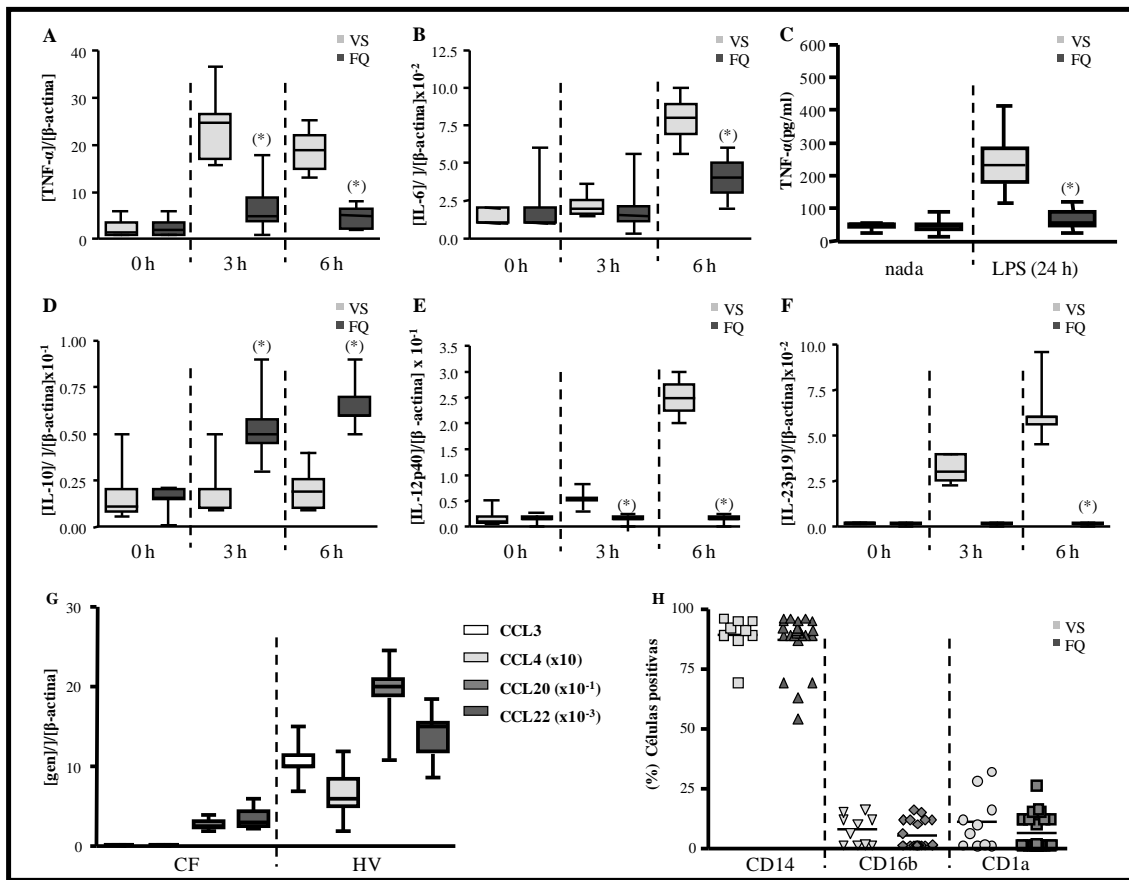
Los datos aportados hasta el momento otorgan a TREM-1 una gran importancia en el fenómeno de la tolerancia a endotoxina. La expresión permanente de este receptor en la superficie de membrana revierte el fenotipo tolerante. Además esta reversión se encuentra mediada, al menos en parte, por PI3K. Para otorgar un mayor peso a nuestro modelo y evaluar su importancia clínica, quisimos comprobar si los pacientes aquejados de FQ presentaban mostraban una desregulación de su sistema inmune innato que podría facilitar las frecuentes colonizaciones por patógenos que sufren estos pacientes.

#### ***4.14. Los monocitos circulantes de pacientes con fibrosis quística presentan una respuesta pro-inflamatoria alterada en presencia de LPS.***

Los pacientes con FQ son colonizados frecuentemente por diferentes bacterias (96, 97). Estas reiteradas colonizaciones podrían deberse no solo a las implicaciones que tiene la mutación en el gen CFRT, sino que también podrían tener su origen en una acción poco efectiva de los MØ infiltrados al pulmón; de tal manera que si estos MØ se encuentran en un estado tolerante no desarrollan una respuesta inmune efectiva que se traducirá en el progreso del proceso infeccioso en el pulmón. Por ello decidimos estudiar la respuesta inmune en los MØ circulantes de estos pacientes.

Para confirmar nuestra hipótesis, se cultivaron los MØ de los pacientes con FQ y voluntarios sanos (VS) en presencia o ausencia de LPS durante 3 y 6 horas, y verificamos la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias. Los MØ aislados de pacientes con FQ revelaban una baja expresión a nivel de ARNm de TNF- $\alpha$  (Figura R28A), IL-6 (Figura R28B), IL-12p40 (Figura R28E), IL-23p19 (Figura R28F) y elevados niveles de IL-10, mientras que los MØ de voluntarios sanos (VS) inducían significativamente estas citoquinas después del estímulo con LPS (Figura R28 A, B, E y F). Por tanto los MØ de pacientes con FQ presentaban un perfil clásico IL-12<sup>bajo</sup>, IL-23<sup>bajo</sup>, IL-10<sup>alto</sup> y la baja expresión de quimioquinas tales como CCL3, CCL4, CCL20 y CCL22 (Figura R28G). También estudiamos la producción de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de los cultivos de MØ. De acuerdo a lo observado a nivel de ARNm, la concentración de TNF- $\alpha$  es del orden de 2,5 veces menor en el sobrenadante de los cultivos de MØ de pacientes con FQ, respecto a la secretada por MØ de VS (Figura R28C). Por último apuntar que  $\cong$  el 90% de estas células eran CD14+, mientras que los niveles de CD16b y CD1a eran despreciables (Figura R28H).

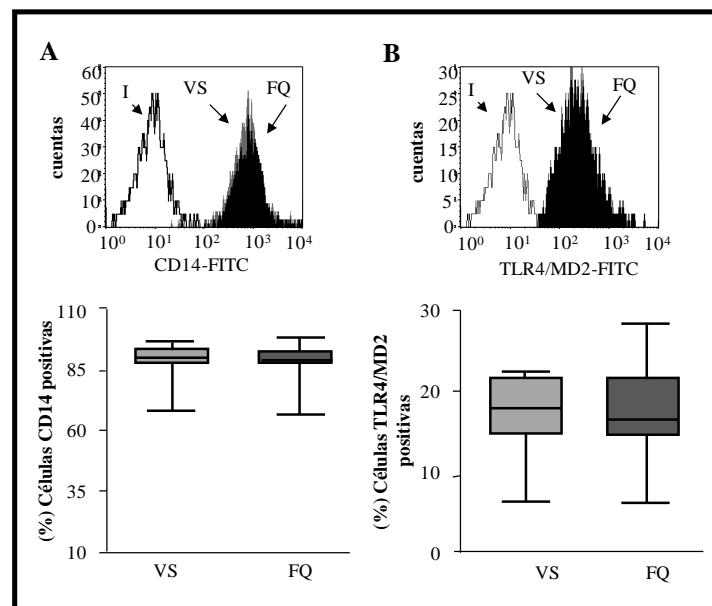
Con estos datos confirmamos que los MØ de los pacientes con FQ no desarrollan una fuerte respuesta pro-inflamatoria en presencia de LPS, y por lo tanto pueden encontrarse en un estado refractario.



**Figura R28.** Los MØ de pacientes con FQ no inducen una respuesta pro-inflamatoria cuando se estimulan con LPS. **A, B, D-F.** Los MØ de VS (barras grises, n=10) y de pacientes con FQ (barras negras, n=20) se estimularon con 10 ng/ml de LPS para los tiempos indicados. El ARN se aisló, se sintetizó ADNc, y el ARNm se cuantificó por Q-PCR. La relación [gen]/[β-actina] representa la media aritmética VS (n=10) y FQ (n=20). \* p-valor < 0.05 comparando MØ de FQ frente a los de pacientes con VS. **C.** Las concentraciones de TNF-α se determinaron por un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml. **G.** Los MØ de VS (barras grises) y de pacientes con FQ (barras negras) se estimularon con 10 ng/ml de LPS durante 6 horas. El ARN se aisló, se sintetizó ADNc, y se cuantificó por Q-PCR. **H.** La pureza de los cultivos se verificó por marcaje con anticuerpos específicos CD14-APC, CD16b-FITC y CD1a FITC seguido por un análisis por citometría de flujo, la fracción de células marcadas para cada anticuerpo es de n=3.

**4.15. Los monocitos circulantes de pacientes con fibrosis quística muestran unos niveles normales de TLR4, MD2 y CD14 en su superficie celular.**

Una vez establecido que los MØ circulantes de pacientes con FQ responden de una manera atenuada cuando se les expone *ex vivo* a LPS, decidimos analizar la expresión de las proteínas involucradas en el reconocimiento y señalización de LPS, CD14, TLR4 y MD2. Como ya explicamos anteriormente el complejo CD14/TLR-4/MD2 es esencial para el reconocimiento del LPS (69). Por lo tanto anomalías en la expresión de las proteínas que conforman dicho complejo podrían ofrecer una explicación sencilla de la desensibilización de los MØ al LPS en pacientes con FQ. Sin embargo, observamos niveles normales de todas estas proteínas en la superficie de la membrana celular. Los análisis de citometría de flujo no revelaron diferencias significativas entre los VS y los pacientes con FQ, observando expresiones equiparables de CD14 (Figura R29A) y TLR-4/MD2 (Figura R29B) en los dos grupos de individuos estudiados.



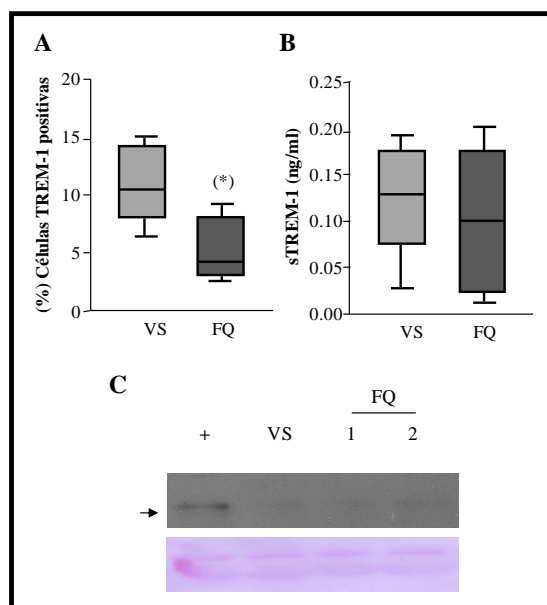
**Figura R29.** Los elementos del complejo receptor del LPS están expresados de manera similar en voluntarios sanos y pacientes con FQ. Los MØ aislados de voluntarios sanos (VS, barras grises, n=10) y los de pacientes con FQ (FQ, barras negras, n=20) se marcaron con anticuerpos anti-CD14-FITC (A) y anti-TLR-4/MD2-FITC (B) y se analizaron por citometría de flujo. En el panel superior está representado un histograma típico (I, control isotópico, VS, voluntario sano, FQ, paciente con FQ).

#### ***4.16. Los pacientes con fibrosis quística presentan bajos niveles de TREM-1 en monocitos circulantes.***

La expresión alterada de citoquinas pro-inflamatorias en los pacientes con FQ, podría sugerir que sus MØ no son capaces de presentar una actividad inflamatoria fuerte en respuesta al LPS (Figura R28 A-G). Esta alteración no se debe a alteraciones en el complejo receptor CD14/TLR-4/MD2, ya que estas tres proteínas son expresadas con normalidad en la superficie celular de los MØ de pacientes con FQ (Figura R29 A y B). Teniendo en cuenta la fuerte vinculación de TREM-1 con enfermedades polimicrobianas, y en particular con infecciones de pulmón (48, 58, 109) y los datos aportados en este trabajo, donde la expresión permanente de TREM-1 en membrana impide a los MØ humanos entrar en un estado refractario, vinculando directamente TREM-1 y la TE; hipotetizamos que la disminución de este receptor podría ser el agente causante, al menos en parte, de la respuesta atenuada al LPS en pacientes con FQ.

Para verificar esta hipótesis, comparamos los niveles de TREM-1 en MØ de pacientes con FQ con respecto a los VS. Según nuestros datos, los pacientes con FQ tenían una expresión basal de TREM-1, en la superficie celular, significativamente menor que los VS (Figura R30A). En esta figura se puede observar como los niveles basales en pacientes con FQ son del orden de dos veces menores que en los VS, y por tanto sugiere una posible explicación de la incapacidad de estos MØ para desarrollar una respuesta inflamatoria adecuada.

Teniendo en cuenta que sTREM-1 se genera por corte proteolítico del receptor de membrana, la baja de expresión de TREM-1 en membrana podría deberse al corte constitutivo del receptor debida a la presencia de bacterias gram negativas en los pacientes con FQ (39, 58, 110). Estas bacterias activarían a los MØ que inducirían el corte constitutivo de TREM-1 y por lo tanto a elevadas concentraciones de sTREM-1 en el suero de pacientes con FQ. Sin embargo, al medir los niveles de sTREM-1 en el suero de estos pacientes no observamos diferencias significativas con respecto a los VS donde los niveles de sTREM-1 eran inferiores 0.2 ng/ml (Figura R30B). Estos resultados también se confirmaron por *Western blot* (Figura R30D).



**Figura R30.** Los niveles de expresión de *TREM-1* y *sTREM-1* son bajos en pacientes con *FQ*. **A.** Los MØ aislados de voluntarios sanos (VS, barras grises, n=10) y los de pacientes con *FQ* (*FQ*, barras negras, n=20) se marcaron con anticuerpos anti-CD14-FITC y se analizaron por citometría de flujo. \*p-valor<0.05 comparando *FQ* respecto VS. **B.** Las concentraciones de *sTREM-1* en el sobrenadante del cultivo de los mismos MØ se analizaron con un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml. **C.** *sTREM-1* también se evaluó en los sobrenadantes del cultivo (de un VS y dos *FQ*) por *Western blot* usando un anticuerpo anti-*TREM-1*. Se muestra una tinción típica de membrana con Rojo *Ponceau*, que se utilizó como control de carga. Se utilizaron MØ estimulados durante 16 horas como control positivo (+).

#### **4.17. Los monocitos circulantes de pacientes con *FQ* no sobre-expresan *TREM-1* tras un estímulo con *LPS*.**

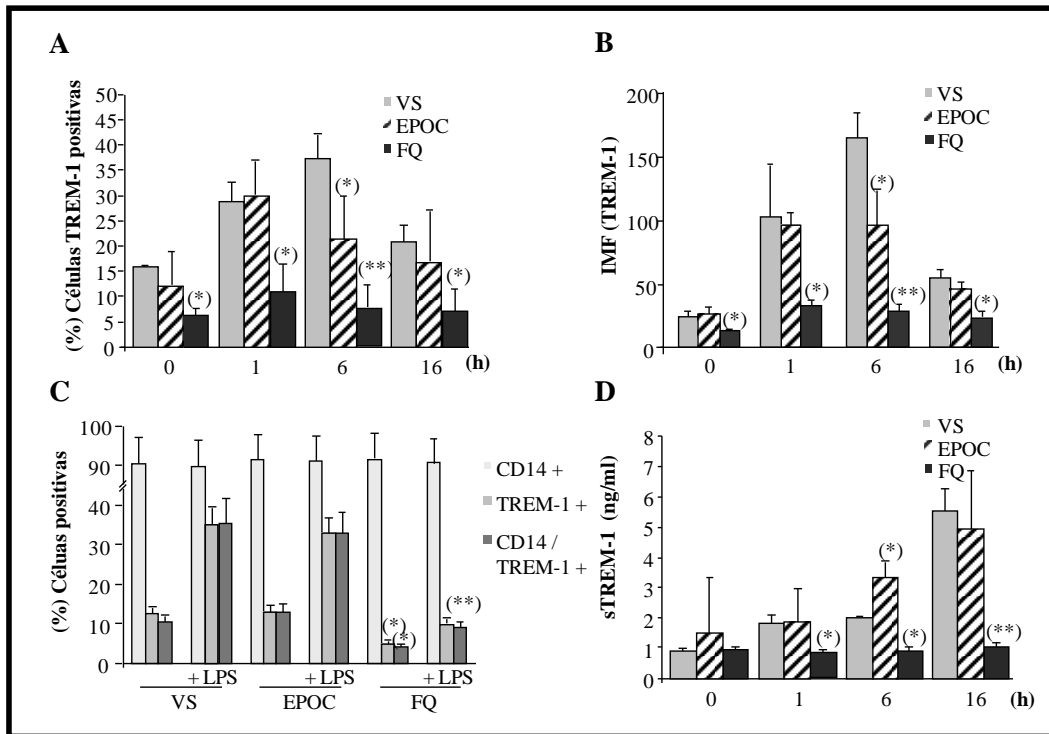
Considerando los resultados previos, sabemos que los pacientes con *FQ* presentan una baja expresión basal de *TREM-1* que puede traducirse en una respuesta inflamatoria atenuada. Para discriminar si estos hechos eran genéricos de enfermedades pulmonares crónicas o era específico de los pacientes de *FQ*, quisimos comparar la cinética de expresión de *TREM-1*, no solo con VS, sino también con pacientes aquejados de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). La EPOC es un problema sanitario de primer orden debido a su importante morbimortalidad (111). La GOLD (del inglés “Global Initiative for the Diagnosis, Management and Prevention of Obstructive Lung Diseases”) la ha definido como una enfermedad caracterizada por la obstrucción crónica al flujo respiratorio, que habitualmente es progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria anormal a la inhalación de partículas o gases tóxicos (104). Por lo tanto la EPOC es una enfermedad pulmonar de etiología radicalmente

distinta, que no tiene afectado la expresión de TREM-1, ya que otros autores ha puesto en evidencia la sobre-expresión de sTREM-1 en suero de pacientes con EPOC (112).

Analizamos los niveles de TREM-1 en los MØ estimulados con LPS de pacientes con FQ, EPOC y VS. Observamos como a medida que pasa el tiempo, los MØ de VS incrementan los niveles de TREM-1 teniendo un máximo de expresión a las 6 horas (incrementado tres veces respecto a los niveles basales) (Figura R32 A y B, barras grises). La expresión de TREM-1 se incrementa de manera similar en los MØ de pacientes con EPOC, pero alcanzan su máximo de expresión antes que en los VS (Figura R31 A y B, barras ralladas). En contraste, TREM-1 no se sobre-expresa en los MØ de pacientes con FQ (Figura R31A y B, barras negras). Además para excluir que lo observado pudiera deberse a la disminución de células TREM-1 positivas, llevamos a cabo otra serie de experimentos con MØ aislados de 5 individuos, seleccionados aleatoriamente, de cada uno de los tres grupos estudiados. El cultivo de MØ fueron estimulados, o no, durante 1 hora con LPS. Después a las células marcaron con TREM-1-FITC y CD14-APC y se analizaron por citometría de flujo. La Figura R31C muestra que todas las condiciones analizadas presentan  $\cong 90\%$  de células CD14+. Los MØ de los VS presentan  $\cong 40\%$  de células CD14/TREM-1 positivas, y un resultado similar se obtiene de pacientes con EPOC. Sin embargo, los MØ de los pacientes con FQ presentan muy bajos niveles de células TREM-1 positivas (menos del 5%), y no incrementan sus niveles basales después de la estimulación con LPS.

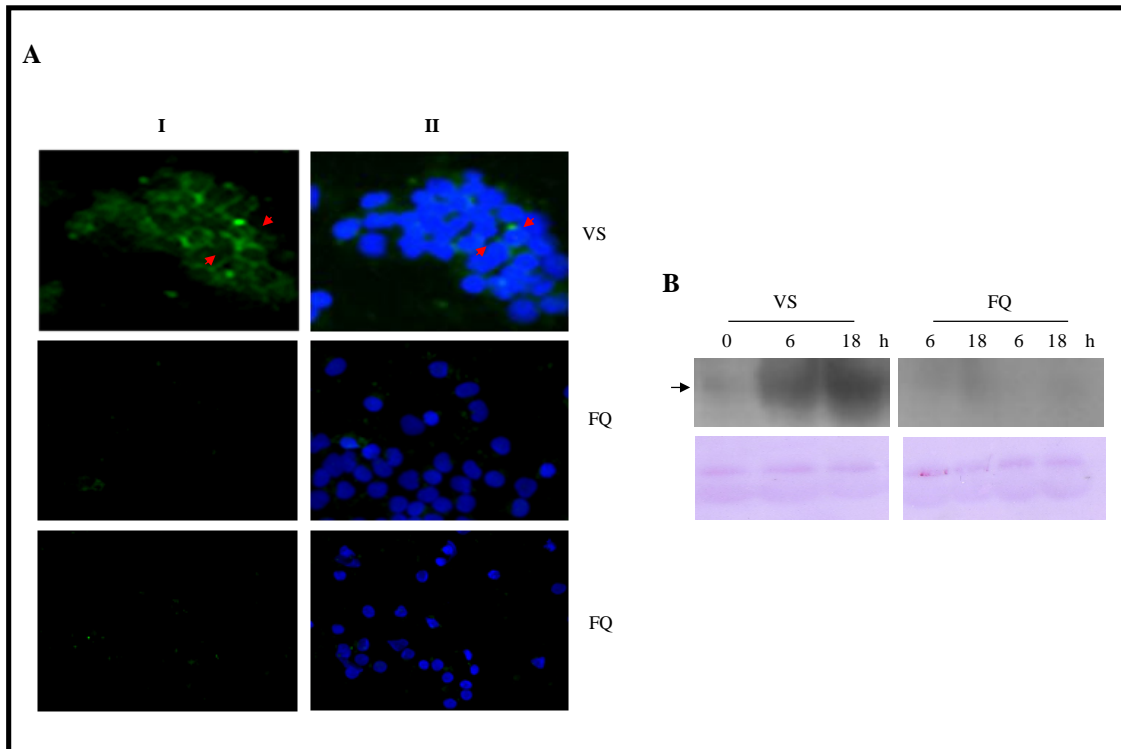
También verificamos la producción sTREM-1, evaluando su presencia en los sobrenadantes de los cultivos de los MØ de cada uno de los grupos de individuos estudiados. La concentración de sTREM-1 aumentaba notablemente en el sobrenadante de VS y de pacientes con EPOC después de 16 horas con LPS (Figura R31C, barras grises y rayadas). Lo que concuerda con nuestros datos previos, donde la reducción de la expresión de TREM-1 en membrana celular incrementa los niveles de sTREM-1 en el sobrenadante de los cultivos (Figura R5). Sin embargo, los cultivos de MØ de los pacientes con FQ no tienen niveles detectables de sTREM-1 después de la estimulación con LPS (Figura R31C, barras negras).





**Figura R31.** Los MØ de los pacientes con FQ pero no con EPOC fallan en inducir la sobre-expresión de TREM-1 después de estimularlos *ex vivo* con LPS. **A.** Los MØ aislados de voluntarios sanos (VS, barras grises, n=10), de pacientes con FQ (FQ, barras negras, n=20) y de pacientes con EPOC (EPOC, barras rayadas, n=10) se marcaron con anti-TREM-1-FITC y se analizaron por citometría de flujo. **B.** IMF (Intensidad media de fluorescencia) de las células TREM-1 positivas **C.** El porcentaje de células CD14 y TREM-1 positivas se analizó por citometría de flujo de cinco individuos (n=5), elegidos al azar, de cada uno de los grupos estudiados, los MØ de estos individuos se trataron una hora con 10 ng/ml de LPS. **D.** Las concentraciones de sTREM-1 en el sobrenadante del cultivo de los mismos MØ se analizaron con un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml. \*p-valor<0.05 y \*\*p-valor<0.01 comparando en las condiciones similares con respecto VS.

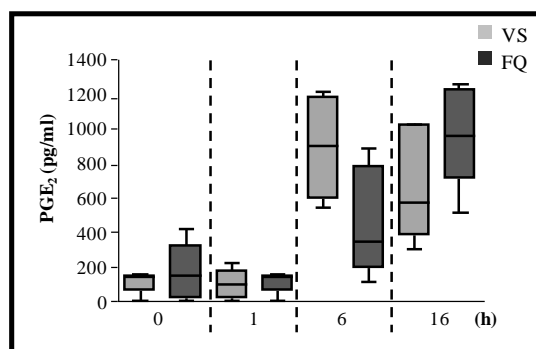
Finalmente, comprobamos estos resultados también por inmunofluorescencia y *Western blot*. Se observa una expresión significativa de TREM-1 en MØ de VS tratados 6 horas con LPS, al contrario que con los MØ de pacientes con FQ (Figura R32A). Además este ensayo demuestra claramente la localización de TREM-1. Además confirmamos la ausencia de sTREM-1 en el sobrenadante de los cultivos de MØ de pacientes con FQ por *Western Blot* (Figura R32B).



**Figura R32.** Los MØ de pacientes con FQ no inducen la expresión de TREM-1 después de estimularlos con LPS. **A.** Los MØ de voluntarios sanos (VS) y pacientes con FQ (FQ), se trataron con 10 ng/ml de LPS durante 6 horas. Después las células se marcaron con anticuerpo anti-TREM (verde), y los núcleos se localizaron por la tinción con DAPI (azul). (I, anti-TREM, II, superposición anti-TREM-1 y DAPI) **B.** sTREM-1 se evaluó en los sobrenadantes del cultivo (de un VS y dos FQ) por *Western blot* usando un anticuerpo anti-TREM-1. Se muestra una tinción típica de membrana con Rojo Ponceau, que se utilizó como control de carga. Este análisis se llevó a cabo en tres VS y tres pacientes con FQ.

#### **4.18. Los niveles de PGE<sub>2</sub> no explican la baja expresión de TREM-1 en los pacientes con FQ.**

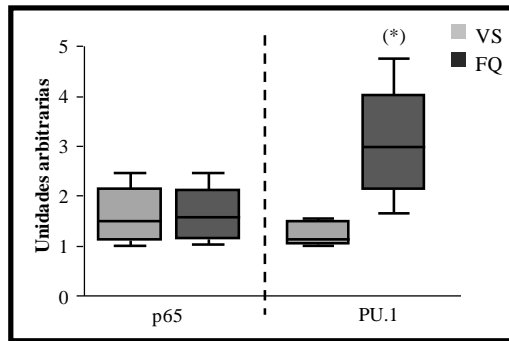
Se ha demostrado que la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) juega un importante papel en el control de la expresión de TREM-1 (113). En concreto, Murakami y colaboradores sugieren que la inducción de TREM-1 es mediada por la PGE<sub>2</sub> endógena. Para examinar el posible mecanismo que explique la baja expresión de TREM-1 en pacientes con FQ, determinamos las concentraciones de PGE<sub>2</sub> en VS y pacientes con FQ. Sin embargo, al contrario de lo que esperábamos, no hay diferencias significativas en la concentración de PGE<sub>2</sub> entre los grupos de estudio (Figura R33). Esto nos indica que otros factores además de PGE<sub>2</sub> modulan la expresión de TREM-1.



**Figura R33.** Los niveles de PGE<sub>2</sub> son similares en VS y pacientes con FQ. MØ aislados de voluntarios sanos (VS, barras grises, n=10) y los de pacientes con FQ (FQ, barras negras, n=20) se trataron con 10 ng/ml de LPS para los tiempos indicados. Se midieron los niveles de PGE<sub>2</sub> usando un ELISA comercial. La concentración se representa en ng/ml.

#### ***4.19. Los pacientes con FQ presentan en sus monocitos circulantes elevados niveles de PU.1.***

Recientemente se ha publicado que la expresión de TREM-1 depende del factor de transcripción p65, mientras que otro factor de transcripción como PU.1, inhibe la sobre-expresión de TREM-1 (114). Las células del sistema inmune, como macrófagos y células B, presentan una elevada expresión de PU.1 (115). Aparentemente, en respuesta al LPS p65 y PU.1 se unen al promotor de TREM-1. Para analizar el posible mecanismo que subyace en la baja expresión de TREM-1 en pacientes con FQ, determinamos los niveles de p65 y PU.1, en los núcleos aislados de MØ de VS y pacientes con FQ. Podemos observar como PU.1 es diferencialmente activado en MØ no tratados de pacientes con FQ comparado con VS, lo que no ocurre con p65 (Figura R35). Este dato sugiere que la activación de PU.1 juega un papel importante en la baja expresión de TREM-1 en los MØ de los pacientes con FQ. Aunque sospechamos que no es el único que está implicado, estos pacientes pueden tener un problema en el tráfico vesicular de TREM-1 a la superficie celular, de tal manera que aunque TREM-1 se transcribe y se traduce queda acumulado en el interior de la célula. Esta hipótesis será desarrollada en la discusión.



**Figura R34.** Los niveles de *PU.1* son sobre expresados en pacientes con *FQ*. Los MØ circulantes de voluntarios sanos (VS, barras grises, n=10) y los de pacientes con *FQ* (FQ, barras negras, n=20) se trataron con un buffer de lisis diferencial que nos permitió separar las fracciones nucleares de dichos MØ, se extrajo la proteína nuclear y se analizó por *Western blot* con anticuerpos específicos anti-p65, anti-*PU.1* y  $\beta$ -actina. Se representa la media de los análisis de densitometrado de las bandas de *Western blot*. \*p-valor<0.05 comparando FQ con respecto a VS.

*DISCUSIÓN*



## 5. Discusión.

TREM-1 ha sido motivo de diversos estudios básicos y clínicos. Las primeras caracterizaciones de este receptor demostraron que su expresión aumentaba en presencia de LPS y otros productos microbianos, siendo capaz de inducir la expresión de citoquinas en MØ humanos cuando actuaba sinérgicamente con los receptores TLR (31, 39, 40). Mientras que su forma soluble, sTREM-1, tenía una clara acción anti-inflamatoria y se le adjudicaba un gran valor como herramienta diagnóstica en sepsis polimicrobiana (116). De este modo la acción de TREM-1 se ha vinculado íntimamente con procesos infecciosos y no con enfermedades inflamatorias de origen no infeccioso como psoriasis, colitis ulcerativa o vasculitis causada por complejos inmunes (39, 117). Teniendo en cuenta estos hechos, la acción de estas dos variantes, TREM-1 y sTREM-1, y el equilibrio entre ellas podría tener un papel relevante en la regulación de la inflamación en estados refractarios. En el presente trabajo, hemos estudiado la expresión de TREM-1 y los mecanismos que subyacen en su regulación en un modelo de TE, en MØ circulantes de origen humano.

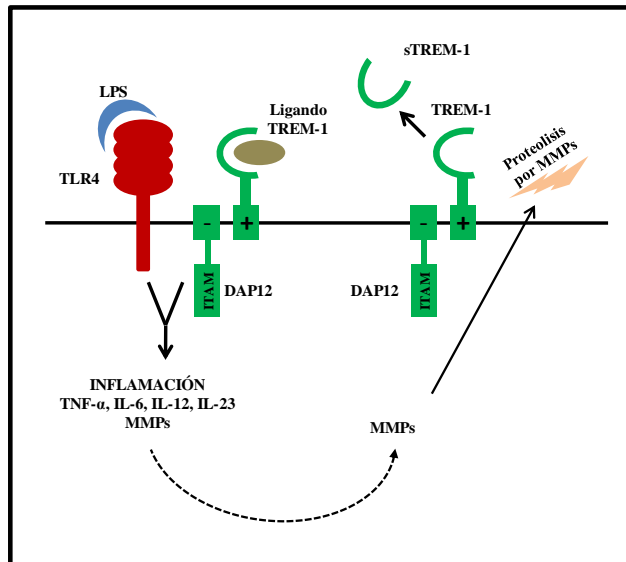
Para llevar a cabo este estudio, partimos del establecimiento de un modelo *in vitro* donde simular las condiciones de tolerancia. Este modelo presenta unas características generales descritas en la Tabla R1 y Figura R1, generando tres condiciones experimentales en base a dos estímulos. Teóricamente, la primera estimulación induce el estado de tolerancia, de forma que en una segunda se atenuará la respuesta inflamatoria. Este efecto es observado en el modelo de tolerancia (tol+LPS) tanto a nivel de ARNm (Figuras R2 A-F) como de proteína (Figura R3 A y B). El primer estímulo, reduce de manera significativa la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 e IL-23p19, inducida por la segunda estimulación; a la vez que induce elevados niveles de IL-10 (Figura R2G). Estos datos en conjunto catalogan a los MØ tolerantes con un marcado fenotipo M2 (83, 84). Así confirmamos que nuestro modelo reproduce el fenómeno de tolerancia, es decir, una capacidad reducida por parte de los MØ de generar una respuesta pro-inflamatoria ante un determinado estímulo, como consecuencia de un primer enfrentamiento al mismo.

Centrándonos en el estudio de la expresión de TREM-1 en respuesta al LPS. Los MØ con una única exposición a LPS presentan la misma cinética y prácticamente los mismos niveles de expresión de TREM-1 que los MØ tolerantes que son expuestos nuevamente al LPS, tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico en la superficie

celular (Figura R4 A y B). La cinética de expresión que presenta TREM-1 en nuestro modelo *in vitro*, coincide con estudios previos donde se pone de manifiesto la sobre-expresión de esta molécula después de una hora en presencia de LPS (37, 52). Sin embargo, sTREM-1 muestra un patrón diferencial en los MØ tolerantes con respecto a los controles expuestos una sola vez a la endotoxina. Presentan una sobre-expresión de sTREM-1 16 horas después del estímulo con LPS, mientras que los MØ tolerantes manifiestan una sobre-expresión de sTREM-1 después de una hora con el estímulo y sus niveles son equiparables a los que se alcanzan a las 48 horas en MØ controles expuestos al LPS (Figura R4C). Estos datos sugieren, primero que la acumulación de sTREM-1 puede estar ejerciendo una acción anti-inflamatoria que favorece al fenotipo tolerante, lo cual concuerda con estudios previos donde se considera que sTREM-1 sigue una cinética equiparable a IL-10 en pacientes sépticos (118). Segundo, la producción de sTREM-1 en MØ expuestos una sola vez a LPS coincide con la caída de la expresión de TREM-1 en la superficie celular (Figura R4 B y C, Figura R5 A y B), lo que nos sugiere que sTREM-1 es el resultado del corte proteolítico de TREM-1 de membrana. Al realizar un riguroso análisis de TREM-1 pudimos observar que este receptor era susceptible de ser cortado en su región yuxtamembranal por gran cantidad de proteasas, destacando la actividad de las metaloproteasas. Es bien conocido que varias metaloproteasas se sobre-expresan en MØ activados con productos microbianos como el LPS (119, 120). Por otra parte, la activación de proteasas se produce vía PGE2 (120), la cual también es responsable de la inducción de TREM-1 (113). Conocer el mecanismo por el cual se genera sTREM-1 abre una puerta al entendimiento más completo de la acción de esta molécula y de su regulación.

Nuestros resultados muestran que en presencia de GM6001, un inhibidor general de MMPs y proteasas de la familia ADAM con aplicaciones potenciales en tratamiento de cáncer (121), la sobre-expresión de TREM-1 se mantiene claramente en la superficie celular incluso 48 horas después de la estimulación con LPS (Figura R6 A y B) y coincide con concentraciones reducidas de sTREM-1 en los sobrenadantes de los mismos cultivos que habían sido tratados con el inhibidor de MMP (Figura R6C). Estos efectos no se observan cuando se utilizaba un inhibidor estándar de proteasas (st-INH) (Figura R6 A-C). Nuestros datos confirman que la procedencia de sTREM-1 viene determinada por un corte proteolítico que se produce por una o varias metaloproteasas de matriz (Figura D1).





**Figura D1.** Representación gráfica del corte proteolítico de *TREM-1*. TLR-4 reconoce al LPS, se produce la activación de distintas rutas de señalización que generan una respuesta inflamatoria y la activación y/o producción de MMPs. Las MMPs se secretarán al exterior celular, una vez en el medio las MMPs cortarán *TREM-1* por su región yuxtamembranal y se generará la forma soluble, sTREM-1.

La traducción de una variante de *splicing* de ARNm continuaba siendo un posible origen de sTREM-1, además una posible variante de *splicing* había sido identificada previamente en MØ humanos y en células de la médula espinal CD34+, así como, en hígado fetal y bazo (50, 51). Sin embargo, nuestros análisis de *Southern blot* revelan una única banda de unas 900 pares de bases (Figura R9A), lo que corresponde al ARNm del receptor completo descrito previamente (31, 50, 51, 113). Estas observaciones sugieren que, al menos en nuestro modelo, la variante de *splicing* no es un origen relevante de sTREM-1.

No obstante, el análisis por *Western blot*, del sobrenadante del cultivo de MØ, indica que la masa molecular de sTREM-1 es  $\approx 27$  kDa (Figura R10); este valor es similar al publicado por otros grupos para sTREM-1 detectado en sobrenadante del cultivo MØ estimulados con LPS (55, 56). La diferencia entre la masa teórica y la experimental ( $\approx 6$  kDa) se explica por el acoplamiento de complejos tipo glicano a dos o tres asparaginas en la unión yuxtamembranal cuya secuencia consenso es Asn-XXX-Thr. Hacemos hincapié que la variante de *splicing* de ARNm de *TREM-1* publicada anteriormente (31) codifica para una variante de receptor (isoforma 2 en Swiss-Prot introduciendo *TREM1\_HUMAN*) que tiene un peso teórico, después de eliminar el péptido señal, mucho menor que los valores experimentales de sTREM-1 ( $\approx 15$  kDa).

Así, esta proteína carece de los tres motivos de N-glicosilación que están presentes en el receptor completo y de los residuos que van del aminoácido 138-150. Teniendo en cuenta que la secuencia silvestre (SGTPGSNENSTQN), que es reemplazada por un péptido no relacionado RC-STLSFSWLVDV y el residuo C-terminal del aminoácido 150 está perdido. Incluso si la N-glicosilación en Asn<sup>146</sup>-Ser-Thr<sup>148</sup> fuera conservada en dicha variante, no podría ser modificada *in vivo*, porque los lugares de mayor eficiencia de glicosilación están normalmente localizados 60 aminoácidos antes del C-terminal de la proteína. En conclusión, esto parece excluir que sTREM-1 se origine tras una modificación post-traduccional de un transcrito producido por una variante de *splicing*, lo que da más peso a que la generación de sTREM-1 se produce por un corte por MMPs.

Los MØ humanos producen una gran cantidad de metaloproteasas, varias de las cuales son inducidas por la estimulación con LPS o con una combinación de GM-CSF y TNF- $\alpha$  (119, 122, 123). Las metaloproteasas, en particular, están asociadas con la liberación de moléculas ancladas a membranas celulares en respuesta a distintos estímulos. Quizás el ejemplo más conocido es TACE/ADAM17 la cual libera la forma activa de TNF- $\alpha$  de su precursor unido a membrana (124), su receptor TNFR (125) y varias proteínas transmembrana como el receptor de GM-CSF (126). Nuestros resultados indican que las MMPs también regulan la respuesta inflamatoria a través del corte y liberación del dominio extracelular de TREM-1. Además, nuestros datos sugieren que varias metaloproteasas están implicadas en la liberación de sTREM-1 (Figura R7 A y B). Sin embargo, el hecho de que muy bajas concentraciones de GM6001 (10nM) sea suficiente para abolir la generación de sTREM-1 mediado por el LPS parece excluir el papel de MMP3/estromelina 1 en este proceso (Ki=27nM). Esto puede ser debido a que ésta MMP preferencialmente se expresa en músculo esquelético ([www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene\\_MMP3](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene_MMP3)), y está involucrada en la degradación de proteínas de la matriz extracelular (colágeno, laminina y fibronectina).

El modelo de glicosilación y corte de una proteína no es algo aislado. La proteína humana ICAM-1/CD54 presenta nueve sitios potenciales de N-glicosilación donde se han identificado mayoritariamente complejos tipo di- o triglicosilado (127). En este caso, el dominio extracelular se corta en respuesta a un estímulo inflamatorio, y al igual que a sTREM-1, a sICAM se le otorga un papel como marcador de infección en sepsis (128). Recientemente se ha identificado a TACE/ADAM17 como la

metaloproteasa responsable de generar el corte proteolítico de ICAM-1 *in vivo*. Además TACE es responsable de estimular el corte de VCAM-1/CD106 (129). Finalmente, una forma soluble de PECAM-1/CD31 se libera durante la apoptosis y en respuesta a la infección viral por el VIH (130, 131), pero la (metalo) proteasa responsable todavía no ha sido identificada. Cabe destacar que el dominio extracelular de estas dos moléculas de adhesión contienen desde cinco (ICAM-1) hasta siete (VCAM-1) dominios Ig, que producirán diferentes subtipos como los encontrados con TREM-1. Por lo tanto el mecanismo identificado para la generación de sTREM-1 es común en la súper familia de las inmunoglobulinas (129). Los dominios inmunoglobulina son liberadas por metaloproteasas en respuesta a la inflamación o la infección. Por otra parte, probablemente el corte de TREM-1 es parte de una respuesta más amplia a diversas condiciones inflamatorias, es decir, podría generarse en respuesta a distintos estímulos como ocurre con el caso de monourato sódico en enfermos aquejados de gota (46) .

Nuestros datos sugieren que la proteólisis del receptor TREM-1 es el origen del sTREM-1 en MØ estimulados con LPS. Además, indican que las MMPs son responsables de la liberación del dominio extracelular de TREM-1 de la superficie celular, dentro de su zona yuxtamembranal. Estos resultados añaden a TREM-1 a la lista de proteínas ancladas en la membrana celular que son liberadas por metaloproteasas en respuesta a una señal inflamatoria.

Una vez definido el origen de sTREM-1 podemos explicar sus niveles elevados después de una hora con LPS en el modelo de TE; estos altos niveles son un reflejo del corte de TREM-1 anclado a membrana y la acumulación en el sobrenadante del cultivo de MØ durante 24 horas (Figura R4C). Esta elevada concentración podría tener implicaciones funcionales en los estados refractarios. Para comprobar esta hipótesis inhibimos el corte proteolítico de TREM-1 por el inhibidor de MMPs en el modelo de TE. Así, observamos que la presencia constitutiva de GM6001 en el medio de cultivo de MØ tolerantes mantiene la expresión de TREM-1 en la superficie celular y suprime la presencia de su forma soluble de 1 a 48 horas después del estímulo con LPS (Figura R11 A y B). Además, como sospechábamos la estabilización de TREM-1 en la superficie celular tiene una implicación funcional modulando el fenotipo TE en MØ humanos. Estudios previos y nuestros datos indican que un fenotipo TE se caracteriza TNF-  $\alpha^{\text{alto}}$ , IL-6<sup>alto</sup>, IL-12<sup>bajo</sup>, IL-23<sup>bajo</sup> e IL-10<sup>alto</sup> (Figura R2 A y B, D-G), (64, 70, 74, 83), sorprendentemente este fenotipo pro-inflamatorio se revierte en presencia de

GM6001 (Figura R12 A-D) y lo hace dependiendo de la concentración del inhibidor de MMPs en el medio de cultivo (Figura R15 A-C). Sin embargo, los niveles de IL-10 no se ven significativamente afectados después del estímulo con LPS. Esto coincide con publicaciones previas donde TREM-1 se encuentra asociado a la sobre-expresión de IL-10 en ratones sépticos (106, 132). Por otra parte, diversos trabajos han demostrado que el fenómeno de tolerización se produce en ratones deficientes en IL-10 (81). Asimismo en pacientes sépticos no se revierte la caída de expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 neutralizando IL-10 (105). Muchos autores no consideran a IL-10 como el desactivador funcional más importante de M $\emptyset$  (105).

Los resultados obtenidos sugieren que el mantenimiento de TREM-1 en la superficie celular o la ausencia de sTREM-1 podría revertir el fenotipo TE clásico. Para discernir si la ausencia de sTREM-1 en el medio era el agente causante de la reversión de la TE, estimulamos los M $\emptyset$  controles con TREM-1 de manera completa y soluble (sTREM-1), es decir, un homólogo de sTREM-1. Comprobamos que esta proteína era funcional y se comportaba como un efector anti-inflamatorio en M $\emptyset$  controles expuestos a LPS (Figura R16 A-D), resultados que ya habían sido reportados por otros grupos (48, 106, 118). Este efecto podría explicarse debido a la competencia de sTREM-1 con el receptor de membrana TREM-1 por su ligando endógeno (37, 49). Para comprobar la implicación de sTREM-1 en el fenómeno de TE, se expusieron los M $\emptyset$  tolerantes a GM6001 y sTREM-1, es decir, simultáneamente TREM-1 se encuentra sobre-expresado en la superficie celular y sTREM-1 se encuentra en el sobrenadante de los medios de cultivo. En estas condiciones se observó un descenso en la expresión de IL-12 e IL-23 y un incremento de IL-10 a niveles equiparables a los M $\emptyset$  tolerantes, es decir, se recuperaba parcialmente el fenotipo tolerante IL-12<sup>bajo</sup>, IL-23<sup>bajo</sup> e IL-10<sup>alto</sup> (Figura R17 A-D), sin embargo TNF- $\alpha$  no descendía a los mismos niveles que en M $\emptyset$  tolerantes. Publicaciones recientes demuestran que la señalización vía Syk-PI3K, por la cual señala TREM-1, induce la expresión de IL-12 e IL-10 (133, 134). Por tanto, manteniendo TREM-1 en la superficie celular en presencia de sTREM-1, se inhiben de manera más drástica aquellas citoquinas fuertemente vinculadas por la señalización a través Syk (IL-12 e IL-10). Esto sugiere que sTREM-1 compite con el receptor TREM-1 por su ligando endógeno. Esta forma soluble ejercería un *feedback* negativo, impidiendo la perpetuación de la inflamación y potenciando la generación del fenotipo tolerante. Cabe destacar que TNF- $\alpha$  no experimenta una bajada de sus niveles de expresión, esto nos indica que en nuestro sistema es posible que otros receptores

susceptibles por corte por MMPs estén involucrados, ya que los MØ controles estimulados con LPS en presencia de sTREM-1 experimentan un descenso en los niveles TNF- $\alpha$  (Figura R16A).

Además quisimos saber qué dominios estaban funcionalmente implicados en el reconocimiento del ligando endógeno para ello se diseñaron y sintetizaron tres péptidos derivados de TREM-1 (CDR1, CDR2 y CDR3). La incubación con los tres péptidos reduce la expresión de IL-12p40 e IL-23p19 en MØ expuestos una sola vez a LPS (Figura R20 C y D). Sin embargo, solo CDR2 y CDR3 son capaces de bajar la expresión de TNF- $\alpha$  a nivel transcripcional (Figura R20A) e inducir la expresión de IL-10 (Figura R20B). Esto sugiere que el *loop* formado por los residuos Thr<sup>70</sup>-Gln<sup>81</sup> y Pro<sup>118</sup>-Met<sup>124</sup> son más críticos para la interacción con un posible ligando endógeno o un receptor de la superficie de MØ, lo que lleva a la activación de vías anti-inflamatorias. Estos datos coinciden con publicaciones previas que indican que el péptido sTREM-1, LP17, tiene una actividad anti-inflamatoria y reduce la mortalidad en modelos de choque séptico en ratón (41, 44, 106). Sin embargo, ninguno de los péptidos ejerce un efecto tan acusado como sTREM-1, lo que sugiere que para que esta proteína ejerza su función es necesaria su conformación completa y que los epítopos responsables de provocar el fenotipo TE incluyen al menos dos CDRs.

El conjunto de nuestros resultados sugieren firmemente que la reversión del fenotipo tolerante en MØ en presencia de GM6001 es debida por una parte, a la estabilización de TREM-1 en la superficie celular y la señalización que desencadena este receptor. Y por otra parte, a la inhibición competitiva por el ligando endógeno mediada por sTREM-1 al menos, a nivel de IL-12, IL-23 e IL-10. Por lo tanto, TREM-1 es un elemento importante implicado en el control del desarrollo de procesos tolerantes en monocitos humanos.

Otros autores y nosotros hemos puesto de manifiesto el importante papel de IRAK-M en el control de la tolerancia a endotoxina. Datos previos de nuestro grupo confirmaban que esta pseudoquinasa se sobre-expresaba rápidamente en MØ humanos expuestos a LPS y esto bloqueaba la señalización TLR/IRAK (71, 78). Cuando impedimos el corte proteolítico de TREM-1 con GM6001, la cinética de expresión de IRAK-M en MØ tolerantes es similar a la observada en MØ expuestos una sola vez a LPS, tanto a nivel transcripcional como traduccional (Figura R21 y R22). Esto sugiere una conexión entre la señalización TREM-1 y la expresión de IRAK-M. Además, este

hecho otorga a TREM-1 un nuevo papel, no solo como amplificador de la señal pro-inflamatoria, sino modulador de dicha señal, donde su presencia en la superficie celular es capaz de modular agentes represores que en último término puede revertir el estado refractario.

Sabemos que la expresión de citoquinas es un reflejo de la activación de distintas vías de señalización. El análisis estas vías de señalización también confirma la reversión del fenotipo TE en presencia del inhibidor de metaloproteasas. La tolerancia a endotoxina se ha asociado a una alteración de la translocación de NFκB al núcleo, esto es debido a la poca activación de proteína IκB-α que secuestra este factor nuclear en el citosol (70). En los MØ estimulados con LPS, IκB-α es fosforilada y degradada rápidamente, lo que permite que NFκB se transloque al núcleo y active la transcripción de un gran número de genes pro-inflamatorios (70, 72). Sin embargo, en MØ tolerantes se ha observado una inhibición de la fosforilación y la degradación de IκB-α tanto en modelos *in vitro* en MØ como *in vivo* en pacientes sépticos (70, 72, 135). En nuestro modelo se restaura la rápida fosforilación de IκB a los 5 minutos en MØ tolerantes cuando se mantiene TREM-1 en la superficie celular por el inhibidor de MMPs (Figura R17), lo que no ocurre con MØ tolerantes. Haciendo una estricta comparación entre los MØ tolerantes estimulados con LPS y los tolerantes en presencia de GM6001, la presencia de inhibidor induce la fosforilación de Akt a los 45 minutos, esto a su vez activará la translocación de NFκB. Por otra parte, publicaciones previas afirman que Akt regula negativamente una gran cantidad de quinasas incluyendo a ERK 1/2 (108, 136, 137), lo que explicaría la inhibición de la fosforilación de ERK 1/2 en los MØ tolerantes en presencia de GM6001 (Figura R23). Estos datos coinciden con publicaciones recientes que indican que la activación de TREM-1 y DAP12 inhiben la fosforilación de ERK 1/2 (62). Trabajos previos han demostrado que la activación de ERK 1/2 reduce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias tales como la IL-12p40 (Figura R12C) (138-140). La caída de la expresión de la IL-12p40 en MØ tolerantes puede explicarse como resultado de la activación de ERK 1/2, así la presencia de GM6001 en cultivos tolerantes inhibe la activación de ERK 1/2 y esto a su vez podría eliminar el bloqueo de la expresión de IL-12p40. Esto contribuiría a regular la aparición de la forma activa de esta interleuquina, IL-12p70, igualmente diversos trabajos afirman que IL-12 también se encuentra regulada post-transcripcionalmente en su subunidad p35 de una manera dependiente de Ca<sup>2+</sup> (140). Asimismo, TREM-1 también podría contribuir a regular p35 post-transcripcionalmente, ya que su activación se traduce en

un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (31, 141). Cabe destacar que la regulación de esta citoquina junto con IL-23p19 tiene grandes implicaciones funcionales en un sistema completo, no sólo son simples marcadores de un fenotipo TE. El balance de estas citoquinas darán como resultado una respuesta adaptativa Th1 en presencia de IL-12 (bioactiva) o Th2 en ausencia de IL-12 (anti-inflamatoria), así como IL-23 promoverá la activación de la presentación antigénica en células dendríticas  $\text{CD8}\alpha+$  o activará los linfocitos T de memoria (140).

Está bien establecido que PI3K juega un papel importante en el control de varias vías de señalización implicadas en TE, y que su expresión se incrementa durante estados refractarios (72, 142). Resultados previos de nuestro grupo demuestran que el inhibidor de PI3K, LY294002, adelanta la expresión de IRAK-M en  $\text{M}\emptyset$  humanos tratados con LPS (78), esto afecta al proceso de TE. Además, es bien conocido que la señalización por PI3K sobre-expresa TREM-1 y amplifica la señalización por TLR (52, 107). Existen numerosas evidencias de la acción activadora e inhibidora de PI3K que dependerá del contexto fisiológico y de las subunidades con las que se constituya el dímero que la conforman (25, 27, 30). Como ha quedado patente, el mantenimiento de la expresión de TREM-1 en la superficie celular abole el fenotipo tolerante en  $\text{M}\emptyset$  humanos. Sin embargo, cuando el inhibidor de PI3K se añade a los cultivos de los  $\text{M}\emptyset$  tolerantes, las características propias de este fenotipo TE, como son la baja expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Figura R24 A-D) y el retraso en la fosforilación de  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  son restablecidas (Figura R26), incluso si se impide el corte proteolítico de TREM-1 por GM6001. Estos datos confirman por una parte que la señalización de TREM-1 y su adaptador DAP12 son mediadas por PI3K, y por otra, que la señalización TREM-1/DAP12/PI3K es esencial para mantener la respuesta inmune innata mediada por el receptor anclado en membrana.

¿Cómo es posible que el mantenimiento de TREM-1 en la membrana celular sea capaz de bloquear la generación del fenotipo TE de  $\text{M}\emptyset$  humanos?

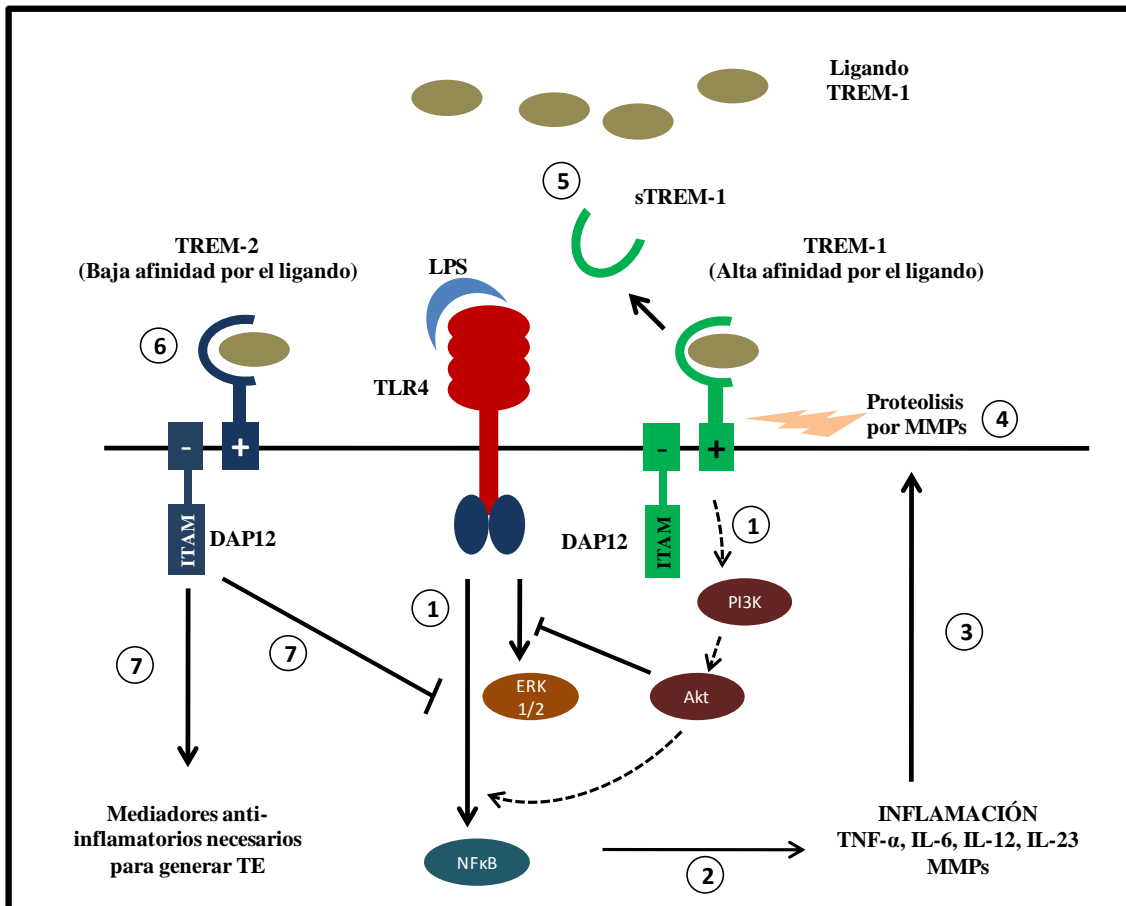
Varias hipótesis, no excluyentes, puede explicar este fenómeno. Primero, el complejo TREM-1/DAP12 podría ser el eje central de la señalización constitutiva que promueve la respuesta inflamatoria, así el corte del receptor de membrana por metaloproteasas podría desarrollar el estado refractario. Además, a consecuencia del corte proteolítico se genera sTREM-1 que potencia el fenotipo TE debido a que ejerce una marcada acción anti-inflamatoria. Una segunda posibilidad es que el carboxilo

terminal del fragmento de TREM-1 resultante del corte por las MMPs, o más aún, un péptido corto derivado de un segundo corte por  $\gamma$ -secretasas, sea transportado al núcleo celular y desencadene la transcripción de genes asociados con el fenotipo TE.

Finalmente, TREM-1 señala a través de la molécula adaptadora DAP12, diversos autores han descrito su acción inhibitoria o activadora en las cascadas de señalización de MØ humanos. Algunos autores muestran que los ratones deficientes en DAP12 son más resistentes a la endotoxemia inducida por LPS, donde la supervivencia de estos ratones se incrementa por la disminución de los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en sangre (143), esto concuerda con la acción amplificadora de TREM-1 *in vivo*. Sin embargo, Hammerman *et al*, describen que DAP12 puede inhibir la señalización en respuesta al LPS. En este estudio, los MØ de ratones deficientes en DAP12 son más sensibles a la D-galactosamina que potencia la endotoxemia, siendo más sensibles a bajas dosis de LPS (62). Además, TREM-2 se ha identificado como un receptor esencial que inhibe la respuesta mediada por TLRs en MØ (60). Estos datos en conjunto nos llevan a pensar que la acción coordinada de TREM-1 y TREM-2 puedan jugar un papel crucial en el desarrollo del fenotipo TE.

Es bien sabido que los receptores de la familia inmunoglobulinas muestran distintas afinidades al mismo ligando, por ejemplo, en el caso de IgA el complejo FC $\alpha$ R-FcR $\gamma$  tiene una elevada afinidad por agregados de IgA, y su señalización por DAP12 es activadora. En cambio, su actividad es la contraria con monómeros de IgA, donde la señalización es inhibitoria debida a la baja afinidad del receptor FC $\alpha$ R-FcR $\gamma$  por el monómero de IgA (144). Por lo tanto, una posible explicación de la reversión del fenotipo TE debida al mantenimiento de TREM-1 en la superficie celular, se deba a que TREM-1 y TREM-2 reconocen al mismo ligando con distintas afinidades. Mientras TREM-1 tiene una alta afinidad por el ligando, TREM-2 tenga una afinidad menor. Por ello, el corte de TREM-1, además de inhibir la señalización pro-inflamatoria *per se*, facilita que TREM-2 se una al mismo ligando activando genes específicos que generen el fenotipo TE y por *ende* frenen la señal pro-inflamatoria (Figura D2). Estas hipótesis serán comprobadas en un futuro.





**Figura D2.** Representación gráfica de la alta afinidad de *TREM-1* contra la baja afinidad de *TREM-2*. 1. El LPS es reconocido por TLR4 que activa su cascada de señalización amplificada por *TREM-1*. 2. La activación de TLR4/*TREM-1* dan como resultado la translocación de NFκB y el aumento de la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias tales como: TNF-α, IL-12, IL-23 y metaloproteasas (MMPs). 3. La citoquinas pro-inflamatorias y las metaloproteasas son secretadas al medio extracelular donde ejercerán su función. 4. Las MMPs producen el corte proteolítico de *TREM-1* anclado a la membrana celular. 5. Se genera s*TREM-1*. 6. El ligando de *TREM* que tiene una afinidad menor por *TREM-2* se une a este receptor ya que *TREM-1* no se encuentra en la superficie celular y no compite por unirse a él. 7. La unión del ligando a *TREM-2* desencadena diferentes cascadas de señalización que darán como resultado la sobre-expresión de mediadores anti-inflamatorios y bloquearán la cascada de señalización activada por TLR4.

El balance entre inflamación y tolerancia a endotoxina juega un papel importante en diversas situaciones clínicas (por ejemplo, sepsis, síndromes coronarios agudo y cáncer), teniendo en cuenta nuestros resultados quisimos comprobar la implicación de *TREM-1* en pacientes con FQ. Investigaciones previas han revelado un estado hiper-inflamatorio en pacientes con FQ (145, 146), la frecuentes colonizaciones de estos pacientes pone de manifiesto una deficiencia en su sistema inmune innato. Varios trabajos han enfocado sus estudios en células residentes o infiltradas en el pulmón,

como son células epiteliales del pulmón y neutrófilos, y han demostrado que existe una alteración en la secreción de IL-8 por parte de las células epiteliales de las vías aéreas en los pacientes con FQ (147). Por otra parte un artículo publicado recientemente presenta un mecanismo interesante donde los neutrófilos pulmonares de pacientes con FQ no son capaces de activarse de una manera adecuada. En este estudio sugieren que debido a la acusada inactividad elastolítica que muestran estos pacientes en sus vías aéreas se produce la liberación por neutrófilos de CXCR1 y esto limita su capacidad para eliminar bacterias (148).

La respuesta inflamatoria en células del torrente sanguíneo todavía no ha sido investigada en pacientes con FQ. Trabajos previos indican que los niveles de TNF- $\alpha$  en pacientes con FQ podrían no ser muy altos (149) o más bajos que en VS (145). Estas contradicciones parecen ser consecuencia de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las vías aéreas y/o por el tratamiento con antibióticos, sin embargo estos datos no pueden ser estadísticamente comparados ya que la cantidad de pacientes incluidos en el estudio es muy baja, 14 pacientes con FQ y 10 VS. Nosotros aislamos MØ de 20 pacientes con FQ, 14 de los cuales estaban colonizados con *Pseudomonas aeruginosa* (Ver tabla M5). Estos pacientes no son capaces de desarrollar una respuesta inflamatoria apropiada cuando se les estimula *ex vivo* con LPS, independientemente de la presencia o la ausencia de la de *Pseudomonas aeruginosa* en sus vías aéreas. Los MØ de pacientes con FQ producen bajos niveles de citoquinas críticas para desarrollar una respuesta inflamatoria adecuada, TNF- $\alpha^{\text{alto}}$ , IL-6<sup>alto</sup>, IL-12<sup>bajo</sup>, IL-23<sup>bajo</sup> e IL-10<sup>alto</sup>, lo que indica que estos pacientes responden de manera atenuada frente a los agentes bacterianos (Figura R28 A-F). Este dato está en concordancia con la baja producción de IL-8 por la línea celular de FQ  $\Delta$ F508 respecto a células epiteliales de vías aéreas sanas después de estimularlas con LPS (150). Estos resultados son más probables que los publicados recientemente donde afirman que se producen elevados niveles de TNF- $\alpha$  en MØ de pacientes con FQ tras estimularlos con LPS (146). Esta disparidad podría ser debida a que Jaresova y colaboradores usan una concentración de LPS 10 veces mayor a la usada por nuestro grupo. Cabe destacar que para nuestros experimentos se ha usado LPS procedente de *Salmonella abortus* donado por el Dr. Chris Galanos. Un estudio reciente que compara diferentes endotoxinas de distintas fuentes indica que el LPS de *S.abortus* es más potente que el generado por las bacterias que colonizan frecuentemente las vías aéreas de pacientes con FQ, *P. aeruginosa* (151). A pesar del gran potencial inflamatorio de este LPS los pacientes con FQ no generan una respuesta pro-

inflamatoria si la comparamos con VS; por lo que podemos asumir que la respuesta inflamatoria que sufren los MØ de estos pacientes colonizados por *P.aeruginosa* será igual o incluso menos pronunciada. No obstante se deben hacer estudios sobre la respuesta inmune incluyendo un gran número de pacientes con FQ, dichas investigaciones serán necesarias para ir más lejos en el mecanismo que subyace a la colonización crónica de pulmón.

Nuestros resultados sugieren que el estado refractario no es consecuencia de un fallo en el reconocimiento del LPS por parte de los MØ de los pacientes con FQ. Observamos niveles normales de todas las proteínas involucradas en el complejo receptor de LPS, TLR-4, MD2 y CD14, comparando la expresión en MØ de pacientes con FQ respecto a los VS (Figura R29 A y B). Estos datos coinciden con los publicados por Muir y colaboradores, quienes muestran que la expresión de los TLRs no se encuentra afectada directamente por la disfunción de CFTR en diferentes líneas celulares epiteliales de pulmón (150).

Como hemos demostrado a lo largo del trabajo, TREM-1 tiene un papel esencial en la inflamación durante los procesos infecciosos. Los MØ circulantes de pacientes con FQ presentan unos niveles basales de TREM-1 en la superficie celular más bajos que los VS (Figura R30A). La expresión de este receptor nos solo es baja sino que permanece invariable estimulando los MØ *ex vivo* con LPS, al contrario que en pacientes con EPOC y VS que sobre expresan este receptor con una cinética muy similar (Figura R31 A y B, Figura R32 A). Estas observaciones sugieren que la baja expresión de TREM-1 en la superficie celular podría ser el agente causante, al menos en parte, del estado de no respuesta en los pacientes con FQ.

Como desarrollamos anteriormente, la estimulación de los MØ con LPS induce la generación de sTREM-1 por el corte proteolítico del receptor de membrana debido a la acción de las MMPs. Este mecanismo sugiere que la caída en los niveles de TREM-1, en los MØ de pacientes con FQ, podría deberse al corte constitutivo del receptor por las frecuentes colonizaciones e infecciones que sufren dichos individuos. Sin embargo, los bajos niveles de TREM-1 en la superficie celular no pueden explicarse por el corte constante del receptor ya que no existen diferencias significativas en la concentración de sTREM-1 entre pacientes con FQ y VS (Figura R30B). Además, los MØ estimulados *ex vivo* con LPS presentan la misma cinética de expresión de sTREM-1 tanto en pacientes con EPOC como en VS y difieren de la que presentan los pacientes con FQ cuyos niveles son significativamente menores (Figura R31D, Figura R32B). Esto datos nos

indican que no todas las enfermedades de pulmón caracterizadas por alteraciones en la respuesta inflamatoria presentan una expresión TREM-1 anormal, esta alteración está íntimamente vinculada a los pacientes de FQ y muy probablemente a la mutación del gen CFTR.

Existen varios reguladores positivos de la expresión de TREM-1 entre ellos se han descrito PGE<sub>2</sub> y p65 (113, 114). Nuestros resultados parecen excluir que parte del mecanismo molecular que origina un fenotipo TE sea la caída de los niveles de PGE<sub>2</sub> (Figura R33) y la activación deficiente de p65 (Figura R34). En cambio, la transcripción del factor PU.1 se sabe que bloquea la expresión de TREM-1 en MØ de ratón (114). Esto está en concordancia con nuestros datos, detectamos altos niveles de PU.1 en núcleos aislados de pacientes con FQ (Figura R35).

Con estos datos solo podemos especular acerca del mecanismo que conecta la disfunción de CFTR y la baja expresión de TREM-1 en la superficie celular. Una hipótesis podría ser que los cambios en la concentración de iones induce la activación de PU.1 en pacientes con FQ y esto lleva a la caída en la expresión de TREM-1 en la superficie de MØ (114). Existen diversos estudios que vinculan la mutación en el gen CFTR y la sobre-expresión de PU.1. Xu y colaboradores demostraron que IL-1β y la proteína de unión a calcio S100, calgranulina A y B (S100A8 y S100A9, respectivamente) se sobre-expresan en ratones deficientes en CFTR (152). De hecho, se han detectado concentraciones elevadas de estas proteínas en suero de pacientes con FQ (152, 153) y se ha vinculado su sobre-expresión con la activación de PU.1 (153, 154). Así, existen varias evidencias de la conexión de los elevados niveles de PU.1 y pacientes con FQ, quizás en respuesta a niveles elevados de calcio intracelular (155). Por lo tanto, los altos niveles de PU.1 en el núcleo de los MØ de pacientes con FQ dan como resultado la represión de TREM-1, cuyo resultado final es la disminución de la expresión de TREM-1 en la superficie celular, el cual frustra el *feedback* positivo necesario para montar una fuerte respuesta inflamatoria frente a la agresión de patógenos. Finalmente, es bien sabido que en los pacientes de FQ el 70% de las mutaciones que sufre el gen CFTR contienen la mutación ΔF508, la cual lleva a formas graves de FQ (96, 97, 99). Esta mutación produce alteraciones del transporte de iones y del transporte vesicular de la propia proteína CFTR a la membrana plasmática. La proteína CFTR se retiene en el retículo endoplásmico, posteriormente se degrada por el proteosoma y además la vida media de dicha proteína en la membrana celular es menor que en individuos sanos (156). Todo ello conlleva no solo un funcionamiento anormal

de esta proteína sino también bajas concentraciones en la superficie de las membranas plasmáticas de las células endoteliales (156). Nosotros sostenemos que el transporte vesicular de TREM-1 en estos pacientes podría también estar afectado, eso explicaría los bajos niveles de expresión de este receptor. Esta hipótesis será investigada en un futuro.



## ***CONCLUSIONES***





## 6. Conclusiones

**Primera:** Las metaloproteasas de matriz son responsables del corte proteolítico del dominio extracelular de TREM-1, lo que genera su forma soluble sTREM.

**Segunda:** El mantenimiento de TREM-1 en la superficie celular, y la falta de sTREM-1 en el sobrenadante de los cultivos, revierten parcialmente el fenotipo tolerante en monocitos humanos de sangre periférica expuestos a lipopolisacárido. El reflejo fisiológico de esta reversión es la restauración de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL12p40 e IL23p19 a niveles equiparables a monocitos no tolerantes. Esto puede explicarse por la inducción de las vías de señalización que desencadena este receptor y por la ausencia de la acción anti-inflamatoria de sTREM-1 al menos a nivel de IL-12, IL-23 e IL-10.

**Tercera:** TREM-1 induce vías de señalización esenciales para mantener la respuesta inmune pro-inflamatoria en monocitos humanos. La señalización de TREM-1 y su adaptador DAP12 es mediada por la vía de PI3K. Esta señalización reprime la expresión de IRAK-M y la fosforilación de ERK 1/2 e induce la fosforilación de Akt e I $\kappa$ B- $\alpha$ .

**Cuarta:** En los monocitos circulantes de pacientes que padecen fibrosis quística no se induce la expresión de citoquinas y quimioquinas críticas para desarrollar una respuesta pro-inflamatoria, tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40, IL-23p19, CCL3, CCL4, CCL20 y CCL22, cuando son expuestos a lipopolisacárido. Por lo tanto, los monocitos de estos pacientes responden de una manera atenuada frente a los agentes bacterianos, presentando un fenotipo tolerante o M2.

**Quinta:** Los monocitos de pacientes que padecen fibrosis quística presentan niveles normales de todas las proteínas involucradas en el complejo receptor del LPS, TLR-4, MD2 y CD14. Sin embargo tienen una baja expresión de TREM-1 en sus monocitos circulantes y son incapaces de inducir la sobre-expresión de este receptor cuando se exponen a lipopolisacárido, probablemente debida a la sobre-expresión de PU.1 en el núcleo de sus monocitos. Estos resultados apuntan a TREM-1 como uno de los posibles agentes causantes del estado tolerante en pacientes aquejados de fibrosis quística.



## ***BIBLIOGRAFIA***



## 7. Bibliografía

1. West, A. P., A. A. Koblansky, and S. Ghosh. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:409-437.
2. Sherwood, E. R., and T. Toliver-Kinsky. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18:385-405.
3. Kumar, S., and R. Jack. 2006. Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. *J Endotoxin Res* 12:278-284.
4. Tosi, M. F. 2005. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 116:241-249; quiz 250.
5. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
6. Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, and J. F. Bazan. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:588-593.
7. Beutler, B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257-263.
8. Watters, T. M., E. F. Kenny, and L. A. O'Neill. 2007. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 85:411-419.
9. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
10. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
11. Ehlers, M., and J. V. Ravetch. 2007. Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. *Trends Immunol* 28:74-79.
12. Paulus, S. C., A. F. Hirschfeld, R. E. Victor, J. Brunstein, E. Thomas, and S. E. Turvey. 2007. Common human Toll-like receptor 4 polymorphisms--role in susceptibility to respiratory syncytial virus infection and functional immunological relevance. *Clin Immunol* 123:252-257.
13. Bochud, P. Y., J. W. Chien, K. A. Marr, W. M. Leisenring, A. Upton, M. Janer, S. D. Rodrigues, S. Li, J. A. Hansen, L. P. Zhao, A. Aderem, and M. Boeckh. 2008. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 359:1766-1777.
14. Santini, D., S. Angeletti, A. Ruzzo, G. Dicunzio, S. Galluzzo, B. Vincenzi, A. Calvieri, F. Pizzagalli, N. Graziano, E. Ferraro, G. Lorino, A. Altomare, M. Magnani, F. Graziano, and G. Tonini. 2008. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes. *Clin Exp Immunol* 154:360-364.
15. Mockenhaupt, F. P., J. P. Cramer, L. Hamann, M. S. Stegemann, J. Eckert, N. R. Oh, R. N. Otchwemah, E. Dietz, S. Ehrhardt, N. W. Schroder, U. Bienzle, and R. R. Schumann. 2006. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:177-182.
16. Faber, J., C. U. Meyer, C. Gemmer, A. Russo, A. Finn, C. Murdoch, W. Zenz, C. Mannhalter, B. U. Zabel, H. J. Schmitt, P. Habermehl, F. Zepp, and M. Knuf. 2006. Human toll-like receptor 4 mutations are associated with susceptibility to invasive meningococcal disease in infancy. *Pediatr Infect Dis J* 25:80-81.

17. Calvano, J. E., D. J. Bowers, S. M. Coyle, M. Macor, M. T. Reddell, A. Kumar, S. E. Calvano, and S. F. Lowry. 2006. Response to systemic endotoxemia among humans bearing polymorphisms of the Toll-like receptor 4 (hTLR4). *Clin Immunol* 121:186-190.
18. Lu, Y. C., W. C. Yeh, and P. S. Ohashi. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42:145-151.
19. Dauphinee, S. M., and A. Karsan. 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86:9-22.
20. Suzuki, N., S. Suzuki, G. S. Duncan, D. G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J. M. Penninger, H. Wesche, P. S. Ohashi, T. W. Mak, and W. C. Yeh. 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416:750-756.
21. Beinke, S., and S. C. Ley. 2004. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 382:393-409.
22. Hull, C., G. McLean, F. Wong, P. J. Duriez, and A. Karsan. 2002. Lipopolysaccharide signals an endothelial apoptosis pathway through TNF receptor-associated factor 6-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* 169:2611-2618.
23. Patriotis, C., A. Makris, S. E. Bear, and P. N. Tsichlis. 1993. Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2251-2255.
24. Ward, S. G., and P. Finan. 2003. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents. *Curr Opin Pharmacol* 3:426-434.
25. Guha, M., and N. Mackman. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 277:32124-32132.
26. Thomas, K. W., M. M. Monick, J. M. Staber, T. Yarovinsky, A. B. Carter, and G. W. Hunninghake. 2002. Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 277:492-501.
27. Madrid, L. V., M. W. Mayo, J. Y. Reuther, and A. S. Baldwin, Jr. 2001. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* 276:18934-18940.
28. Park, Y. C., C. H. Lee, H. S. Kang, H. T. Chung, and H. D. Kim. 1997. Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase, enhances LPS-induced NO production from murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 240:692-696.
29. Pahan, K., J. R. Raymond, and I. Singh. 1999. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase induces nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide- or cytokine-stimulated C6 glial cells. *J Biol Chem* 274:7528-7536.
30. Martin, M., R. E. Schifferle, N. Cuesta, S. N. Vogel, J. Katz, and S. M. Michalek. 2003. Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Immunol* 171:717-725.
31. Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna. 2000. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 164:4991-4995.

32. Daws, M. R., L. L. Lanier, W. E. Seaman, and J. C. Ryan. 2001. Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur J Immunol* 31:783-791.
33. Sessa, G., P. Podini, M. Mariani, A. Meroni, R. Spreafico, F. Sinigaglia, M. Colonna, P. Panina, and J. Meldolesi. 2004. Distribution and signaling of TREM2/DAP12, the receptor system mutated in human polycystic lipomembraneous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy dementia. *Eur J Neurosci* 20:2617-2628.
34. Bouchon, A., C. Hernandez-Munain, M. Cella, and M. Colonna. 2001. A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 194:1111-1122.
35. Cella, M., C. Buonsanti, C. Strader, T. Kondo, A. Salmaggi, and M. Colonna. 2003. Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 198:645-651.
36. Washington, A. V., L. Quigley, and D. W. McVicar. 2002. Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster. *Blood* 100:3822-3824.
37. Klesney-Tait, J., I. R. Turnbull, and M. Colonna. 2006. The TREM receptor family and signal integration. *Nat Immunol* 7:1266-1273.
38. Kelker, M. S., E. W. Debler, and I. A. Wilson. 2004. Crystal structure of mouse triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.76 Å. *J Mol Biol* 344:1175-1181.
39. Bouchon, A., F. Facchetti, M. A. Weigand, and M. Colonna. 2001. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410:1103-1107.
40. Bleharski, J. R., V. Kiessler, C. Buonsanti, P. A. Sieling, S. Stenger, M. Colonna, and R. L. Modlin. 2003. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* 170:3812-3818.
41. Gibot, S., M. N. Kolopp-Sarda, M. C. Bene, P. E. Bollaert, A. Lozniewski, F. Mory, B. Levy, and G. C. Faure. 2004. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med* 200:1419-1426.
42. Hara, H., C. Ishihara, A. Takeuchi, T. Imanishi, L. Xue, S. W. Morris, M. Inui, T. Takai, A. Shibuya, S. Saijo, Y. Iwakura, N. Ohno, H. Koseki, H. Yoshida, J. M. Penninger, and T. Saito. 2007. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* 8:619-629.
43. Schenk, M., A. Bouchon, F. Seibold, and C. Mueller. 2007. TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest* 117:3097-3106.
44. Gibot, S. 2006. The therapeutic potential of TREM-1 modulation in the treatment of sepsis and beyond. *Curr Opin Investig Drugs* 7:438-442.
45. Determann, R. M., J. L. Millo, S. Gibot, J. C. Korevaar, M. B. Vroom, T. van der Poll, C. S. Garrard, and M. J. Schultz. 2005. Serial changes in soluble triggering receptor expressed on myeloid cells in the lung during development of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 31:1495-1500.
46. Murakami, Y., T. Akahoshi, I. Hayashi, H. Endo, S. Kawai, M. Inoue, H. Kondo, and H. Kitasato. 2006. Induction of triggering receptor expressed on

- myeloid cells 1 in murine resident peritoneal macrophages by monosodium urate monohydrate crystals. *Arthritis Rheum* 54:455-462.
47. Ferat-Osorio, E., N. Esquivel-Callejas, I. Wong-Baeza, R. Aduna-Vicente, L. Arriaga-Pizano, P. Sanchez-Fernandez, R. Torres-Gonzalez, C. Lopez-Macias, and A. Isibasi. 2008. The increased expression of TREM-1 on monocytes is associated with infectious and noninfectious inflammatory processes. *J Surg Res* 150:110-117.
  48. Gibot, S., A. Cravoisy, B. Levy, M. C. Bene, G. Faure, and P. E. Bollaert. 2004. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med* 350:451-458.
  49. Gibot, S., and A. Cravoisy. 2004. Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a marker of microbial infection. *Clin Med Res* 2:181-187.
  50. Begum, N. A., K. Ishii, M. Kurita-Taniguchi, M. Tanabe, M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, Y. Fukumori, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya. 2004. Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect Immun* 72:937-948.
  51. Gingras, M. C., H. Lapillonne, and J. F. Margolin. 2002. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol Immunol* 38:817-824.
  52. Knapp, S., S. Gibot, A. de Vos, H. H. Versteeg, M. Colonna, and T. van der Poll. 2004. Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia. *J Immunol* 173:7131-7134.
  53. Schmid, C. D., L. N. Sautkulis, P. E. Danielson, J. Cooper, K. W. Hasel, B. S. Hilbush, J. G. Sutcliffe, and M. J. Carson. 2002. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *J Neurochem* 83:1309-1320.
  54. Gattis, J. L., A. V. Washington, M. M. Chisholm, L. Quigley, A. Szyk, D. W. McVicar, and J. Lubkowski. 2006. The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment. *J Biol Chem* 281:13396-13403.
  55. Gibot, S., C. Buonsanti, F. Massin, M. Romano, M. N. Kolopp-Sarda, F. Benigni, G. C. Faure, M. C. Bene, P. Panina-Bordignon, N. Passini, and B. Levy. 2006. Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infect Immun* 74:2823-2830.
  56. Phua, J., E. S. Koay, D. Zhang, L. K. Tai, X. L. Boo, K. C. Lim, and T. K. Lim. 2006. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in acute respiratory infections. *Eur Respir J* 28:695-702.
  57. Koussoulas, V., S. Vassiliou, M. Demonakou, G. Tassias, E. J. Giamarellos-Bourboulis, M. Mouktaroudi, H. Giamarellou, and C. Barbatzas. 2006. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM-1): a new mediator involved in the pathogenesis of peptic ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18:375-379.
  58. Gibot, S., A. Cravoisy, M. N. Kolopp-Sarda, M. C. Bene, G. Faure, P. E. Bollaert, and B. Levy. 2005. Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Crit Care Med* 33:792-796.
  59. Gustafsson, C., J. Mjosberg, A. Matussek, R. Geffers, L. Matthiesen, G. Berg, S. Sharma, J. Buer, and J. Ernerudh. 2008. Gene expression profiling of human



- decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS ONE* 3:e2078.
60. Turnbull, I. R., S. Gilfillan, M. Cella, T. Aoshi, M. Miller, L. Piccio, M. Hernandez, and M. Colonna. 2006. Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol* 177:3520-3524.
  61. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
  62. Hamerman, J. A., N. K. Tchao, C. A. Lowell, and L. L. Lanier. 2005. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat Immunol* 6:579-586.
  63. El Mezayen, R., M. El Gazzar, M. C. Seeds, C. E. McCall, S. C. Dreskin, and M. R. Nicolls. 2007. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett* 111:36-44.
  64. Fujihara, M., M. Muroi, K. Tanamoto, T. Suzuki, H. Azuma, and H. Ikeda. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100:171-194.
  65. Fujiwara, N., and K. Kobayashi. 2005. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:281-286.
  66. Puccetti, P., M. L. Belladonna, and U. Grohmann. 2002. Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev Immunol* 22:373-390.
  67. Takeda, K., and S. Akira. 2001. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 6:733-742.
  68. Fickenscher, H., S. Hor, H. Kupers, A. Knappe, S. Wittmann, and H. Sticht. 2002. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 23:89-96.
  69. Broad, A., D. E. Jones, and J. A. Kirby. 2006. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* 13:2487-2502.
  70. Cavillon, J. M., and M. Adib-Conquy. 2006. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 10:233.
  71. Lopez-Collazo, E., P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and C. del Fresno. 2006. Pathophysiology of interleukin-1 receptor-associated kinase-M: implications in refractory state. *Curr Opin Infect Dis* 19:237-244.
  72. Fan, H., and J. A. Cook. 2004. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 10:71-84.
  73. Calvano, S. E., W. Xiao, D. R. Richards, R. M. Felciano, H. V. Baker, R. J. Cho, R. O. Chen, B. H. Brownstein, J. P. Cobb, S. K. Tschoeke, C. Miller-Graziano, L. L. Moldawer, M. N. Mindrinos, R. W. Davis, R. G. Tompkins, and S. F. Lowry. 2005. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437:1032-1037.
  74. Freudenberg, M. A., and C. Galanos. 1988. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* 56:1352-1357.
  75. Kobayashi, K. S., and R. A. Flavell. 2004. Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *J Leukoc Biol* 75:428-433.
  76. Pugin, J. 2007. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp* 280:21-27; discussion 27-36, 160-164.

77. Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
78. Escoll, P., C. del Fresno, L. Garcia, G. Valles, M. J. Lendinez, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2003. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 311:465-472.
79. Karp, C. L., M. Wysocka, X. Ma, M. Marovich, R. E. Factor, T. Nutman, M. Armant, L. Wahl, P. Cuomo, and G. Trinchieri. 1998. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur J Immunol* 28:3128-3136.
80. Yadavalli, G. K., J. J. Auletta, M. P. Gould, R. A. Salata, J. H. Lee, and F. P. Heinzl. 2001. Deactivation of the innate cellular immune response following endotoxic and surgical injury. *Exp Mol Pathol* 71:209-221.
81. Berg, D. J., R. Kuhn, K. Rajewsky, W. Muller, S. Menon, N. Davidson, G. Grunig, and D. Rennick. 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. *J Clin Invest* 96:2339-2347.
82. Biswas, S. K., L. Gangi, S. Paul, T. Schioppa, A. Saccani, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Doni, B. Vincenzo, F. Pasqualini, L. Vago, M. Nebuloni, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107:2112-2122.
83. Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453-461.
84. Sica, A., P. Larghi, A. Mancino, L. Rubino, C. Porta, M. G. Totaro, M. Rimoldi, S. K. Biswas, P. Allavena, and A. Mantovani. 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18:349-355.
85. del Fresno, C., García-Río, F., Gómez-Piña, V., Soares-Schanoski A., Fernández-Ruiz, I., Jurado, T., Kajiji, T., Shu, C., Marín, E., Gutierrez del Arroyo, A., Prados, C., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., Biswas S.K., López-Collazo, E. aceptado pendiente de publicación. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identify LPS-tolerant human monocytes: Demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. 2009.
86. van 't Veer, C., P. S. van den Pangaart, M. A. van Zoelen, M. de Kruijff, R. S. Birjmohun, E. S. Stroes, A. F. de Vos, and T. van der Poll. 2007. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *J Immunol* 179:7110-7120.
87. Mendoza-Barbera, E., M. A. Corral-Rodriguez, A. Soares-Schanoski, M. Velarde, S. Macieira, A. Messerschmidt, E. Lopez-Collazo, and P. Fuentes-Prior. 2009. Contribution of globular death domains and unstructured linkers to MyD88-IRAK-4 heterodimer formation: An explanation for the antagonistic activity of MyD88s. *Biochem Biophys Res Commun*.
88. Wesche, H., X. Gao, X. Li, C. J. Kirschning, G. R. Stark, and Z. Cao. 1999. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 274:19403-19410.
89. Kobayashi, K., L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110:191-202.
90. Deng, J. C., G. Cheng, M. W. Newstead, X. Zeng, K. Kobayashi, R. A. Flavell, and T. J. Standiford. 2006. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest* 116:2532-2542.

91. del Fresno, C., L. Soler-Rangel, A. Soares-Schanoski, V. Gomez-Pina, M. C. Gonzalez-Leon, L. Gomez-Garcia, E. Mendoza-Barbera, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res* 13:39-52.
92. del Fresno, C., K. Otero, L. Gomez-Garcia, M. C. Gonzalez-Leon, L. Soler-Ranger, P. Fuentes-Prior, P. Escoll, R. Baos, L. Caveda, F. Garcia, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2005. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *J Immunol* 174:3032-3040.
93. Soares-Schanoski, A., V. Gomez-Pina, C. del Fresno, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, A. Glaria, M. Sanchez, M. T. Vallejo-Cremades, R. Baos, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: a putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *J Leukoc Biol* 82:700-709.
94. Gribar, S. C., C. P. Sodhi, W. M. Richardson, R. J. Anand, G. K. Gittes, M. F. Branca, A. Jakub, X. H. Shi, S. Shah, J. A. Ozolek, and D. J. Hackam. 2009. Reciprocal expression and signaling of TLR4 and TLR9 in the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis. *J Immunol* 182:636-646.
95. Harada, K., and Y. Nakanuma. 2007. Biliary innate immunity and cholangiopathy. *Hepatol Res* 37 Suppl 3:S430-437.
96. Rowe, S. M., S. Miller, and E. J. Sorscher. 2005. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352:1992-2001.
97. Gibson, R. L., J. L. Burns, and B. W. Ramsey. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:918-951.
98. Rajan, S., and L. Saiman. 2002. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect* 17:47-56.
99. Coakley, R. D., B. R. Grubb, A. M. Paradiso, J. T. Gatzky, L. G. Johnson, S. M. Kreda, W. K. O'Neal, and R. C. Boucher. 2003. Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:16083-16088.
100. Kelker, M. S., T. R. Foss, W. Peti, L. Teyton, J. W. Kelly, K. Wuthrich, and I. A. Wilson. 2004. Crystal structure of human triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å. *J Mol Biol* 342:1237-1248.
101. del Fresno, C., García-Rio, F., Gómez-Piña, V., Soares-Schanoski A., Fernández-Ruíz, I., Jurado, T., Kajiji, T., Shu, C., Marín, E., Gutierrez del Arroyo, A., Prados, C., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., Biswas S.K., López-Collazo, E. in revision. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identify LPS-tolerant human monocytes: Demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. 2009.
102. Simmons, A. D., and M. Lovett. 1999. Direct cDNA selection using large genomic DNA targets. *Methods Enzymol* 303:111-126.
103. Rosenstein, B. J., and G. R. Cutting. 1998. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 132:589-595.
104. Pauwels, R. A., A. S. Buist, P. M. Calverley, C. R. Jenkins, and S. S. Hurd. 2001. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic

- Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1256-1276.
105. Cavaillon, J. M., C. Adrie, C. Fitting, and M. Adib-Conquy. 2003. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J Endotoxin Res* 9:101-107.
  106. Gibot, S., F. Massin, M. Marcou, V. Taylor, R. Stidwill, P. Wilson, M. Singer, and G. Bellingan. 2007. TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *Eur J Immunol* 37:456-466.
  107. Dower, K., D. K. Ellis, K. Saraf, S. A. Jelinsky, and L. L. Lin. 2008. Innate immune responses to TREM-1 activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 180:3520-3534.
  108. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189:1777-1782.
  109. Richeldi, L., M. Mariani, M. Losi, F. Maselli, L. Corbetta, C. Buonsanti, M. Colonna, F. Sinigaglia, P. Panina-Bordignon, and L. M. Fabbri. 2004. Triggering receptor expressed on myeloid cells: role in the diagnosis of lung infections. *Eur Respir J* 24:247-250.
  110. Tejera, A., F. Santolaria, M. L. Diez, M. R. Aleman-Valls, E. Gonzalez-Reimers, A. Martinez-Riera, and A. Milena-Abril. 2007. Prognosis of community acquired pneumonia (CAP): value of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and other mediators of the inflammatory response. *Cytokine* 38:117-123.
  111. Barnes, P. J. 2000. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 343:269-280.
  112. Radsak, M. P., C. Taube, P. Haselmayer, S. Tenzer, H. R. Salih, R. Wiewrodt, R. Buhl, and H. Schild. 2007. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Dev Immunol* 2007:52040.
  113. Murakami, Y., H. Kohsaka, H. Kitasato, and T. Akahoshi. 2007. Lipopolysaccharide-induced up-regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2. *J Immunol* 178:1144-1150.
  114. Zeng, H., M. Ornatowska, M. S. Joo, and R. T. Sadikot. 2007. TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF-kappaB and PU.1. *Eur J Immunol* 37:2300-2308.
  115. DeKoter, R. P., M. B. Kamath, and I. B. Houston. 2007. Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. *Blood Cells Mol Dis* 39:316-320.
  116. Gibot, S. 2005. Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. *Crit Care* 9:485-489.
  117. Colonna, M., and F. Facchetti. 2003. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 187 Suppl 2:S397-401.
  118. Giamarellos-Bourboulis, E. J., S. Zakyntinos, F. Baziaka, E. Papadomichelakis, S. Vitzili, P. Koutoukas, A. Armaganidis, H. Giamarellou, and C. Roussos. 2006. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 as an anti-inflammatory mediator in sepsis. *Intensive Care Med* 32:237-243.
  119. Lu, Y., and L. M. Wahl. 2005. Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKKalpha/NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol* 78:259-265.

120. Shapiro, S. D., D. K. Kobayashi, A. P. Pentland, and H. G. Welgus. 1993. Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matrix. Evidence for enzyme- and substrate-specific responses involving prostaglandin-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 268:8170-8175.
121. Gupta, G. P., D. X. Nguyen, A. C. Chiang, P. D. Bos, J. Y. Kim, C. Nadal, R. R. Gomis, K. Manova-Todorova, and J. Massague. 2007. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446:765-770.
122. Newby, A. C. 2008. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2108-2114.
123. Manicone, A. M., and J. K. McGuire. 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 19:34-41.
124. Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
125. Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March, and R. A. Black. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281-1284.
126. Rovida, E., A. Paccagnini, M. Del Rosso, J. Peschon, and P. Dello Sbarba. 2001. TNF-alpha-converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol* 166:1583-1589.
127. Otto, V. I., E. Damoc, L. N. Cueni, T. Schurpf, R. Frei, S. Ali, N. Callewaert, A. Moise, J. A. Leary, G. Folkers, and M. Przybylski. 2006. N-glycan structures and N-glycosylation sites of mouse soluble intercellular adhesion molecule-1 revealed by MALDI-TOF and FTICR mass spectrometry. *Glycobiology* 16:1033-1044.
128. Figueras-Aloy, J., L. Gomez-Lopez, J. M. Rodriguez-Miguel, M. D. Salvia-Roiges, I. Jordan-Garcia, I. Ferrer-Codina, X. Carbonell-Estrany, and R. Jimenez-Gonzalez. 2007. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 24:331-338.
129. Garton, K. J., P. J. Gough, J. Philalay, P. T. Wille, C. P. Blobel, R. H. Whitehead, P. J. Dempsey, and E. W. Raines. 2003. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem* 278:37459-37464.
130. Eugenin, E. A., R. Gamss, C. Buckner, D. Buono, R. S. Klein, E. E. Schoenbaum, T. M. Calderon, and J. W. Berman. 2006. Shedding of PECAM-1 during HIV infection: a potential role for soluble PECAM-1 in the pathogenesis of NeuroAIDS. *J Leukoc Biol* 79:444-452.
131. Ilan, N., A. Mohsenin, L. Cheung, and J. A. Madri. 2001. PECAM-1 shedding during apoptosis generates a membrane-anchored truncated molecule with unique signaling characteristics. *FASEB J* 15:362-372.
132. Ornatowska, M., A. C. Azim, X. Wang, J. W. Christman, L. Xiao, M. Joo, and R. T. Sadikot. 2007. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4

- signaling in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1377-1384.
133. Chaudhary, A., T. M. Fresquez, and M. J. Naranjo. 2007. Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol Cell Biol* 85:249-256.
  134. Lee, Y. G., B. M. Chain, and J. Y. Cho. 2009. Distinct role of spleen tyrosine kinase in the early phosphorylation of inhibitor of kappaB alpha via activation of the phosphoinositide-3-kinase and Akt pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 41:811-821.
  135. Adib-Conquy, M., C. Adrie, P. Moine, K. Asehnoune, C. Fitting, M. R. Pinsky, J. F. Dhainaut, and J. M. Cavillon. 2000. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1877-1883.
  136. Zimmermann, S., and K. Moelling. 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286:1741-1744.
  137. Rommel, C., B. A. Clarke, S. Zimmermann, L. Nunez, R. Rossmann, K. Reid, K. Moelling, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass. 1999. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286:1738-1741.
  138. Kroening, P. R., T. W. Barnes, L. Pease, A. Limper, H. Kita, and R. Vassallo. 2008. Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways. *J Immunol* 181:1536-1547.
  139. Tang, N., L. Liu, K. Kang, P. K. Mukherjee, M. Takahara, G. Chen, T. S. McCormick, K. D. Cooper, and M. Ghannoum. 2004. Inhibition of monocytic interleukin-12 production by *Candida albicans* via selective activation of ERK mitogen-activated protein kinase. *Infect Immun* 72:2513-2520.
  140. Goodridge, H. S., W. Harnett, F. Y. Liew, and M. M. Harnett. 2003. Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses. *Immunology* 109:415-425.
  141. Sharif, O., and S. Knapp. 2008. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology* 213:701-713.
  142. Bowling, W. M., D. G. Hafenrichter, M. W. Flye, and M. P. Callery. 1995. Endotoxin tolerance alters phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol-3'-kinase expression in peritoneal macrophages. *J Surg Res* 58:592-598.
  143. Turnbull, I. R., J. E. McDunn, T. Takai, R. R. Townsend, J. P. Cobb, and M. Colonna. 2005. DAP12 (KARAP) amplifies inflammation and increases mortality from endotoxemia and septic peritonitis. *J Exp Med* 202:363-369.
  144. Turnbull, I. R., and M. Colonna. 2007. Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* 7:155-161.
  145. Elborn, J. S., D. Norman, F. M. Delamere, and D. J. Shale. 1992. In vitro tumor necrosis factor-alpha secretion by monocytes from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:207-211.
  146. Jaresova, I., D. Rozkova, R. Spisek, A. Janda, J. Brazova, and A. Sediva. 2007. Kinetics of Toll-like receptor-4 splice variants expression in lipopolysaccharide-stimulated antigen presenting cells of healthy donors and patients with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 9:1359-1367.

147. Massengale, A. R., F. Quinn, Jr., J. Yankaskas, D. Weissman, W. T. McClellan, C. Cuff, and S. C. Aronoff. 1999. Reduced interleukin-8 production by cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1073-1080.
148. Hartl, D., P. Latzin, P. Hordijk, V. Marcos, C. Rudolph, M. Woischnik, S. Krauss-Etschmann, B. Koller, D. Reinhardt, A. A. Roscher, D. Roos, and M. Griese. 2007. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med* 13:1423-1430.
149. Norman, D., J. S. Elborn, S. M. Cordon, R. J. Rayner, M. S. Wiseman, E. J. Hiller, and D. J. Shale. 1991. Plasma tumour necrosis factor alpha in cystic fibrosis. *Thorax* 46:91-95.
150. Muir, A., G. Soong, S. Sokol, B. Reddy, M. I. Gomez, A. Van Heeckeren, and A. Prince. 2004. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:777-783.
151. Dehus, O., T. Hartung, and C. Hermann. 2006. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with Limulus amoebocyte lysate assay. *J Endotoxin Res* 12:171-180.
152. Xu, Y., J. C. Clark, B. J. Aronow, C. R. Dey, C. Liu, J. L. Wooldridge, and J. A. Whitsett. 2003. Transcriptional adaptation to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficiency. *J Biol Chem* 278:7674-7682.
153. Yang, Z., N. Wara-Aswapati, C. Chen, J. Tsukada, and P. E. Auron. 2000. NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. *J Biol Chem* 275:21272-21277.
154. Henkel, G. W., S. R. McKercher, and R. A. Maki. 2002. Identification of three genes up-regulated in PU.1 rescued monocytic precursor cells. *Int Immunol* 14:723-732.
155. Schoni, M. H., F. Schoni-Affolter, D. Jeffery, and S. Katz. 1987. Intracellular free calcium levels in mononuclear cells of patients with cystic fibrosis and normal controls. *Cell Calcium* 8:53-63.
156. Guggino, W. B., and B. A. Stanton. 2006. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:426-436.

### 7.1 Artículos publicados con el presente trabajo

1. **Gomez-Pina, V.**, A. Soares-Schanoski, A. Rodriguez-Rojas, C. Del Fresno, F. Garcia, M. T. Vallejo-Cremades, I. Fernandez-Ruiz, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2007. Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *J Immunol* 179:4065-4073.
2. **Gomez-Pina, V.** del Fresno, C., V. Lores, A. Soares-Schanoski, I. Fernandez-Ruiz, B. Rojo, R. Alvarez-Sala, E. Caballero-Garrido, F. Garcia, T. Veliz, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, F. Garcia-Rio, and E. Lopez-Collazo. 2008. Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. *PLoS ONE* 3:e2667.
3. del Fresno, C., García-Rio, F., **Gómez-Piña, V.**, Soares-Schanoski A., Fernández-Ruíz, I., Jurado, T, Kajiji, T., Shu, C., Marín, E., Gutierrez del Arroyo, A., Prados, C., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., Biswas S.K., López-Collazo, E. aceptado pendiente de publicación. 2009. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identify LPS-tolerant human monocytes: Demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J immunol.* *En prensa.*



## 7.2 Artículos adicionales publicados en el desarrollo del presente trabajo.

1. Bru, A., C. del Fresno, A. Soares-Schanoski, S. Albertos, I. Bru, A. Porres, E. Rollan-Landeras, A. Dopazo, D. Casero, **V. Gomez-Pina**, L. Garcia, F. Arnalich, R. Alvarez, A. Rodriguez-Rojas, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2007. Position-dependent expression of GADD45alpha in rat brain tumours. *Med Oncol* 24:436-444.
2. del Fresno, C., L. Soler-Rangel, A. Soares-Schanoski, **V. Gomez-Pina**, M. C. Gonzalez-Leon, L. Gomez-Garcia, E. Mendoza-Barbera, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res* 13:39-52.
3. Gonzalez-Leon, M. C., A. Soares-Schanoski, C. del Fresno, A. Cimadevila, **V. Gomez-Pina**, E. Mendoza-Barbera, F. Garcia, E. Marin, F. Arnalich, P. Fuentes-Prior, and E. Lopez-Collazo. 2006. Nitric oxide induces SOCS-1 expression in human monocytes in a TNF-alpha-dependent manner. *J Endotoxin Res* 12:296-306.
4. Soares-Schanoski, A., **V. Gomez-Pina**, C. del Fresno, A. Rodriguez-Rojas, F. Garcia, A. Glaria, M. Sanchez, M. T. Vallejo-Cremades, R. Baos, P. Fuentes-Prior, F. Arnalich, and E. Lopez-Collazo. 2007. 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: a putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *J Leukoc Biol* 82:700-709.