

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES TIPO “TOLL” EN EL
RECONOCIMIENTO DE LÍPIDOS ASOCIADOS EN PARTÍCULAS
LIPÍDICAS**

TESIS

**QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**PRESENTA:
M. en C. LUIS ESPAÑA MEJÍA**

**DIRECTOR DE TESIS
Dra. María Isabel Baeza Ramírez**



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biomenbranas del departamento de Bioquímica de la ENCB-IPN bajo la dirección de la Dra. María Isabel Baeza Ramírez.

Las líneas celulares HEK-293h-TLR4, HEK-293h-TLR2/6, HEK-293h-TLR5, HEK-293h-TLR8 fueron donadas por el proyecto del Factor de Transferencia a cargo del Dr. Sergio Estrada Parra.

Las Polimixina B y el LPS utilizados en este trabajo fueron donados por la Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García del departamento de Inmunología.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de enero de 2006 a diciembre de 2010 con el número de becario 181215

El programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional durante los periodos Febrero – Junio 2006, Febrero – Diciembre 2007, enero – diciembre 2008 y enero – junio 2009.

Abreviaturas	I
Índice de figuras	II
Índice de tablas	III
Resumen	IV
Abstract	V
I INTRODUCCIÓN	1
I.1.- El síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SAAF)	1
I.2.- Factores predisponentes del SAAF	4
a).- Infecciones y el SAAF	5
b).- Fármacos y el SAAF	5
c).- Vacunas y el SAAF	6
I.3.- El lupus eritematoso sistémico	6
I.4.- Prevalencia del LES	7
I.5.- Autoinmunidad y trastornos sistémicos en el LES	7
I.6.- Marcadores genéticos del LES	8
I.7.- Factores hormonales y ambientales en el desarrollo del LES	8
I.8.- Anticuerpos anti-partículas lipídicas y su relación con el LES	10
I.9.- Eventos de la respuesta inmune y su posible participación en la producción de anticuerpos anti-partículas lipídicas	13
1.10.- Justificación	24
1.11.- Hipótesis	24
1.12.- Objetivo general	24
1.13.- Objetivos particulares	24
II MATERIAL Y MÉTODOS	26
II. 1.- Diseño experimental general	26
II.2.- Preparación de liposomas	27
II.3.- Inducción de partículas lipídicas en los liposomas	27
II.4.- Análisis por citofluorometría de las asociaciones moleculares lipídicas	27
II.5.- Cultivos celulares de HEK-293h que expresan un TLR	28
II.6.- Determinación de la citotoxicidad de los inductores de partículas	28

	lipídicas: manganeso, cloropromacina y procainamida; así como de liposomas solos a con partículas lipídicas en cultivos de células HEK-n 293h que expresan un TLR	
	II.7.- Inducción de IL-8 en los cultivos celulares	29
	II.8.- Detección de IL-8 en los sobrenadantes de los cultivos celulares	29
	II.9.- Transformación genética de Escherichia coli GT120	31
	II.10.- Aislamiento y purificación del DNA plásmidico	32
	II.11.- Caracterización estructural del DNA plásmidico p_NiFty-Luc por electroforesis en geles de agarosa	34
	II.12.- Preparación de lipocomplejos con Lipofectamina y el plásmido pNiFty-Luc	34
	II.13.-Transfección genética mediada por lipocomplejos de Lipofectamina-pNiFty-Luc de células HEK-293h que expresan un receptor tipo Toll	34
	II.14.- Determinación de la transfección genética de células HEK-293h que expresan un receptor tipo Toll por la expresión de luciferina-luciferasa	35
III	RESULTADOS	36
	III.1.-Inducción de partículas lipídicas en liposomas con cloropromacina, procainamida y MnCl ₂	36
	III.2.- Determinación de la citotoxicidad de los inductores y de los liposomas con partículas lipídicas inducidas con cloropromacina, procainamida y manganeso en cultivos de células HEK-293h	41
	III.3.- Determinación del reconocimiento de partículas lipídicas por los TLR's por la producción de IL-8	48
	III.4.- Aislamiento y purificación del plásmido pNiFty-Luc	54
	III.5.- Determinación del reconocimiento de partículas lipídicas por los TLR's por la activación de NF-kB	55
IV	Discusión	60
V	Conclusiones	69
VI	Perspectivas	70
VII	Bibliografía	71

ABREVIATURAS UTILIZADAS

LES	Lupus eritematoso sistémico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirido
SAAF	Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos
β_2 -gpl	β_2 -glicoproteína I
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
GPL	Anticuerpos antifosfolípidos del isotipo IgG
MPL	Anticuerpos antifosfolípidos del isotipo IgM
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
MHC	Major histocompatibility complex; complejo principal de histocompatibilidad
PRR's	patter-recognition receptors
PAMP's	Pathogen-associated molecular pattern
TLR	Toll like receptor
LPS	Lipopolisacárido
LBP	LPS-binding protein; proteína de enlace al LPS
NF- κ B	Nuclear factor kappa B; factor nuclear kappa B

INDICE DE FIGURAS

		Número de página
Figura 1	Esquema de la formación de partículas lipídicas en liposomas.	11
Figura 2	Estructura general de los TLR.	15
Figura 3	Esquema del reconocimiento de moléculas exógenas y endógenas por el TLR4.	17
Figura 4	Reconocimiento del LPS por el TLR4 y cascada de señalización que se activa.	18
Figura 5	Estructura química del lípido A del LPS y esquemas del lípido A.	19
Figura 6	Estructura química del LPS y de un lípido cónico y esquema de un liposoma.	20
Figura 7	Representación del reconocimiento de moléculas por receptores tipo Toll (TLR) y de la producción de anticuerpos.	22
Figura 8	Representación esquemática del posible reconocimiento de partículas lipídicas por receptores tipo Toll (TLR).	23
Figura 9	Reconocimiento de partículas lipídicas por células HEK-293hTLR4.	30
Figura 10	Mapa del plásmido pNiFty-Luc.	33
Figura 11	Efecto del Mn^{2+} en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1).	38
Figura 12	Efecto de la clorpromacina en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1).	39
Figura 13	Efecto de la procainamida en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1).	40
Figura 14	Efecto de liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} , del LPS y de LPS + polimixina B ⁺ sobre cultivos de células HEK-293hTLR4	43
Figura 15	Efecto de los agonistas FSL1 y HKLM y de liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} sobre cultivos de células HEK-293hTLR2/6.	44
Figura 16	Efecto del LPS, flagelina y de liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} sobre cultivos de células HEK-293hTLR5.5	45

Figura 17	Efecto del LPS, ssRNS40 y liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} sobre cultivos de células HEK-293hTLR8.	46
Figura 18	Efecto de las diferentes PAMP's y de liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} sobre cultivos de células HEK-293.	47
Figura 19	Curva tipo para la determinación de IL-8.	49
Figura 20	Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293hTLR4.	50
Figura 21	Efecto de la polimixina B en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) con Mn^{2+} .	51
Figura 22	Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293hTLR2/6.	51
Figura 23	Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293hTLR5.	52
Figura 24	Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293HTLR8.	52
Figura 25	Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293.	53
Figura 26	Electroferograma del plásmido pNiFty-luc.	54
Figura 27	Activación de NF- κ B en la línea celular HEK-293hTLR4.	56
Figura 28	Activación de NF- κ B en la línea celular HEK-293hTLR2/6.	56
Figura 29	Activación de NF- κ B en la línea celular HEK-293hTLR5.	57
Figura 30	Activación de NF- κ B en la línea celular HEK-293hTLR8.	58
Figura 31	Esquema del TLR4, del lípido A y de los lípidos asociados en partículas lipídicas.	65

INDICE DE TABLAS

	Número de página
Tabla 1	Clasificación del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. 2
Tabla 2	Criterios para el diagnóstico del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. 3
Tabla 3	Localización, organismo en donde se encuentran y ligandos más comunes de los TLR. 16

RESUMEN|

Los fosfolípidos aniónicos pueden adoptar asociaciones moleculares diferentes a la de bicapa que es la que integra la matriz de las membranas celulares. Estas asociaciones moleculares, o partículas lipídicas, son transitorias, por microscopía electrónica se observan como protuberancias sobre la superficie lisa de la bicapa; al hacerse permanentes, inducen la formación de anticuerpos anti-partículas que participan en el desarrollo de una enfermedad autoinmune en ratones parecida al lupus humano. Adicionalmente, se han detectado anticuerpos anti-partículas en sueros de pacientes con LES y LES secundario al SAAF. Por lo que es importante determinar el mecanismo de reconocimiento de los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas por el sistema inmunitario, tanto porque es un mecanismo que reconoce a moléculas de fosfolípidos que se encuentran en una asociación tridimensional específica, como por la participación de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el desarrollo de una enfermedad autoinmune en el ratón y posiblemente en el humano.

Para analizar los mecanismos que llevan al reconocimiento del arreglo tridimensional de fosfolípidos en partículas lipídicas, se estudió el papel de los receptores tipo Toll. Se analizaron TLR que se expresan en la membrana celular como TLR2/6, TLR4, y TLR5, así como el endosomal TLR8. Como el TLR4 reconoce las regiones no-polares de sus ligandos, en particular la región de cadenas hidrocarbonadas del lípido A del LPS bacteriano, consideramos que pueda participar en el reconocimiento de las regiones no-polares hidrocarbonadas de los fosfolípidos en partículas lipídicas. El dímero TLR2/6 reconoce entre otros ligandos a lipoproteínas y a lipoarabinomana de origen bacteriano, por lo que es posible que también participe en este reconocimiento. Como controles negativos se consideraron el TLR5 que tiene como ligando natural la flagelina de bacterias gram negativas y el TLR8 que reconoce RNA de una cadena de origen viral. El reconocimiento de las partículas lipídicas por los TLR's se determinó por la activación de NF- κ B y por la producción de IL-8 por las células HEK-293 que expresan un solo TLR.

El TLR4 de las células HEK-293hTLR4 reconoció a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas en liposomas. La producción de IL-8 resultante del reconocimiento de partículas lipídicas fue prácticamente igual a la obtenida con el LPS, el reconocimiento medido por la activación de NF- κ B fue 30% mayor con partículas lipídicas con respecto al LPS. El antibiótico polimixina B que inhibe el reconocimiento del LPS por TLR4, también inhibió el reconocimiento de las partículas lipídicas por este receptor. Así mismo, se demostró que las partículas lipídicas permanecen en los liposomas en presencia de la polimixina B, por lo que la inhibición del reconocimiento de las partículas en presencia de este antibiótico posiblemente es similar al que ocurre con el LPS y no porque las partículas lipídicas cambien a la asociación de bicapa en presencia del antibiótico. La demostración de que los liposomas con o sin Mn²⁺ no están contaminados con LPS (con base en la prueba de Lymulus), es un fuerte apoyo al reconocimiento de las partículas lipídicas por el TLR4. Los TLR2/6, TLR5 y TLR8 de las células HEK-293hTLR2/6, HEK-293hTLR5 y HEK-293hTLR8 no reconocieron a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas.

Estos hallazgos nos permiten concluir que la región de cadenas hidrocarbonadas no-polares de los fosfolípidos de la micela invertida de la partícula, comparte un arreglo tridimensional parecido a la región no-polar cónica de las cadenas hidrocarbonadas del lípido A, y este arreglo tridimensional hidrofóbico y de forma cónica es el reconocido por el TLR4 de las células HEK-293hTLR4.

ABSTRACT

Anionic phospholipids can adopt molecular arrangements different to the bilayer which is the arrangement of the lipids in the matrix of cell membranes. These molecular arrangements, or lipidic particles, are transient and by electron microscopy appear as protuberances on the smooth surface of the bilayer. When lipidic particles are stabilized they induce the production of anti-lipidic particle antibodies, which participate in the development of an autoimmune-like disease resembling human lupus. Additionally, it had been detected anti-lipidic particle antibodies in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and SLE secondary to the antiphospholipid syndrome. Thus, it is important to determine the mechanism of the recognition of the phospholipids in the association of lipidic particles by the immune system, both, because it is a mechanism that will recognize a tridimensional association of molecules of phospholipids, as well as by the participation of the anti-lipidic particle antibodies in the development of an autoimmune disease in the mice and probably in the human.

In order to analyze the mechanisms of the recognition of the tridimensional arrangement of the phospholipids in the lipidic particles, it was studied the role of the Toll-like receptors, specially of the cell membrane receptors TLR2/6, TLR4, and TLR5, as well as the endosomal TLR8. Insofar as TLR4 can recognize the non-polar regions of their ligands, in particular the region of the hydrocarbon chains of the lipid A of the bacterial LPS, we considered that it can also participate in the recognition of the non-polar hydrocarbon chains of the phospholipids associated in lipidic particles. The dimer TLR2/6 recognizes among other ligands lipoproteins and lipoarabinomannan thus it is also possible that it can recognize to lipidic particles. As negative controls it was considered to TLR5 and TLR8 because they have to flagellin and viral RNA as ligands, respectively. The recognition of lipidic particles by the TLR's was determined through the activation of NF- κ B and by the production of IL-8 by the HEK-293 cells which expressed only one TLR.

The TLR4 of the HEK-293hTLR4 cells recognizes to the phospholipids associated in lipidic particles in liposomes. The production of IL-8 after the recognition of lipidic particles was very similar to that attained with LPS; however, the activation of NF- κ B was 45% higher with lipidic particles than that with LPS. The antibiotic polymyxin B which produces the inhibition of the recognition of LPS by TLR4, also is an inhibitor of the binding of lipidic particles with this receptor. In addition, it was demonstrated that the lipidic particles do not disappear in the presence of polymyxin B, then the polymyxin B inhibition of the binding of these particles with TLR4 possibly is similar to the inhibition of the binding between LPS and TLR4. The demonstration that the liposomes with or without Mn²⁺ are not contaminated with LPS (using the **Lymulus** method) is a strong support to the recognition of lipidic particles by the TLR4. Also it was demonstrated that TLR2/6, TLR5 and TLR8 of the cells HEK-293hTLR2/6, HEK-293hTLR5 and HEK-293hTLR8 do not show any recognition of the phospholipids associated in lipidic particles.

These findings let us to conclude that the non-polar hydrocarbon chains of the phospholipids of the inverted micelle of the particles have a tridimensional arrangement similar to the conic non-polar hydrocarbon chains of the lipid A, and that this hydrophobic and conic tridimensional arrangement is recognized by the TLR4 of the HEK-293hTLR4 cells.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha descrito un modelo de lupus en ratones BALB/c y NIH, desarrollado por fosfolípidos asociados en partículas lipídicas, y se han detectado anticuerpos anti-partículas lipídicas en el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) (Aguilar *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006); sin embargo, hasta al presente no se conocen los mecanismos que llevan a la producción de anticuerpos contra el arreglo molecular tridimensional de los fosfolípidos en partículas lipídicas. Por lo que en este trabajo se analizará la primera etapa que llevaría a la producción de dichos anticuerpos, es decir los receptores en las células presentadoras de antígenos que reconozcan a los fosfolípidos en la asociación de partículas lipídicas.

I.1.- El síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SAAF).

El SAAF es un desorden autoinmune, en donde se presenta trombosis arterial y/o venosa, pérdida fetal recurrente, así como otras manifestaciones obstétricas, desordenes neurológicos, manifestaciones intra-abdominales, y la presencia de anticuerpos antifosfolípidos (Fisher *et al.*, 2007; Shoenfeld *et al.*, 2008; Gresele *et al.*, 2009; Gigante *et al.*, 2009; Raj *et al.*, 2010).

El SAAF puede estar asociado con enfermedades autoinmunes como el LES, con enfermedades parecidas al lupus inducidas por fármacos como la promacina, la cloropromacina, quinina y la procainamida, entre otros, o con enfermedades infecciosas como el SIDA, o la hepatitis C y con neoplasias (Tabla 1) (Asherson *et al.*, 1996; Franchini y Veneri, 2005; Séne *et al.*, 2008). Adicionalmente, hay otras variantes del síndrome como el generalizado o “catastrófico” e incluso aquel en donde no se detectan anticuerpos antifosfolípidos (Lockshin, 2006) (Tabla 1).

El diagnóstico del SAAF está basado en criterios clínicos, como recurrencia de la pérdida fetal y presencia de trombosis; así como en criterios de laboratorio, como la detección de anticoagulante lúpico, de anticuerpos anti-cardiolipina y anti- β_2 -glicoproteína I (β_2 -gpl) en dos o más ocasiones con una diferencia al menos de 12 semanas. Estos criterios fueron aprobados en el consenso de Sapporo en 2006 sobre la

clasificación del SAAF (Tabla 2) (Miyakis *et al.*, 2006; Ieko *et al.*, 2010), y deben tomarse como una guía para facilitar estudios epidemiológicos, la implementación de nuevos tratamientos o establecer un diagnóstico para este síndrome. Esto debido a que pacientes con SAAF a menudo presentan diversas características clínicas como trombocitopenia, livedo reticularis, lesiones en válvulas cardíacas o nefropatías, que no son parte de los criterios establecidos en Sapporo. Además, de los anticuerpos anticoagulante lúpico, anti-cardiolipina y anti- β_2 -gpl, se han detectado anticuerpos contra proteínas como la protrombina ó contra otros fosfolípidos, que no son considerados en esos criterios (Levine *et al.*, 2002; Carter *et al.*, 2004; Miyakis *et al.*, 2006; Baker y Bick, 2008; Meroni, 2008; Gigante, *et al.*, 2009; Lim, 2009).

Tabla 1.- Clasificación del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. (Asherson *et al.*, 1996).

I.- Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. Se presentan anticuerpos antifosfolípidos, trombosis, trombocitopenia y complicaciones obstétricas.]

II.- Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos asociado a otras enfermedades.

A.- Enfermedades autoinmunes.

a. Enfermedades del tejido conectivo: LES, lupus discoide, artritis reumatoide, vasculitis, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica.

b.- Otras enfermedades: Diabetes mellitus, enfermedad de Crohn, enfermedad autoinmune tiroidea.

B.- Enfermedades malignas.

a.- Tumores sólidos: Carcinomas en diferentes órganos; pulmón, riñón, ovario, cerviz, próstata.

b.- Enfermedades hematológicas: Linfomas, leucemia, macroglobulinemia de Waldenström, desórdenes mieloproliferativos.

C.- Inducido por ingesta de fármacos: Procainamida, fenotiazinas, clorpromacina, promacina, fenitoína anticonceptivos orales, interferón alfa, quinina, quinidina, hidralazina.

D.- Enfermedades infecciosas: Sífilis, infección por el virus de inmunodeficiencia adquirida, Malaria.

III.- Otras variantes del síndrome de antifosfolípidos.

A.- Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos generalizado o "catastrófico".

B.- Otros síndromes microangiopáticos: Púrpura trombótica trombocitopénica, síndrome urémico hemolítico.

C.- Síndrome hipoprotrombinémico.

D.- Coagulación intravascular diseminada.

IV.- Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos seronegativo.

Los anticuerpos antifosfolípidos descritos en el SAAF son muy heterogéneos y en general pertenecen a tres grupos: los anti-cardiolipina, los anticoagulantes y los anti-partículas lipídicas. Su detección se basa en el método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay); así como en pruebas para determinar el tiempo de coagulación (Hanly, 2003; Galli, 2004; de Laat *et al.*, 2008; Shoenfeld *et al.*, 2008). Los anti-partículas lipídicas se determinan por los métodos de ELISA y de citofluorometría descritos en este laboratorio (Aguilar *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 2004).

- Anticuerpos anti-cardiolipina. Reaccionan con diferentes fosfolípidos además de cardiolipina. Muestran reactividad con un complejo de fosfolípidos aniónicos y la proteína plasmática β_2 -gpl o incluso con la β_2 -gpl sola en lugar de con fosfolípidos (López-Lira *et al.*, 2005; Chen y Giles 2010). Se asocian con el incremento en el riesgo de trombosis arterial, con isquemia coronaria y enfermedades cerebrales.

Tabla 2.- Criterios para el diagnóstico del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. (Lockshin, 2006; Miyakis *et al.*, 2006).

Criterios clínicos.

Trombosis vascular.

- Uno o más episodios de trombosis arterial, venosa o de capilares sanguíneos, en algún órgano o tejido. La trombosis debe ser confirmada por estudios apropiados de imagenología o de histopatología.

Pérdida fetal.

- Uno o más abortos inexplicables de fetos de mas de diez semanas de gestación, con morfología fetal normal, confirmada por ultrasonido o por exploración directa del feto.
- Una o más partos de menos de 34 semanas de gestación debido a pre-clampsia severa o eclampsia, o insuficiencia severa placentaria.
- Tres o más abortos consecutivos de fetos de menos de 10 semanas de gestación, en donde se descarten anomalías anatómicas u hormonales de la madre y cromosómicas maternas como paternas.

Criterios de laboratorio.

- Presencia de anticuagulante lúpico en plasma en dos o más ocasiones en menos de 12 semanas.
- Detección de anticuerpos anti-cardiolipina de los isotipos IgG y/o IgM en plasma o suero, con títulos por arriba de 40 GPL U/mL (anticuerpos antifosfolípidos del isotipo IgG) ó MPL (anticuerpos antifosfolípidos del isotipo IgM), al menos en dos o más ocasiones, en menos de 12 semanas.
- Presencia en plasma o suero de títulos elevados de anticuerpos anti- β_2 -gpl de los isotipos IgG y/o IgM en dos o más ocasiones, en menos de 12 semanas.

Llama la atención la presencia de anticuerpos anti-cardiolipina en el suero de pacientes con SAAF, ya que la cardiolipina forma parte de la membrana interna de las mitocondrias; por lo cual no es un antígeno expuesto en la superficie celular que pueda inducir la producción de anticuerpos. Este fosfolípido es importante en procesos metabólicos en la membrana mitocondrial, como la síntesis de ATP, la translocación de ADP/ATP, y el transporte de electrones en la cadena respiratoria (Doménech *et al.*, 2006; Baeza *et al.*, 2007).

- Anticuerpos anticoagulantes. Prolongan el tiempo de coagulación al interferir con las reacciones dependientes de fosfolípidos de la cascada de la coagulación (Asherson *et al.*, 1996); pueden ser de los isotipos IgG o IgM (McNeil *et al.*, 1990; Alarcón-Segovia y Cabral, 1992; Asherson *et al.*, 1996; Asherson, 2005; Quenhenberger y Wagner, 2005).

- Anticuerpos anti-partículas lipídicas. Identifican fosfolípidos en asociaciones moleculares diferentes a la bicapa de la matriz membranal o partículas lipídicas. Fueron descritos por primera vez en este laboratorio en sueros de pacientes con LES (Aguilar *et al.*, 1999).

Adicionalmente, se han detectado anticuerpos diferentes a los anti-cardiolipina, que reconocen fosfatidilcolina, o fosfatidiletanolamina asociada a proteínas y los anticoagulantes que reconocen fosfatidilserina asociada con protrombina, proteína C, proteína S o con anexina V (McNeil *et al.*, 1990; de Laat *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2010).

I.2.- Factores predisponentes del SAAF.

La etiología del SAAF es multifactorial ya que requiere de una combinación de factores ambientales y genéticos que influyen en la aparición y desarrollo de la enfermedad en personas susceptibles (Levy *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2008).

a).- Infecciones y el SAAF.

En años recientes se ha puesto de manifiesto que las infecciones causadas por bacterias, virus o parásitos juegan un papel central en la patogenia del síndrome. Estos agentes etiológicos promueven la producción de anticuerpos antifosfolípidos en personas genéticamente predispuestas, por los siguientes mecanismos (Levy *et al.*, 2006; Abbas *et al.*, 2007):

- Algunas proteínas de los microorganismos pueden actuar como activadores de linfocitos T y B. La estimulación de linfocitos T tiene como efecto la síntesis elevada de IL-1, TNF α , IL-2 y leucotrienos, que causan alteraciones en la homeostasia del sistema inmunitario y son responsables del choque séptico en humanos. La activación extrema de los linfocitos T también puede provocar su autodestrucción y la anergia celular que resulta de ello.
- La sobreproducción de citocinas Th1 que incrementa la expresión de moléculas MHC clase II, así como el aumento en el número de moléculas coestimuladoras: CD40L y STAT4 que generan pérdida de la autotolerancia y la consiguiente respuesta inmunitaria contra antígenos propios que lleva a un estado patológico.
- La exposición de antígenos ocultos durante el proceso de necrosis o de apoptosis celular que lleva a la producción de autoanticuerpos.
- El mimetismo molecular en enfermedades como alergias, encefalomiелitis y uveitis, es un mecanismo importante entre infección y enfermedad autoinmune; ya que algunas proteínas bacterianas presentan una alta similitud con la β_2 -gpl, por lo que se induce la producción de anticuerpos anti- β_2 -gpl seguido de manifestaciones del SAAF.

b).- Fármacos y el SAAF.

La administración crónica de algunos fármacos induce una enfermedad similar al lupus en personas con predisposición genética. Uno de los mecanismos es a través del sistema enzimático NADPH oxidasa/mieloperoxidasa de neutrófilos y monocitos, que participa en la síntesis de metabolitos reactivos derivados de estos fármacos. Los

metabolitos reactivos se unen a tejidos del paciente con el daño consecuente en los mismos; el hígado por su función en el metabolismo de fármacos es de los más afectados, o en algunos casos producen una respuesta tanto celular como humoral contra dichos derivados (Levy *et al.*, 2006). También se producen autoanticuerpos que guardan gran similitud con los que se producen por otros mecanismos, como aquellos en la respuesta contra los virus (Levy *et al.*, 2006), además se producen anticuerpos antifosfolípidos, sin que se conozca qué induce su formación. Los fármacos asociados con la presencia de anticuerpos antifosfolípidos son: amoxicilina, anti-epilépticos, antihipertensivos (propranolol), hidralazina anti-conceptivos orales, fenotiazinas en especial clorpromacina, antiarrítmicos como procainamida, quinonas como quinina, fármacos inmunoreguladores como el interferón alfa y el infliximab (Lahita, 2002; Kim *et al.*, 2009).

c).- Vacunas y el SAAF.

Se ha informado de numerosos casos de reacciones inmunes adversas a vacunas como contra la hepatitis B o la influenza, en los que han aparecido títulos elevados de anticuerpos antifosfolípidos en especial anti-cardiolipina de los isotipos IgG o IgM, anti- β_2 -gpl y anticoagulante, los que disminuyen a las pocas semanas posterior a la administración de la vacuna (Levy *et al.*, 2006).

Como se ha indicado, las características clínicas y de laboratorio del SAAF son claramente identificadas en diferentes enfermedades autoinmunes una de ellas es el LES (Nojima *et al.*, 2006; Namjou *et al.*, 2007; Lockshin y Derksen, 2008).

I.3.- El lupus eritematoso sistémico.

El LES es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por diversas manifestaciones clínicas y por la producción excesiva de autoanticuerpos entre ellos de anticuerpos antifosfolípidos, los cuales posiblemente están involucrados en los episodios de trombosis arterial y venosa, en la pérdida fetal recurrente y en la trombocitopenia (Mok y Lau, 2003; Tomioka *et al.*, 2008; Woo *et al.*, 2010). El LES no presenta un cuadro

clínico particular, las características, en general incluyen: fiebre, anorexia, pérdida de peso, malestar general y letargia (Tierney *et al.*, 2008). La mayoría de los pacientes tiene lesiones cutáneas en algún momento de la enfermedad, el exantema típico que se presenta en aproximadamente la mitad de los pacientes en la cara tiene forma de “alas de mariposa”. Otras manifestaciones cutáneas son el lupus discoide, lesiones típicas en las puntas de los dedos de las manos, eritema periungeoal, infartos en las uñas y hemorragias en astilla; es común que se presente alopecia (Tierney *et al.*, 2008; Lampropoulos y D´Cruz, 2010). Los síntomas articulares, con o sin sinovitis activa, se presentan en el 90% de los pacientes y a menudo constituyen la manifestación clínica más temprana (Tierney *et al.*, 2008). La etiología del LES es compleja, e intervienen en la aparición y desarrollo de la enfermedad factores hormonales y ambientales, la raza y la carga genética (Hoffman, 2004; Maya *et al.*, 2008; Tierney *et al.*, 2008).

I.4.- Prevalencia del LES.

El LES es predominantemente una enfermedad de mujeres jóvenes, aunque puede aparecer en los extremos de la vida, es decir durante la menarquia y la menopausia; durante los años fértiles la proporción mujer:hombre es de 10:1 (Lahita, 2004). La incidencia del lupus es mayor en la raza negra, en asiáticos y en hispanos, con una prevalencia de 1:250; la enfermedad afecta a 1:2000 mujeres de raza blanca (Harrison *et al.*, 1998).

I.5.- Autoinmunidad y trastornos sistémicos en el LES.

Las lesiones tisulares características del LES ocurren por subgrupos patogénicos de autoanticuerpos. Entre los más frecuentes están los anticuerpos anti-nucleares, anti-plaquetarios, los anti-eritrocitos y los anti-DNA de doble cadena que son específicos del LES. En la actualidad la lista de anticuerpos incluye anticuerpos antifosfolípidos, anti-partículas lipídicas y anti-colágeno del tipo II (Tan *et al.*, 1982; Roit *et al.*, 1998; Baeza *et al.*, 2004). Los inmunocomplejos formados por estos autoanticuerpos y sus antígenos pueden a su vez activar a las células inflamatorias, que secretan citocinas y mediadores de la inflamación, lo que provoca un aumento de la adhesión de los leucocitos al

endotelio, aumento en la permeabilidad vascular y un mayor depósito de inmunocomplejos en las paredes vasculares que agrandan los espacios interendoteliales que amplifican la lesión tisular.

I.6.- Marcadores genéticos del LES.

El LES se asocia a anomalías genéticas específicas, su predisposición depende del polimorfismo genético del MHC clase II, sobre todo de los haplotipos HLA-DR2 y HLA-DR3, estos alelos confieren un riesgo de presentar la enfermedad de dos a cinco veces mayor (Lahita, 2002). La ausencia de algunos alelos del receptor de Fc γ predispone a la adquisición del LES, cuando el receptor Fc γ -RIIA está presente, se obtiene protección en la población afroamericana, que de otro modo desarrollaría lupus con nefritis de graves consecuencias. La síntesis elevada de la proteína ligadora de manosa, de IL-6, de BCL-2 codificada por el gen de leucemia de linfocitos B y la IL-10 se han asociado a la nefritis que se presenta en el LES (Lahita, 2002; Lockshin , 2006; Abbas *et al.*, 2007).

La carencia heredada de componentes del complemento también influye en la predisposición de la enfermedad, en especial de C4A y C4B codificados en el cromosoma 6. Cuando hay déficit de C4A, el 80% de las personas tiene un alto riesgo de desarrollar LES. El lupus se asocia también a deficiencias heredadas de C1Q, C1R/S y C2. En general, la falta de síntesis de componentes del complemento interviene en la aparición del LES, por la acumulación de altas cantidades de antígeno, ya que éstos no pueden ser eliminados (Lahita, 2002; Liphaut y Kiss, 2010).

I.7.- Factores hormonales y ambientales en el desarrollo del LES.

La influencia hormonal es otro factor importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, ya que éstas se presentan después de la menarquía y antes de la menopausia, periodos en los que ocurren variaciones fisiológicas, patológicas o terapéuticas que pueden modificar las concentraciones de estrógeno en suero; entre ellas, los cambios durante el ciclo menstrual, el embarazo, el periodo postparto, el

estrés crónico, citocinas inflamatorias, el uso de corticoesteroides, o de anticonceptivos orales, o de terapias de reemplazo hormonal (Mok y Lau, 2003; Lee *et al.*, 2010).

En pacientes con LES se han documentado alteraciones en la relación andrógenos/estrógenos y alteraciones en el metabolismo del estrógeno que originan un incremento en la hidroxilación del C16, que lleva a un incremento significativo en la concentración de 16 α -hidroxiestróna que tiene actividades de proliferación más potentes que el 17 β -estradiol. En otros casos, concentraciones bajas de andrógenos en plasma en mujeres con LES (testosterona, dihidrotestosterona, dehidroepiandrosterona y sulfato de dihidroepiandrosterona) correlacionan inversamente con la actividad de la enfermedad (Cutolo *et al.*, 2004).

El entorno ambiental parece tener un papel importante en el inicio del LES. Algunos agentes infecciosos se han relacionado en la patogénesis del lupus, entre ellos los virus de la rubéola, de hepatitis C, sarampión y paperas. El mecanismo responsable no es bien conocido, probablemente durante las infecciones ocurre el mimetismo de algunos componentes del organismo con moléculas presentes en los patógenos (Manson y Rahman, 2006; Amital *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

Como se ha indicado, la administración prolongada de algunos fármacos (como clorpromacina, procainamida, quinina e isoniazida) puede inducir un cuadro parecido al lupus. El probable mecanismo de acción de estos fármacos es que, el DNA de los pacientes con LES está hipometilado y que los fármacos provocan la inhibición de la metilación del DNA, lo que ocasiona un aumento en la apoptosis celular que exagera la respuesta autoinmune (Kim *et al.*, 2009). Adicionalmente, el uso continuo de otros productos que contienen aminas aromáticas o sus derivados se ha asociado a la presencia de lupus; por ejemplo, la hidrazina que se encuentra en el tabaco o las soluciones utilizadas para rizar el cabello que contienen estos químicos y al ser absorbidas por el cuero cabelludo pueden exacerbar el lupus (Pickholz *et al.*, 2006).

La exposición a la luz solar es otro factor ambiental que puede inducir o exacerbar tanto el LES como el lupus cutáneo, ya que hasta un 70% de los enfermos padecen fotosensibilidad (Mok y Lau, 2003).

I.8.- Anticuerpos anti-partículas lipídicas y su relación con el LES.

Como se ha indicado los anticuerpos anti-partículas lipídicas fueron detectados por primera vez en este laboratorio en pacientes con LES, estos anticuerpos identifican lípidos en asociaciones moleculares diferentes a la de bicapa de la matriz membranal, que se conocen como partículas lipídicas (Aguilar *et al.*, 1999; Lara, 1999; Baeza *et al.*, 2004). Estas partículas son protuberancias formadas en membranas celulares y en membranas experimentales, como los liposomas, su formación es estimulada por inductores como los fármacos que producen un cuadro parecido al lupus, algunos antibióticos, cationes divalentes y por péptidos no-polares (Figura 1) (Baeza *et al.*, 2004). La asociación de fosfolípidos en partículas lipídicas en membranas celulares o experimentales es transitoria, es decir, no es permanente ya que los fosfolípidos vuelven a reorganizarse en bicapas cuando disminuye la concentración del inductor.

Los fosfolípidos que forman partículas lipídicas son de forma molecular cónica como la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol, el fosfatidato, la fosfatidilserina y la cardiolipina (Cullis y Hope, 1991; Aguilar *et al.*, 1999; Hafez y Cullis, 2001; Baeza *et al.*, 2004). Los arreglos diferentes a la bicapa forman parte del modelo metamórfico para la membrana celular propuesto por Cullis *et al.*, en 1980 (Cullis *et al.*, 1980; Cullis y Hope, 1991) y que ha sido apoyado por los estudios de este laboratorio (Aguilar *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 2004; Baeza *et al.*, 2007).

En el modelo metamórfico se propuso que las partículas lipídicas transitorias se encuentran en las membranas celulares y participan en el transporte de iones y moléculas polares, en la fusión entre membranas, en uniones intercelulares, en señales de activación del metabolismo celular, en la activación de proteínas membranales

(Cullis *et al.*, 1980; Kinnunen *et al.*, 1994) y en este laboratorio se encontró que cuando se hacen permanentes son inmunogénicas (Aguilar *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 2004).

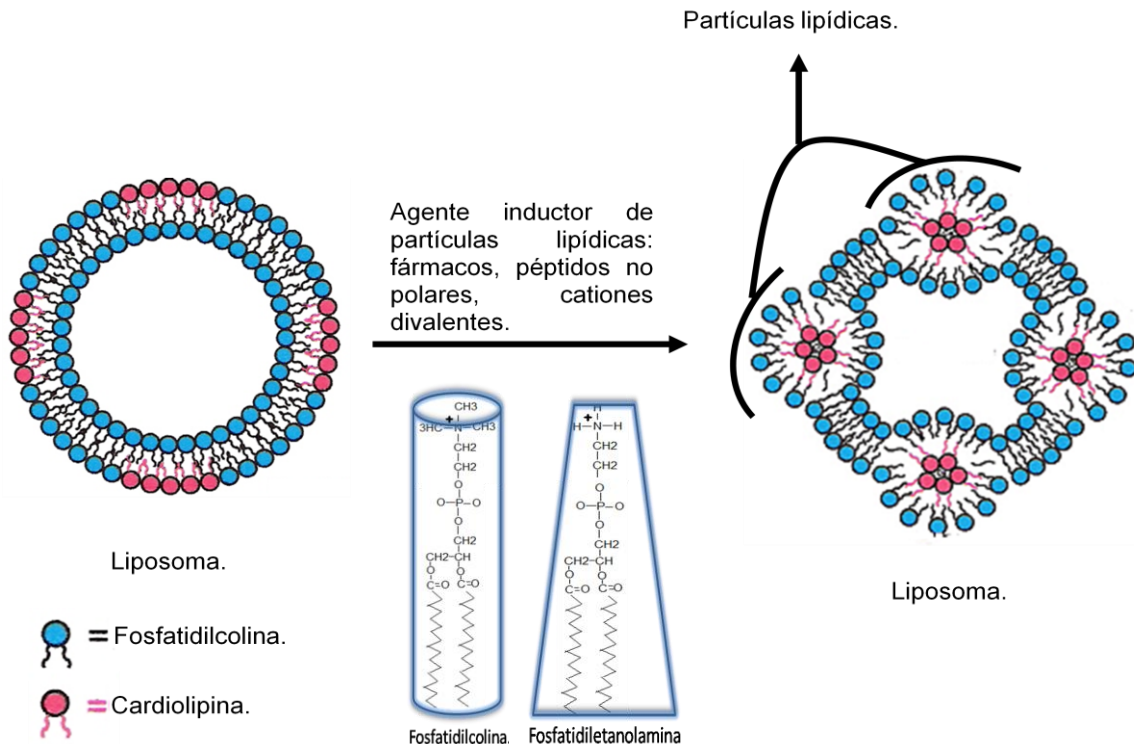


Figura 1.- Esquema de la formación de partículas lipídicas en liposomas. Las micelas invertidas se forman con inductores como el catión divalente Mn^{2+} o los fármacos clorpromacina o procainamida, y la micela invertida se inserta en la bicapa lipídica lo que da lugar a la formación de las partículas lipídicas. La presencia de lípidos de forma molecular cónica como la fosfatidiletanolamina favorecen la formación de partículas lipídicas. La fosfatidilcolina un lípido cilíndrico favorece la formación de bicapas.

Para determinar la participación de anticuerpos anti-partículas en el desarrollo del lupus inducido por fármacos y con base en la propiedad de la clorpromacina y la procainamida de inducir la formación de partículas lipídicas, se propuso la hipótesis de que la administración terapéutica del tranquilizante clorpromacina o del antiarrítmico procainamida podría causar la estabilización de partículas en las membranas celulares de los pacientes, lo que produciría una exposición anormal de dichas estructuras que llevaría a una respuesta inmunológica con la producción de anticuerpos anti-partículas (Baeza *et al.*, 2004).

Esta hipótesis fue probada al administrar los fármacos clorpromacina y procainamida en ratones hembras de la cepa singénica BALB/c. Los fármacos se usaron solos o al

formar partículas lipídicas en liposomas y se emplearon en concentraciones semejantes a las que se usan en el tratamiento de pacientes con alteraciones psicóticas o con arritmias cardíacas (Baeza *et al.*, 2004). Los ratones produjeron anticuerpos con reactividad a los lípidos asociados en partículas lipídicas. Después de cuatro semanas de esta detección se produjeron anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes.

Los ratones presentaron alopecia moderada, lesiones faciales simétricas en forma de “alas de mariposa”, como las descritas en el humano, cuando los ratones recibieron partículas inducidas por procainamida. También presentaron alteraciones en la dermis y la epidermis y depósitos de complejos inmunes entre la dermis y la epidermis en forma similar a la banda lúpica descrita en el humano; así como alteraciones renales y depósitos de complejos inmunes en la pared de los capilares y en el mesangio renal, como en el humano (Baeza *et al.*, 2004).

Esta enfermedad autoinmune también se produjo en ratones no-singénicos NIH hembras. La reproducción del lupus en ratones NIH es muy relevante, ya que estos ratones son una cepa no-singénica que es más parecida a una población genéticamente abierta como la humana. Es importante destacar que en ambos modelos se produjeron primero los anticuerpos anti-partículas y después los anti-cardiolipina, lo que sugiere un papel predominante para los anti-partículas sobre los anti-cardiolipina (Baeza *et al.*, 2004).

Los anticuerpos anti-partículas también se detectaron en sueros de 30 pacientes positivos para anti-cardiolipina (Lara, 1999). De éstos, once fueron en pacientes con LES, doce con SAAF y siete para el SAAF secundario al LES. Como controles negativos se estudiaron sueros de 50 donadores del Banco de Sangre del Hospital de Infectología del Centro Médico La Raza, en donde no se detectaron anticuerpos anti-partículas (Lara, 1999).

En otro estudio de este laboratorio se analizaron 22 sueros de pacientes con LES activo, encontrándose anticuerpos anti-partículas en 19 sueros, de los cuales 15 fueron positivos para anti-cardiolipina. También se analizaron ocho sueros de pacientes con LES inactivo, detectándose anticuerpos anti-partículas sólo en dos de ellos, los ocho sueros fueron negativos a anti-cardiolipina; como control negativo se analizaron 20 sueros de donadores (España, 2005).

El encontrar anticuerpos anti-partículas en los 30 pacientes con LES y/o con SAAF, al igual que en 19 con LES activo y en dos con LES inactivo y no en los 70 sueros de donadores sin LES o SAAF, sugiere fuertemente, junto con los modelos de lupus en ratones, la participación de los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas y de los anticuerpos anti-partículas en el desarrollo de algunas de las enfermedades del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos humano.

Como se ha indicado, hasta al presente no se conocen los mecanismos que llevan a la producción de anticuerpos contra el arreglo tridimensional de los fosfolípidos en partículas lipídicas. A continuación se describen algunos de los mecanismos que están involucrados en la respuesta inmune humoral y que podrían estar relacionados con la producción de los anticuerpos anti-partículas lipídicas.

I.9.- Eventos de la respuesta inmunitaria y su posible participación en la producción de anticuerpos anti-partículas lipídicas

Los microorganismos que han pasado las barreras epiteliales y penetraron en los tejidos del hospedero son reconocidos principalmente por células dendríticas y por macrófagos, ambos expresan receptores de membrana como los de manosa, los carroñeros y los tipo Toll (TLR); estos últimos reconocen a moléculas microbianas y a algunas moléculas propias o endógenas o DAMP (damage associated molecular patterns). Las células dendríticas residen en los epitelios de la piel y de los aparatos digestivo y respiratorio, que son los principales sitios a través de los que penetran microorganismos patógenos.

Los TLR son el grupo más grande de PRR's (patter-recognition receptors) y actúan como receptores de patrones de moléculas de superficie denominadas PAMP("Pathogen-Associated Molecular Pattern") que se encuentran altamente conservadas en protozoarios, bacterias, hongos y virus; los TLR estimulan la respuesta inmune innata frente a microorganismos que expresan los PAMP (Földes *et al.*, 2010). Los TLR actúan en alertar al organismo de una posible infección, por lo que se lleva a cabo la activación de la respuesta inflamatoria y la producción de citocinas, interferones del grupo I, quimiocinas, moléculas de superficie celular y receptores quimiotácticos, que precede a la inducción de la respuesta inmune adaptativa (Krishnan *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2008). De la misma forma se incrementan las funciones de las células fagocíticas que aumentan su propiedad de presentar antígenos microbianos a las células T (Saitoh *et al.*, 2004; Krishnan *et al.*, 2007).

Los TLR se encuentran altamente conservados a través de la evolución, se han descubierto incluso en organismos muy sencillos como las esponjas de mar (Wiens *et al.*, 2005). La primera proteína identificada fue la proteína Toll de *Drosophila* que participa en el establecimiento del eje dorso-ventral durante la embriogénesis ia de la mosca, así como en la respuesta anti-microbiana del insecto (Oviedo *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2007; Sabroe *et al.*, 2008). En la actualidad se han reconocido 13 TLR en mamíferos, en el humano se han descrito los TLR 1 al 11 y en el ratón del 1 al 9 y del 11 al 13 (Rojas-Espinosa, 2006; Abbas *et al.*, 2007; Balmelli *et al.*, 2008; Papadimitraki *et al.*, 2007). Los TLR pertenecen a la superfamilia de receptores Toll/IL1 (TIR), en general contienen de 19 a 25 repeticiones ricas en leucina y un dominio rico en cisteína en su región extracelular (Figura 2). El dominio citoplásmico Toll/IL-1 (TIR) tiene aproximadamente 160 aminoácidos, este dominio es esencial para la activación de la cascada de señalización celular, contiene tres regiones altamente conservadas. La región 1 es característica del dominio TIR, la región 2 tiene un dominio que probablemente interacciona con elementos río abajo o con otros TLR, ya que estos receptores pueden formar dímeros durante el reconocimiento de sus ligandos. La región 2 posee una secuencia altamente conservada rica en prolina, cuando hay mutación por

histidina la proteína no lleva a cabo el proceso de señalización; la función de la región 3 aún no es muy clara (Krishnan *et al.*, 2007). Los TLR se clasifican en dos grupos; el primero comprende aquellos que se expresan en la membrana celular: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6, el segundo está formado por los TLR's endosomales: TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 que por lo general reconocen ligandos como DNA ó RNA (Krishnan *et al.*, 2007; Robson, 2009; Dietrich *et al.*, 2010). Los TLR se encuentran en neutrófilos, células epiteliales de mucosas y células endoteliales, además de los macrófagos y células dendríticas (Barton *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

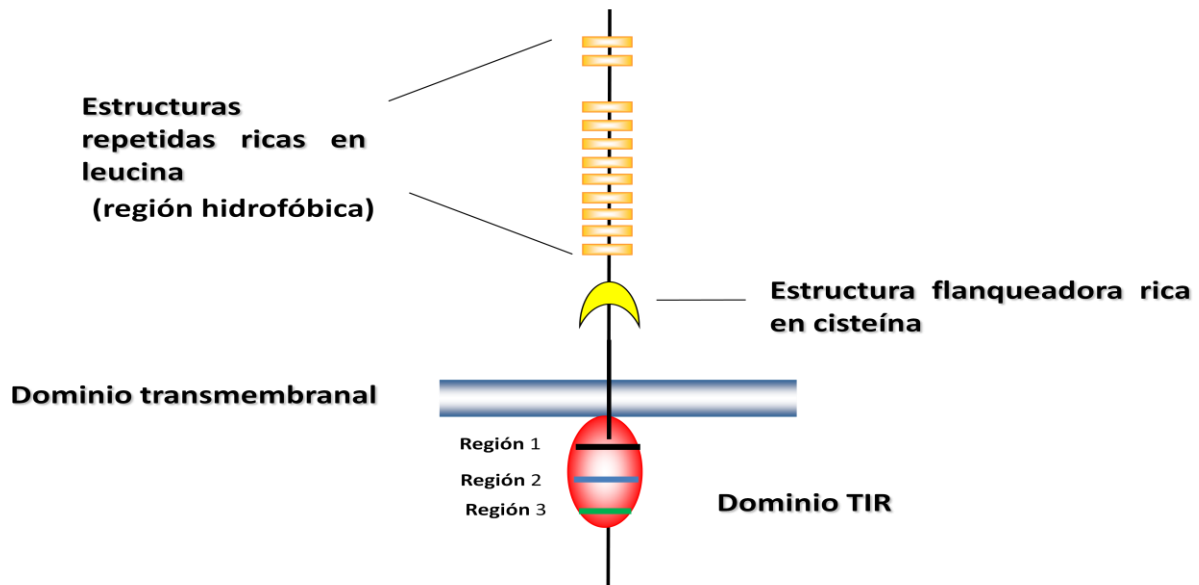


Figura 2.- Estructura general de los TLR. Un TLR típico contiene dominios extracelular y citoplásmico conservados. Los TLR varían en el número y en la posición de las regiones ricas en leucina y en cisteína en el dominio extracelular; además, contienen el dominio citoplásmico Toll/IL-1.

Los TLR tienen la propiedad de reconocer ligandos con estructura química que no se encuentran relacionadas entre sí. En particular el TLR4 es de interés para este trabajo, el TLR4 reconoce ligandos que tienen en común grandes regiones hidrofóbicas, las cuales son reconocidas por la región no-polar de repetidos ricos en leucina del TLR4 (Figura 3). Los PAMP que reconoce este receptor son el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, las proteínas de fusión del virus respiratorio sincitial y las fimbrias bacterianas, entre otros. El TLR4 también reconoce moléculas de naturaleza endógena como algunos componentes de matriz extracelular como: el ácido hialurónico y el fibrinógeno, proteínas del núcleo que son liberadas durante la necrosis, la β -defensina y la proteína de choque térmico de 60 kD (HSP60) que se producen posterior

a un proceso infeccioso, además de moléculas endógenas modificadas (Seong y Matzinger, 2004; Asea, 2008; Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008; Sumbayev, 2008). Recientemente se ha descubierto que este receptor tiene la propiedad de reconocer fármacos como el Taxol que se usa para el tratamiento del cáncer de ovario y de mama (Kawasaki *et al.*, 2004).

Debido a que el TLR4 reconoce las regiones no-polares de sus ligandos (Figura 3), existe la posibilidad de que el TLR4 participe en el reconocimiento de fosfolípidos en los arreglos moleculares de partículas lipídicas, en donde se presentan también grandes regiones no-polares. Los dímeros TLR2/6 y TLR1/2 reconocen lipoproteínas de micoplasma y lipoproteínas de origen bacteriano (Tabla 3) (Abbas *et al.*, 2007; Doz *et al.*, 2007; Krishnan *et al.* 2007; Wu *et al.*, 2006 y Ellass *et al.*, 2008), por lo que también es posible que participen en el reconocimiento de los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas.

Tabla 3. Localización, organismo en donde se encuentran y ligandos más comunes de los TLR. (Anders *et al.*, 2005; Rojas-Espinosa, 2006; Abbas *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2007).

Receptor	Localización	Especie	Ligando	Origen del ligando
TLR1	Membrana celular	Humano/ratón	Triacil lipopéptidos	Bacterias gram negativas
TLR2	Membrana celular	Humano/ratón	Lipoproteínas Peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos, Lipoarabinomanana Zimosan, HKLM y FSL1	Bacterias gram negativas y positivas Bacterias gram positivas Micobacterias Levaduras
TLR3	Endosomal	Humano/ratón	RNA de doble cadena	Virus
TLR4	Membrana celular	Humano/ratón	Lipopolisacárido, fimbrias Proteína HSP60 Proteínas de fusión	Bacterias gram negativas <i>Chlamydia</i> Virus respiratorio sincitial
TLR5	Membrana celular	Humano/ratón	Flagelina	Bacterias gram negativas
TLR6	Membrana celular	Humano/ratón	Bacterias gram negativas	Micoplasma
TLR7	Endosomal	Humano/ratón	RNA de una cadena	Virus
TLR8	Endosomal	Humano/ratón	RNA de una cadena	Virus
TLR9	Endosomal	Humano/ratón	Secuencias DNA CpG Hemozoina	Bacterias, protozoarios <i>Plasmodium falciparum</i>
TLR10	Membrana celular	Humano	Desconocido	Desconocido
TLR11	Membrana celular	Humano/ratón	Profilina Biofilm	<i>Toxoplasma gondii</i> Bacterias uropatogenas
TLR12	Desconocido	Ratón	Desconocido	Desconocido
TLR13	Desconocido	Ratón	Desconocido	Desconocido

Diversos estudios han resaltado la importancia de los PAMP, ya que al activar a los TLR exacerbaban enfermedades como el LES. En estos trabajos se han utilizado cepas de ratones MRL/n, BXSB y NZW que desarrollan una enfermedad parecida al lupus humano. En estos ratones al administrar LPS se observó un aumento en la producción de anticuerpos anti-DNA así como la activación y expansión clonal de células B (Hang *et al.*, 1983; Robson, 2009). En ratones MRL1pr han demostrado que al utilizar secuencias de RNA ó de DNA, que son los ligandos para TLR7 ó TLR9, se mimetizan los efectos de una infección viral y se exagera el lupus que presentan. Adicionalmente, se ha demostrado que al utilizar ratones susceptibles a desarrollar lupus y que carecen de alguno de estos TLR, no desarrollan la enfermedad, aún si el ligando se encuentra en altas concentraciones. Estos hallazgos resaltan la importancia de los TLR en el desarrollo de enfermedades autoinmunes en modelos animales independientemente que tengan o no la carga genética para desarrollar dichas enfermedades (Anders *et al.*, 2004; Patole *et al.*, 2005; Pawar *et al.*, 2006; Kim, *et al.*, 2009; Lenert, 2010).

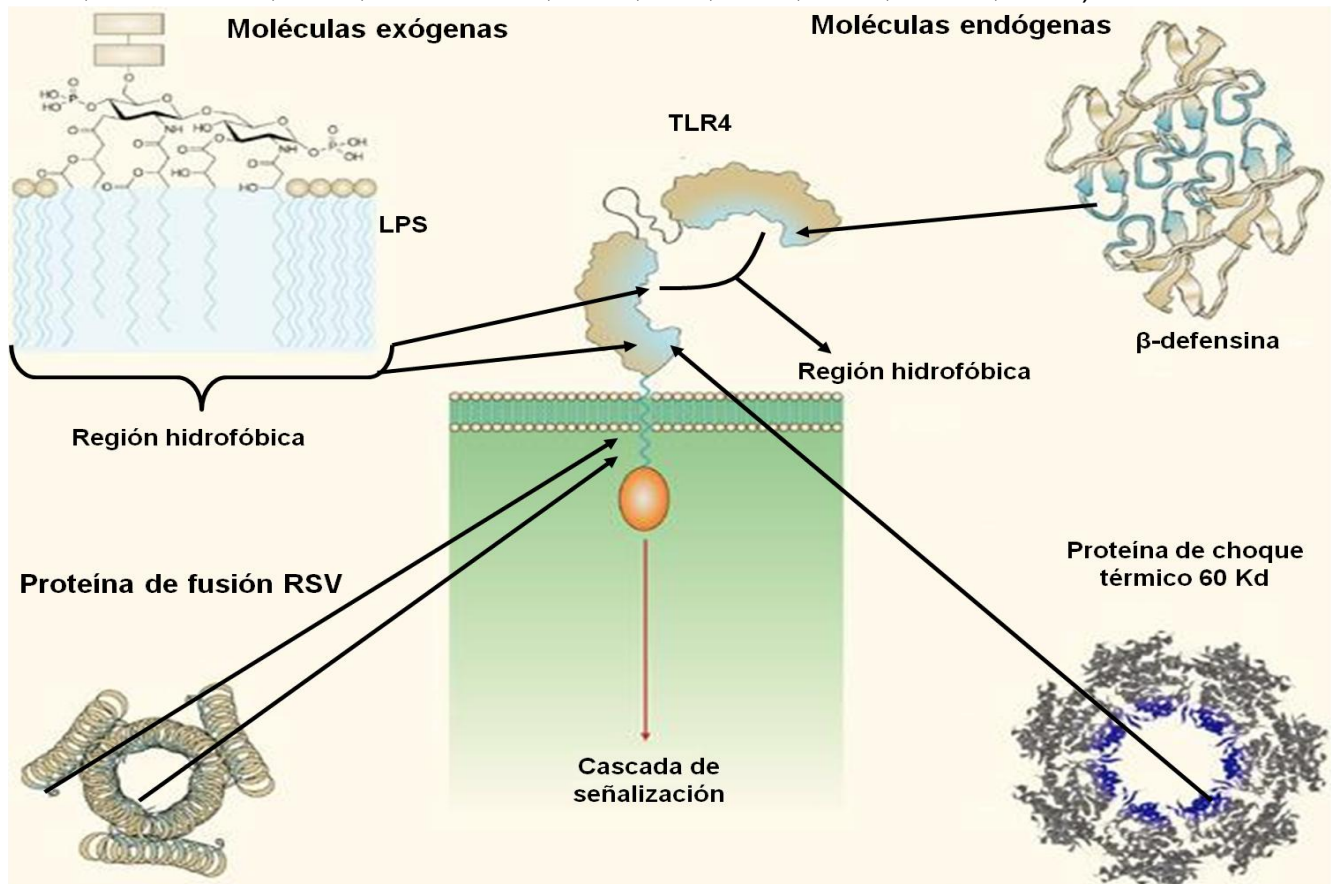


Figura 3.- Esquema del reconocimiento de moléculas exógenas y endógenas por el TLR4. El reconocimiento de moléculas exógenas como el LPS y la proteína de fusión del virus sincitial humano y de moléculas endógenas como la β-defensina y la proteína de choque térmico 60 se lleva a cabo por la unión de las regiones hidrofóbicas de éstas con el TLR4 en su región no-polar. Este reconocimiento da como resultado la cascada de señalización que a su vez da origen a la respuesta inflamatoria (Seong y Matzinger, 2004).

De los ligandos del TLR4, el LPS es de interés para este trabajo por su similitud estructural con los fosfolípidos de forma cónica que participan en la formación de las partículas lipídicas en estudio. El LPS es el mayor componente de la pared celular de bacterias gram negativas, su reconocimiento es mediado por el complejo TLR4-MD2. Primeramente el LPS es reconocido por la proteína de unión a LPS ó LBP (LPS-binding protein) que se encuentra en el plasma, después el complejo LPS-LBP se une a CD14 que está en la membrana celular y posteriormente transfiere el LPS a TLR4-MD2, este complejo induce la cascada de señalización que activa a NF- κ B y lleva a la producción de enzimas pro-inflamatorias (Figura 4), como el LPS es un potente activador de la respuesta inmune puede llevar a choque séptico (Niu *et al.*, 2008; Wittebole *et al.*, 2010).

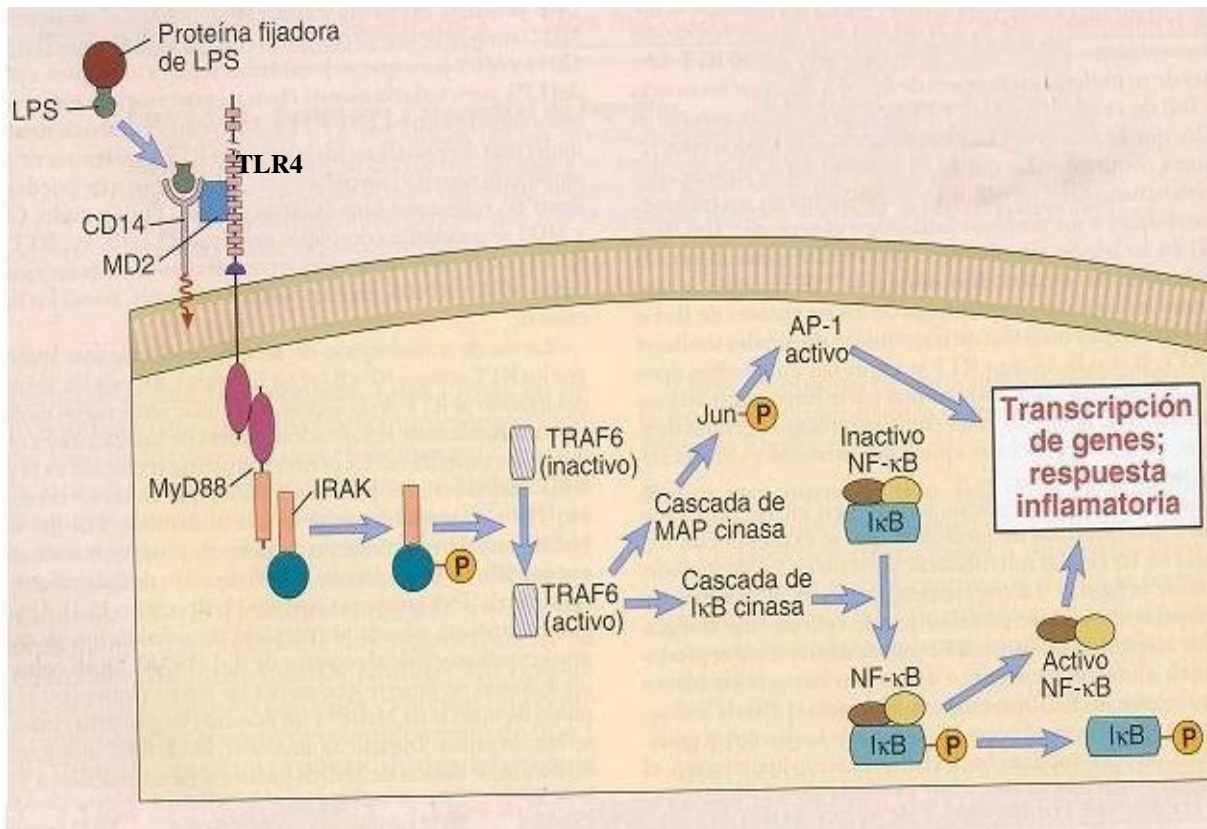


Figura 4.- Reconocimiento del LPS por el TLR4 y cascada de señalización que se activa. El LPS es transportado mediante la proteína fijadora de LPS hacia el TLR, al llevarse a cabo la interacción LPS con el TLR4, se inicia la cascada de señalización que culmina con la activación de NF- κ B, el cual a su vez activa la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria, que da como resultado la producción de factores quimiotácticos y moléculas pro-inflamatorias (Abbas *et al.*, 2007; Premkumar *et al.*, 2010).

El LPS es una molécula anfipática, que posee una región hidrofílica constituida por un heteropolisacárido y una porción hidrofóbica conocida como lípido A, esta molécula es

la responsable de las reacciones tóxicas y pirógenas características del LPS. El lípido A es un disacárido de D-glucosamina en unión β 1-6, posee dos grupos fosfato cargados negativamente y seis cadenas hidrocarbonadas saturadas que tienen una distribución asimétrica; cuatro de estas cadenas están unidas a la glucosamina no-reductora y las otras dos a la glucosamina reductora (Figura 5A). Esta distribución de las cadenas aciladas le confieren al lípido A una forma molecular cónica (Figura 5B) (Seydel *et al.*, 2000), la reducción del número de cargas negativas o variaciones en la distribución, longitud y el número de las cadenas aciladas disminuye considerablemente la actividad biológica del lípido A, posiblemente debido a que su unión con el complejo TLR4-MD2 es menos eficiente (Seydel *et al.*, 2000; Schromm *et al.*, 2000). El hexa-acil lípido A monofosforilado tiene una forma cónica menos marcada (Figura 5C) que el difosforilado (Figura 5B) y presenta menor actividad biológica. La reducción en el número de cadenas aciladas (Figura 5D y E) o una forma cilíndrica simétrica (Figura 5F) causan pérdida de la actividad biológica (Brandenburg *et al.*, 1993; Seydel *et al.*, 2000).

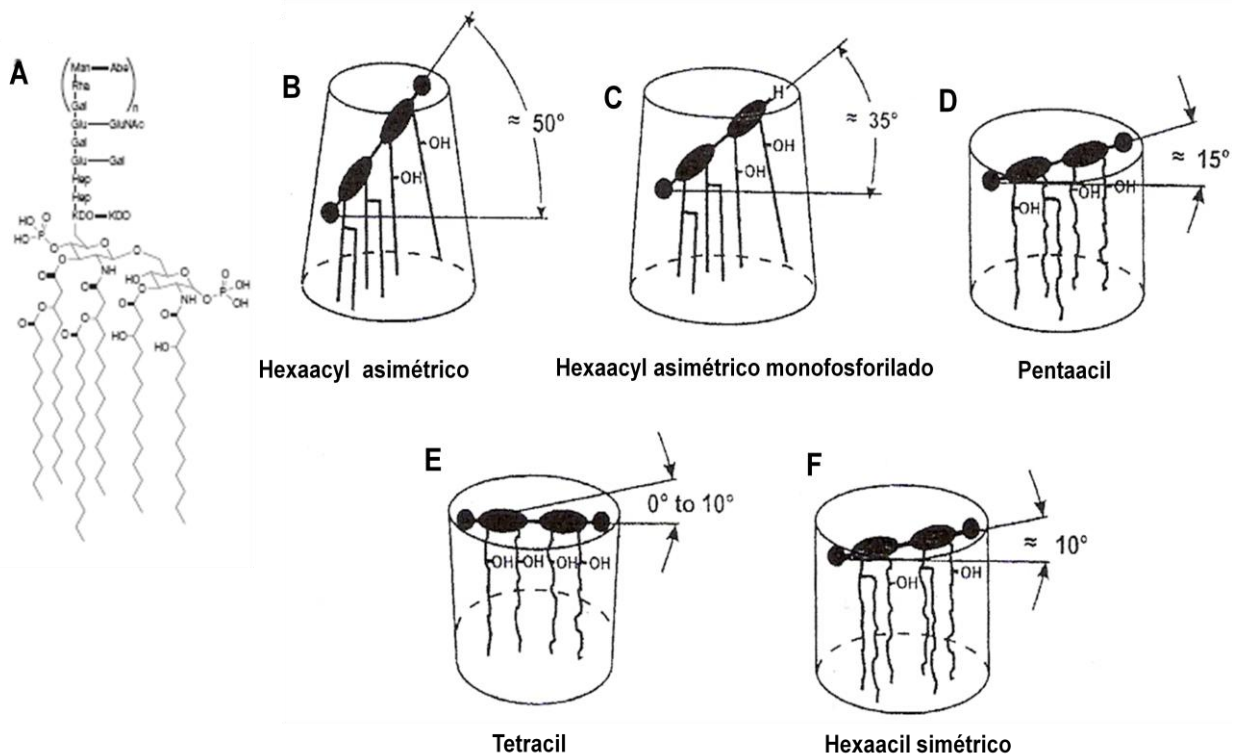


Figura 5.- Estructura química del lípido A del LPS y esquemas del lípido A. Se muestran variaciones en fosforilación, número de cadenas hidrocarbonadas y forma molecular. El lípido A de *E. coli* que tiene la mayor actividad biológica es el de forma cónica (B). Lípido A monofosforilado medianamente activo (C), antagonista inactivo (D), tetraacilado inactivo (E) y proveniente de *Chromobacterium violaceum* e inactivo (F) (Seydel *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2005).

Es importante destacar que los fosfolípidos que tienen una forma molecular cónica son los que participan en la formación de las partículas lipídicas, en donde hay un arreglo molecular de cadenas hidrofóbicas semejante al que presenta el LPS (Figura 6). Por lo que es probable que el TLR4 pueda reconocer a los lípidos en esta asociación molecular y posteriormente se producen los anticuerpos contra esta asociación lipídica.

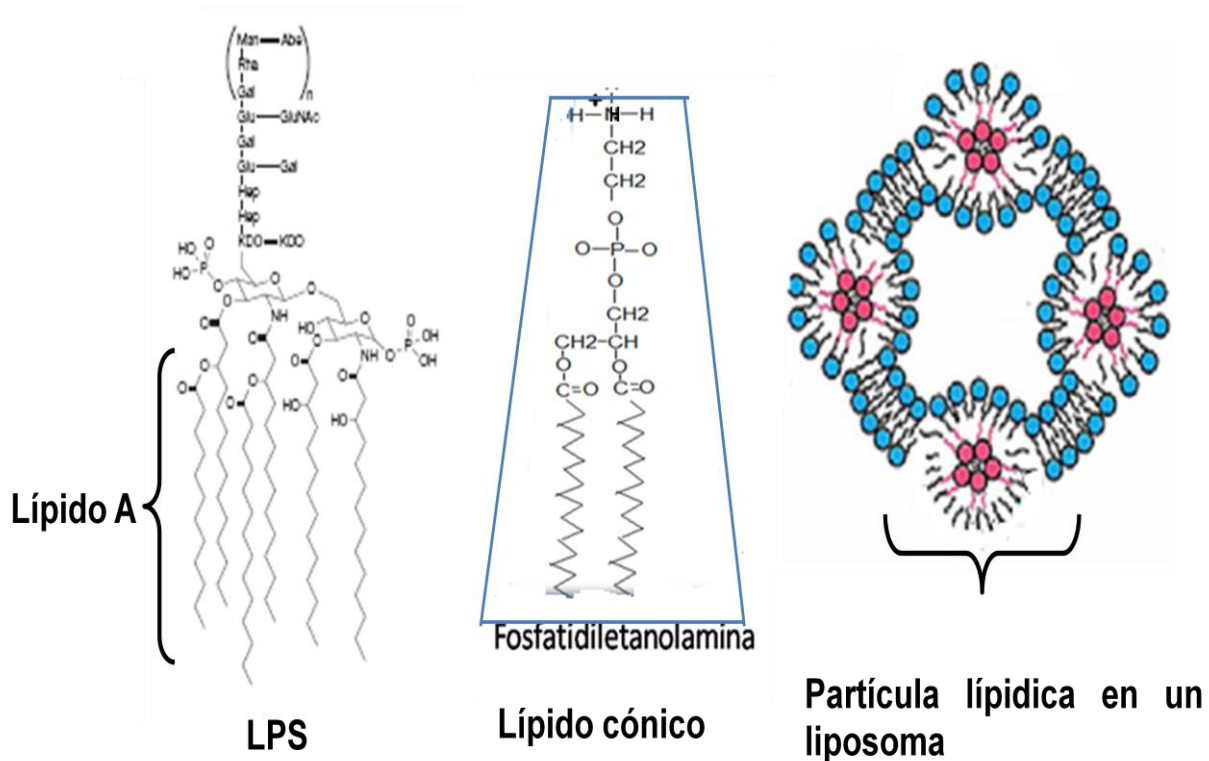


Figura 6.- Estructura química del LPS y de un lípido cónico y esquema de un liposoma. Se observa que la región hidrocarbonada del LPS presenta gran semejanza con las regiones hidrocarbonadas que forman parte de las partículas lipídicas en los liposomas, las cuales se encuentran formadas por fosfolípidos cónicos como la fosfatidiletanolamina y por fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina, fosfatidato y cardiolipina.

Las células dendríticas de los epitelios de piel y de los aparatos digestivo y respiratorio al interactuar a través de sus TLR con los patrones moleculares microbianos o con los endógenos, se desplazan hacia la zona T de los ganglios linfáticos, en donde circulan los linfocitos T vírgenes o “naive” (CD4⁺). En este trayecto las células dendríticas maduran y expresan moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 que son reconocidas por el ligando CD28 en las células T CD4⁺, también expresan CD40 que tiene por ligando en las células T a la molécula CD40L. Como consecuencia, la subpoblación T_H2 CD4⁺ se activan y producen una serie de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-

10 e IL-13) e interaccionan con linfocitos B. Estos últimos también se unen a PAMP's o a ligandos endógenos a través de sus receptores específicos y después de procesarlos los exponen en moléculas MHC II que también se unen a los receptores de los linfocitos T_H2 $CD4^+$ (Figura 7). Posteriormente, los linfocitos B maduran del estado "naive" con la participación de las citocinas IL-2, que funciona como factor de crecimiento y estimulante de la producción de anticuerpos, IL-4, que participa en el cambio de isotipo de IgM a IgG y en la expansión clonal de linfocitos B, e IL-6, que también favorece la expansión clonal. Estas células se convierten en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos que migran de manera preferente a la médula ósea. Las células plasmáticas en la médula ósea pueden secretar anticuerpos por meses o incluso por años, lo que confiere una protección inmediata si se tiene contacto nuevamente con el antígeno. Algunos linfocitos B adquieren la propiedad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo y constituyen las células B de memoria, que pueden permanecer en los ganglios linfáticos o mediante el torrente sanguíneo alcanzar otros órganos linfáticos (Figura 7) (Abbas *et al.*, 2007)

Para iniciar el estudio de los mecanismos que llevan a la producción de anticuerpos contra el arreglo tridimensional de los fosfolípidos en partículas lipídicas y con base en la similitud entre la forma molecular cónica de la región no-polar del LPS y de los fosfolípidos que forman las partículas, en este trabajo se propone la hipótesis de que las partículas lipídicas sean reconocidas por el TLR4 y/o por el dímero TLR2/6; ya que ambos TLR's reconocen al LPS o a lipoproteínas bacterianas, respectivamente (Figura 8).

Es importante conocer este primer evento en la producción de anticuerpos anti-partículas lipídicas para posteriormente llegar a conocer los procesos que llevan a la obtención de estos anticuerpos.

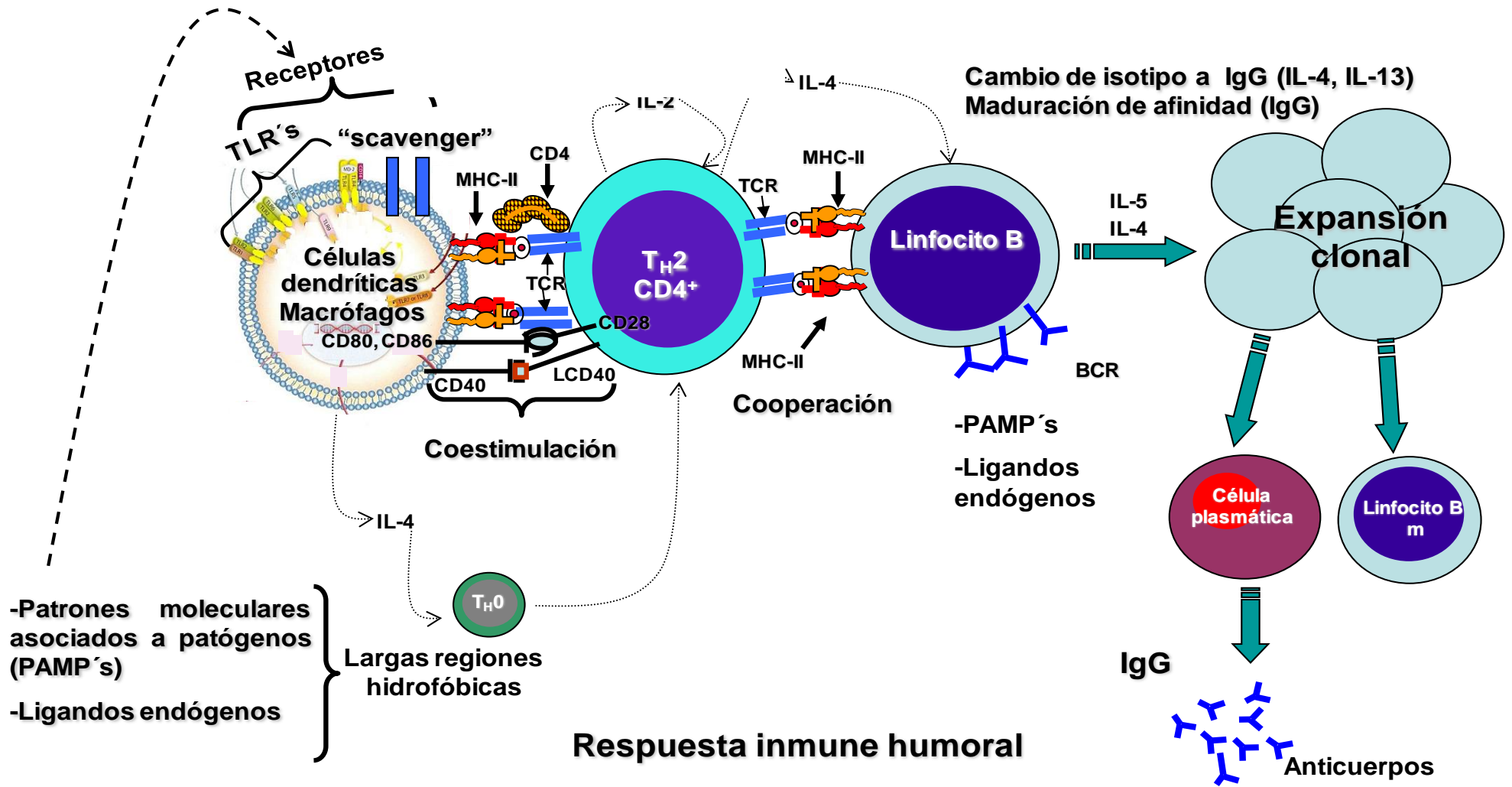


Figura 7.- Representación del reconocimiento de moléculas por receptores tipo Toll (TLR) y de la producción de anticuerpos. Los PAMP's son reconocidos por TLR de células dendríticas y/o de macrófagos y son procesadas y presentadas a los linfocitos T_H2 $CD4^+$ en los ganglios linfáticos. El reconocimiento molecular también es llevado a cabo por linfocitos B a través su receptor (BCR) y son presentados en moléculas MHC II. Posteriormente las células maduran del estado virgen y dan lugar a una expansión clonal y a células plasmáticas productoras de anticuerpos IgG e IgM y a células B de memoria.

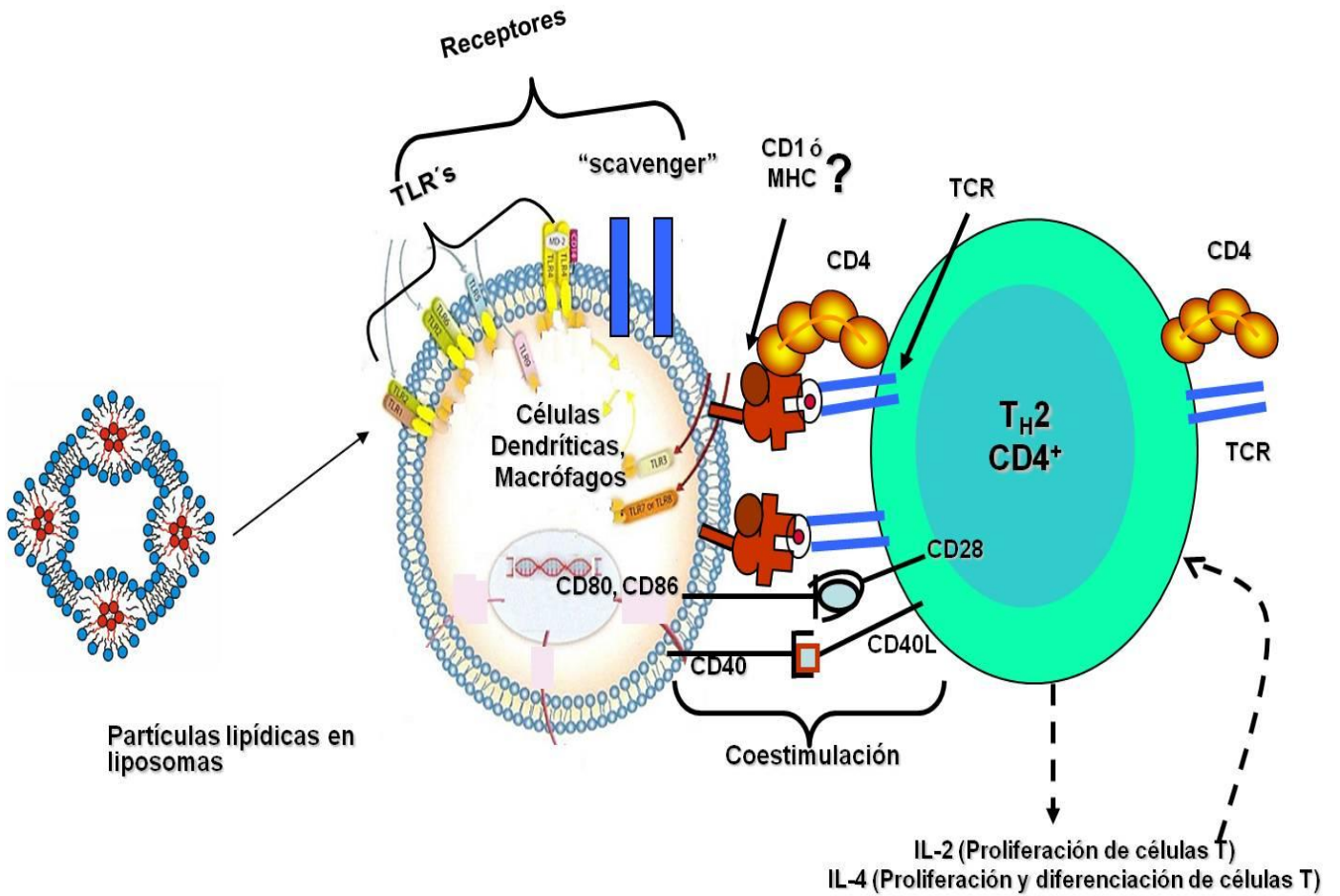


Figura 8.- Representación esquemática del posible reconocimiento de partículas lipídicas por receptores tipo Toll (TLR). Las partículas lipídicas son reconocidas por TLR de células dendríticas y/o macrófagos y son procesadas y presentadas posiblemente en receptores CD1 o MHC-II a linfocitos T_H2 $CD4^+$.

I. 10.- Justificación

Se ha demostrado la participación de lípidos asociados en partículas lipídicas y de anticuerpos anti-partículas en el desarrollo de lupus en ratones; así mismo, se han detectado anticuerpos anti-partículas en 60 sueros de pacientes con LES y LES secundario al SAAF. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de reconocimiento de estos lípidos en partículas lipídicas por el sistema inmunitario, así como la producción posterior de los anticuerpos contra estas asociaciones lipídicas. Por lo que en este trabajo se estudia, la posible participación de los receptores tipo Toll en el reconocimiento de fosfolípidos en partículas lipídicas, debido a la similitud entre el arreglo molecular de los fosfolípidos en las partículas y el de algunas moléculas bacterianas, como el LPS, que son reconocidas por estos receptores de las células presentadoras de antígenos.

I. 11. - Hipótesis

Los receptores tipo Toll, identifican selectivamente a los lípidos asociados en partículas lipídicas en células dendríticas y en macrófagos.

I. 12.- Objetivo general

Determinar la participación de los TLR de líneas celulares HEK-293h, que expresan en su superficie un solo TLR, en el reconocimiento de partículas lipídicas formadas con diferentes inductores en liposomas.

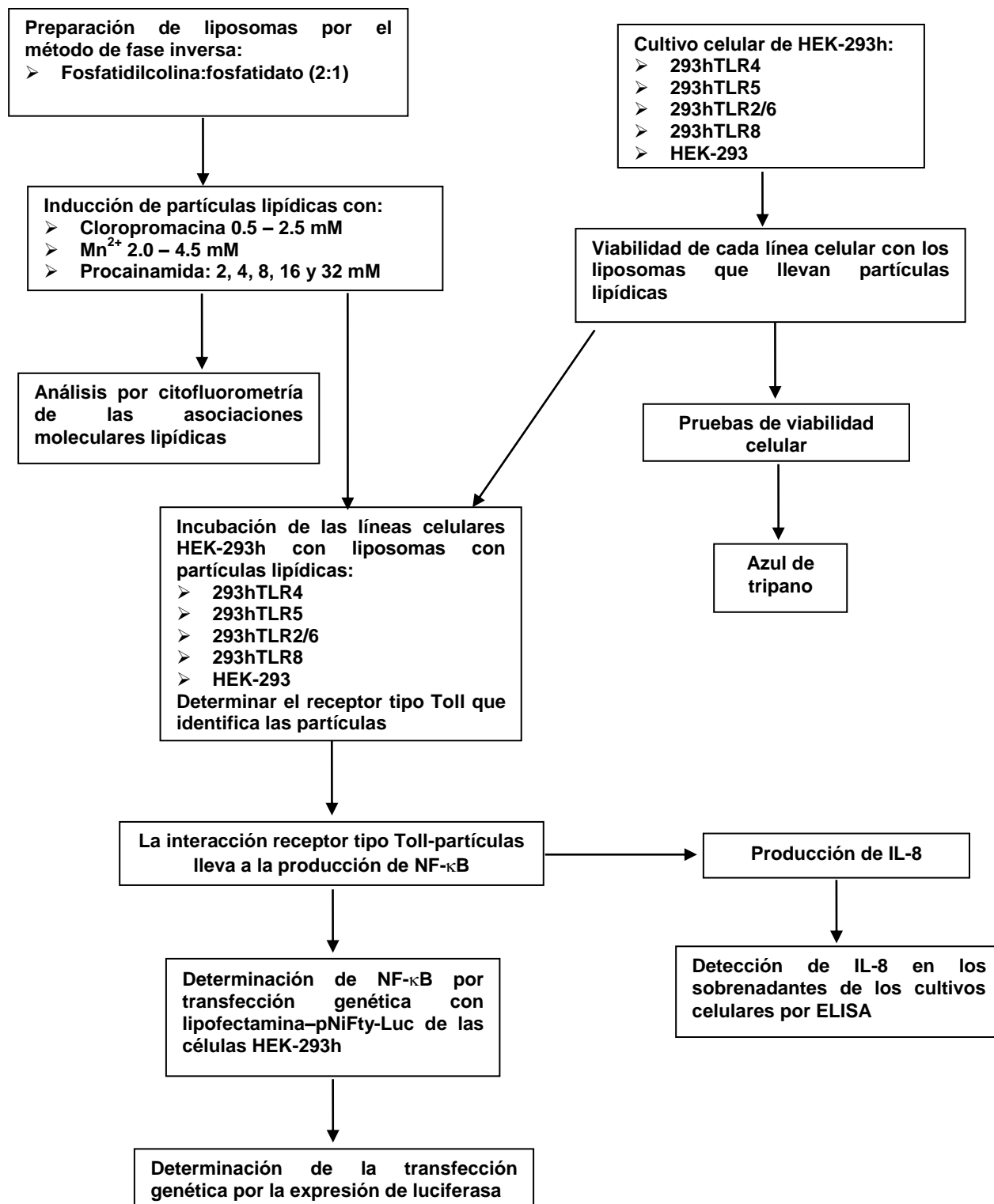
I.13.- Objetivos particulares

1. Preparar liposomas con la composición lipídicas fosfatidilcolina:fosfatidato.
2. Inducir la formación de partículas lipídicas en los liposomas de las diferentes formulaciones lipídicas con clorpromacina, procainamida o Mn^{+2} .
3. Analizar por citofluorometría la formación de partículas lipídicas en liposomas.

4. Cultivar las líneas celulares HEK-293h que expresan en su superficie un solo TLR de humano.
5. Determinar la citotoxicidad de liposomas con partículas lipídicas en las líneas celulares HEK-293h que expresan un TLR.
6. Cultivar las líneas celulares HEK-293h con liposomas con partículas lipídicas y con liposomas con lípidos en bicapa, para determinar el TLR que reconozca los antígenos liposomales.
7. Determinar el reconocimiento de los antígenos liposomales por los TLR de las líneas celulares HEK-293 por la producción de IL-8.
8. Determinar el reconocimiento de los antígenos liposomales por los TLR de las líneas celulares HEK-293 por la activación de NF- κ B.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II. 1.- Diseño experimental general.



II.2.- Preparación de liposomas.

Los liposomas se prepararon por el método de evaporación en fase inversa (Szoka y Papahadjopoulos, 1978) modificado (Baeza *et al.*, 1987) para obtener liposomas unilamelares, ya que estas vesículas son más uniformes en su estabilidad y en sus características que las multilamelares (Alving *et al.*, 1984), con las formulaciones de lípidos: fosfatidilcolina:fosfatidato (relación molar 2:1).

Se emplearon 8 μ moles de los lípidos en cloroformo y se colocaron en un tubo de 13 x 100 mm, adaptado a un rotovapor-M Brinkman Instruments, en donde se evaporó el cloroformo. Después, los lípidos se disolvieron en 1 mL de eter dietílico y se agregaron 300 μ L de TS a pH 7.0, la mezcla se agitó 1 min en un vortex y el eter se evaporó en el rotovapor, durante 1 min con vacío. Posteriormente se agregaron 600 μ L de TS, con lo que se formó una suspensión viscosa, que se transformó en una suspensión de liposomas pequeños unilamelares, que se filtró con membrana Millipore de 0.45 μ M de diámetro del poro, para homogenizar el tamaño de las vesículas y conservarlas en condiciones de esterilidad (Baeza *et al.*, 1990).

II.3.- Inducción de partículas lipídicas en los liposomas.

Los liposomas se incubaron con los inductores de partículas Mn^{2+} a concentraciones de 2.5 a 4.5 mM, procainamida 2, 4, 8, 16, 32 y 80 mM y cloropromacina 0.5 a 2.5 mM y se incubaron 30 min a 37°C, que es el tiempo mínimo requerido para la formación de las partículas lipídicas (Baeza *et al.*, 1994).

II.4.- Análisis por citofluorometría de las asociaciones moleculares lipídicas.

Las preparaciones liposomales con lípidos en bicapa o en partículas lipídicas se colocaron en tubos para citometría de 12 X 75 mm (Elkay Products) y se leyeron en el citómetro FACScalibur (Becton Dickinson), equipado con rayo láser de argón de 488 nm. Se emplearon los siguientes parámetros en modo logarítmico: FSC o tamaño liposomal relativo en E00, umbral mínimo de detección en 52 V; SSC o complejidad liposomal relativa de 401 V y el canal de fluorescencia FL-1 de 660 V. Los datos de

10,000 liposomas se analizaron con el programa Cellquest (Becton Dickinson) y se presentan como histogramas del número de liposomas contra fluorescencia relativa ó contra la complejidad de la bicapa liposomal y gráficas de puntos del tamaño relativo contra la complejidad de la bicapa.

II.5.- Cultivos celulares de HEK-293h que expresan un TLR.

Las células HEK-293h que expresan un solo TLR en su superficie (TLR2/6, TLR4, TLR5 y TLR8) que únicamente producen IL-8 (Miyake, 2003) se cultivaron en botellas GIBCO de 50 mL con DMEM complementado con SFT al 10%, y blasticidina S (Invivogen) 10 µg/ mL, para las células que expresan TLR2/6, TLR5 o TLR8, para las células que expresan TLR4 al medio DMEM complementado se le adicionó HygroGold (Invivogen) 25 µL en 50 mL de medio, las botellas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, hasta obtener una confluencia del 100%. Para la propagación de estas líneas celulares, se eliminó el medio de cada botella y la monocapa se lavó dos veces con 2 mL de regulador de PBS estéril. Se adicionó 1 mL de tripsina al 0.001% y se dejó actuar 1 min a temperatura ambiente. Al despegarse las células, se pasaron a un tubo de propileno de 10 mL con DMEM completo, para que la tripsina siga actuando sobre las proteínas del SFT y no sobre las células. Después, se centrifugó a 1,000 g por 2 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 2 mL de medio de cultivo completo. Las células se sembraron en botellas nuevas de 50 mL o en placas de 96 pozos con medio completo, y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%, hasta llegar al 80% de confluencia, para los estudios posteriores.

II.6.- Determinación de la citotoxicidad de los inductores de partículas lipídicas: manganeso, cloropromacina y procainamida; así como de liposomas solos a con partículas lipídicas en cultivos de células HEK-293h que expresan un TLR.

Para esta determinación se usó el método de coloración con azul tripán (Freshney, 2005). A los cultivos celulares, que expresan los diferentes TLR's, al 80% de confluencia en placas de 96 pozos, se les agregaron 200 µL de DMEM completo que lleva los inductores, los agonistas de los TLR: para TLR2/6 se utilizó FSL1 que es una

lipoproteína sintética que representa la región amino terminal de *Mycoplasma salivarium* que se utilizó 1 µg/mL, se utilizó 1 µg/mL de HKLM un extracto de *Listeria monocytogenes*, para TLR2, se utilizaron 10 µg/mL de LPS de *Escherichia coli K12* para TLR4, para TLR5 se utilizó 1 µg/mL de flagelina de *Salmonella typhimurium* y para TLR8 se utilizaron 2.5 µg/mL de ssRNA40 que es una molécula sintética rica en secuencias de guanidina-uracilo, ó los liposomas solos ó con partículas lipídicas. Las placas se incubaron 24 h a 37°C en CO₂ al 5%. Posteriormente se eliminó el medio con los inductores o los liposomas a evaluar y a cada pozo se adicionaron 200 µL del colorante supravital azul tripán al 0.2% en PBS estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Las placas se observaron para determinar las células muertas o dañadas que son teñidas de color azul en un microscopio Axio Observer D1, Zeiss y se fotografiaron con el programa Axio Vision 4.6 de Zeiss.

Con base en estudios previos (Baeza *et al.*, 2004) se usaron las siguientes concentraciones de los inductores: cloropromacina de 0.5 a 2.0 mM, procainamida de 2.0 a 32.0 mM y Mn²⁺ de 2.0 a 5.0 mM.

II.7.- Inducción de IL-8 en los cultivos celulares.

A la monocapa de células HEK-293h con 150 µL de DMEM completo en placas de 96 pozos al 80% de confluencia, se les agregaron 200 µL de las preparaciones de liposomas que llevan partículas lipídicas formadas con los diferentes inductores, como control negativo se utilizaron liposomas con superficie en bicapa también en 200 µL de DMEM completo; las placas se incubaron por 24 h a 37°C en CO₂ al 5%. A continuación, se retiraron los sobrenadantes de cada uno de los pozos y se determinó el reconocimiento de los TLR's por los antígenos liposomales por la producción de IL-8 por ELISA (Figura 9).

II.8.- Detección de IL-8 en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Para la detección de IL-8 en los cultivos de células HEK-293h se utilizó el paquete comercial Human IL-8 ELISA set (BD OptEIA™ número de catálogo 555244) que se

usa para determinar IL-8 natural o recombinante en suero, plasma y/o sobrenadantes de cultivos celulares.

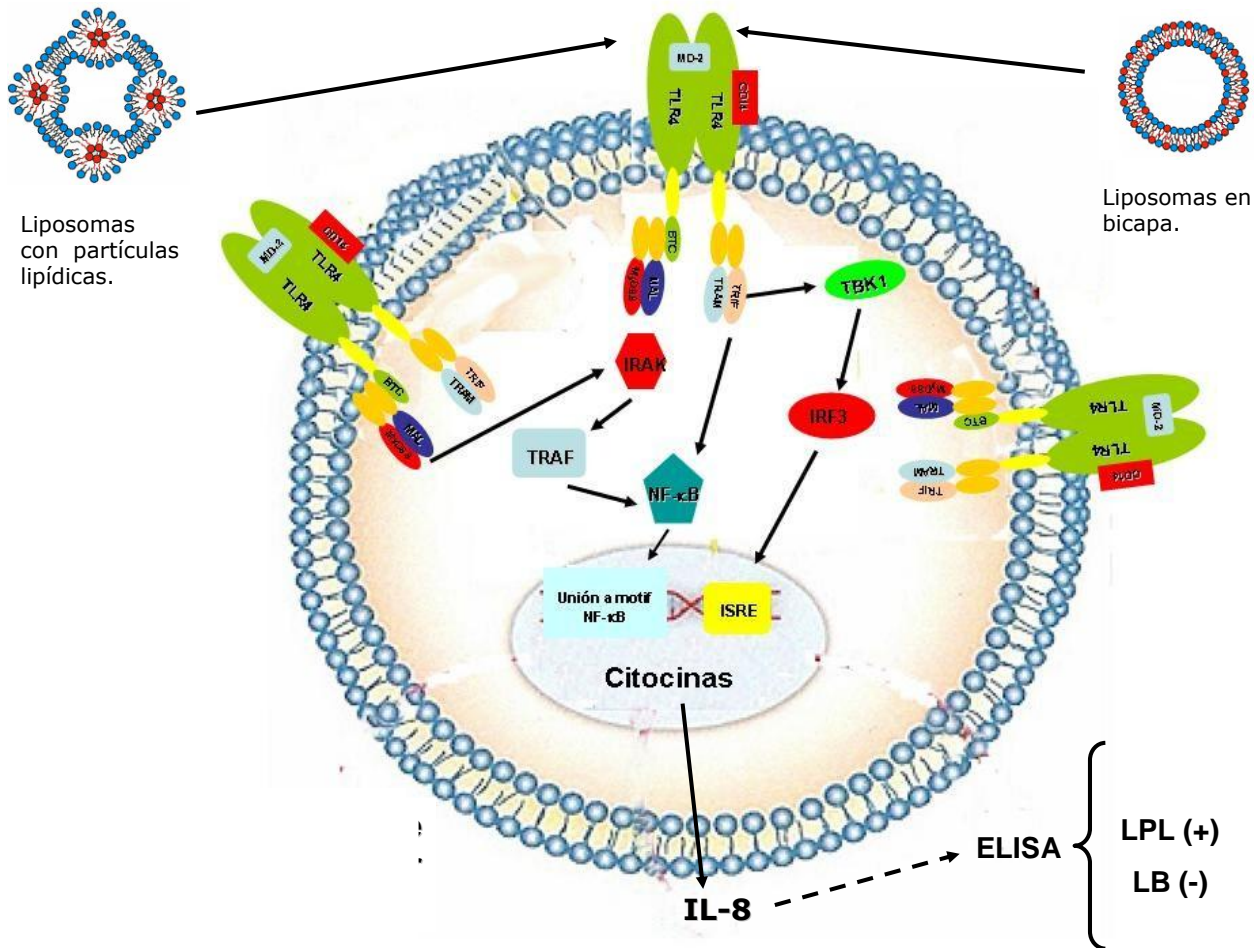


Figura 9.- Reconocimiento de partículas lipídicas por células HEK-293hTLR4. La cascada de señalización que se activa por el reconocimiento de un PAMP por un TLR lleva a la activación del NF-κB y finalmente a la producción de IL-8.

En este inmunoensayo, cada uno de los pozos de la placa se sensibilizó con 100 µL del anticuerpo monoclonal de humano anti-IL-8, en dilución 1:250, la placa se incubó toda la noche a 4°C. Finalizada la incubación el contenido de los pozos se aspiró y se hicieron tres lavados con 300 µL del regulador de lavado, a continuación el regulador se eliminó de la placa por decantación y se secó la solución con una gasa de algodón residual. Después se agregaron 200 µL de solución de bloqueo en cada uno de los pozos y la placa se incubó 1 h a temperatura ambiente. Finalizada la incubación la

placa se lavó nuevamente como se describió. Posteriormente se adicionaron 100 μ L de las muestras a analizar o de cada una de las soluciones estándar de IL-8, la placa se incubó por 2 h a temperatura ambiente, a continuación se hizo otra serie de cinco lavados.

Después se adicionaron 100 μ L del anticuerpo monoclonal anti-IL-8 biotinado conjugado con estreptavidina-peroxidasa en dilución 1:250, y la placa se incubó 1 h a temperatura ambiente. Al término de esta incubación se hicieron siete lavados de la placa, con intervalos de 1 min entre cada uno de ellos. Posteriormente se agregaron a cada pozo 100 μ L del sustrato tetrametilbenzidina de la enzima peroxidasa, y la placa se incubó por 30 min en oscuridad. Finalmente se agregaron 50 μ L de H_3PO_4 1 M para detener la reacción, las absorbencias correspondientes se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). La concentración de IL-8 en los sobrenadantes de los cultivos celulares se calculó al extrapolar la absorbencia obtenida de cada sobrenadante en la curva estándar, que relaciona en el eje de las ordenadas las lecturas de absorbencia de los estándares de IL-8 con la concentración de IL-8 en pg/mL en las abscisas.

II. 9.- Transformación genética de *Escherichia coli* GT120.

Para esta determinación se utilizó el método de Cohen *et. al.*, 1972. Primeramente se preparó un preinóculo de *E. coli* GT120 (bacterias no transformadas) en 10 mL de medio Luria, que se incubó 12 h a 37°C en un agitador rotatorio (Lab-Line 3590) a 150 rpm. Con 1 mL de este preinóculo se sembró un matraz nefelométrico con 30 mL de medio y se incubó a 37°C con agitación, hasta que se alcanzaron 45 unidades Klett, a continuación, se centrifugó a 4000 x g durante 10 min, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 15 mL de solución de Tris- $CaCl_2$ 100 mM. Posteriormente, se incubó 20 min a 4°C, y se centrifugó 5 min a 2000 x g y la pastilla de células se resuspendió en 2 mL de solución de Tris- $CaCl_2$, que se incubó otras 24 h a 4°C, con lo que se obtuvieron las células competentes de *E. coli*.

A 200 μ L de células competentes de *E. coli* GT120 en Tris-CaCl₂, se les agregó 1 μ g de DNA de pNIFty-Luc en 100 μ L de Tris-CaCl₂ y se incubó 40 min en hielo. Después, se aplicó un pulso térmico a 37°C durante 10 min y se dejó a temperatura ambiente 10 min. A continuación, se adicionaron 3 mL de medio Luria líquido y se sembraron las siguientes alícuotas en medio sólido de Luria-ampicilina:

- 100 μ L de las bacterias competentes sin transformar (control negativo)
- 100 μ L de las bacterias transformadas sin diluir
- 100 μ L de las diluciones 1:10, 1:100 y 1: 1000 de las bacterias transformadas

Todas las alícuotas se sembraron con espátula, por duplicado y se incubaron a 37°C durante 24h. Posteriormente las células que crecieron en las placas de medio sólido Luria-ampicilina se colocaron en un matraz con 500 mL de medio líquido Luria-ampicilina y se incubó a 37°C durante 24 h.

II. 10.- Aislamiento y purificación del DNA plásmidico.

Se sembró un preinóculo de la bacteria *E. coli* GT120 que contiene el plásmido pNIFty-Luc (Figura 10) en 5 mL de caldo Luria-ampicilina y se incubó 12 h a 37°C. Se sembró 1 mL del preinoculó en un matraz de 1 L y se incubó 12 h más con agitación a 150 rpm a 37°C en un agitador rotatorio Lab-Line 3590. Posteriormente se le agregaron 60 mg/L de cloramfenicol en medio Luria-ampicilina y se incubó otras 12 h con agitación a 37°C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 2,500 x g por 30 minutos a 4°C.

Para aislar el plásmido, se utilizó el sistema Ultra Clean de los laboratorios MoBio. Al paquete bacteriano se le adicionaron 5 mL de la Solución 1 y se resuspendió con el vortex por 1 min. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de la Solución 2 a temperatura ambiente y se mezcló por inversión tres veces. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se adicionaron 30 mL de la Solución 3, se mezcló por inversión dos veces, y se incubó a temperatura ambiente 10 min. El contenido se transfirió a un tubo con filtro y se centrifugó a 3,500 x g por 5 min. Se retiró

el filtro y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 15 mL de la Solución 4 al filtro, y se centrifugó nuevamente a 3,500 x g por 5 min, el filtrado se desechó. Finalmente, el filtro se colocó en un tubo nuevo de 50 mL se adicionaron 5 mL de la Solución 5 y se centrifugó a 3,500 x g durante 5 min. El plásmido, recuperado en el filtrado se guardó a 4°C hasta su uso.

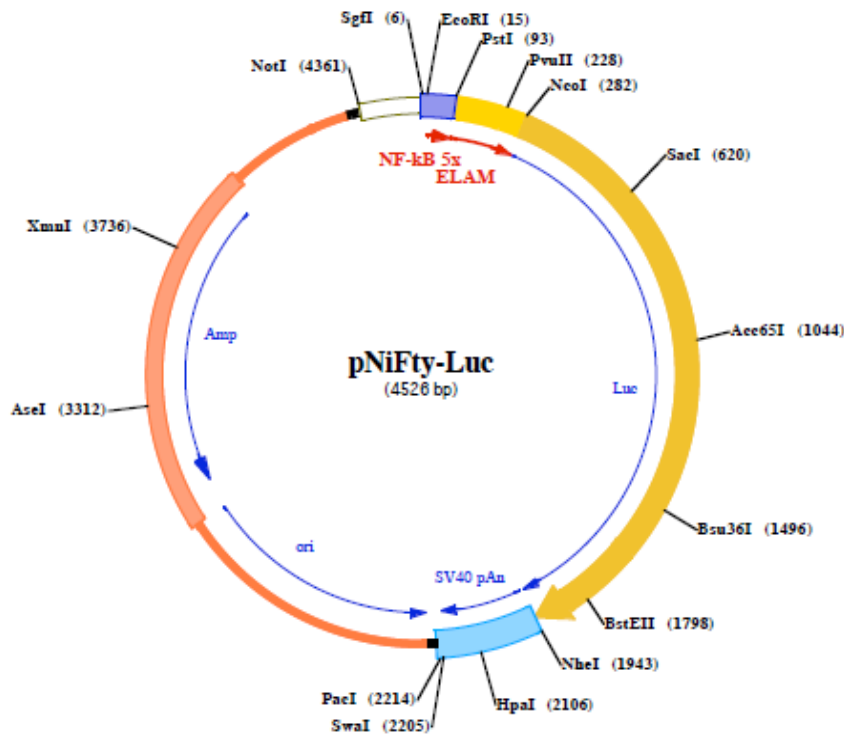


Figura 10.- Mapa del plásmido pNiFty-Luc. Se indican el sitio de unión de cinco moléculas de NF- κ B denominado ELAM, la región que codifica para el gen de la luciferasa (Luc), el sitio del origen de replicación en procariontes (ori), la región que codifica para el gen de resistencia a ampicilina (Amp) y el promotor del virus papovirus SV-40 para eucariontes (SV40 pAN), así como los sitios de corte de las enzimas de restricción.

Soluciones del sistema Ultra Clean de los laboratorios Mo BIO:

Solución 1. Amortiguador: Tris 10mM, EDTA, RNAsa 250 ng/mL.

Solución 2. Solución de lisis celular: SDS 1% y NaOH 0.2N.

Solución 3. Amortiguador de unión: Acetato de potasio 5M.

Solución 4. Tris 10mM, NaCl 1mM, etanol 70%.

Solución 5. Amortiguador: Tris-HCl 10mM.

II. 11.- Caracterización estructural del plásmido pNiFty-Luc por electroforesis en geles de agarosa.

El plásmido pNiFty se caracterizó por su perfil electroforético. A las muestras obtenidas de DNA se les adicionó azul de bromofenol como colorante de corrimiento. La electroforesis se hizo en geles de agarosa al 1% en regulador de Tris-boratos 1X, pH 8.2 a 80 V durante 50 min. Los geles se revelaron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), se observaron en el transiluminador High Performance Ultraviolet y se fotografiaron en el fotodocumentador Kodak Gel Logic 100.

II.12.- Preparación de lipocomplejos con Lipofectamina y el plásmido pNiFty-Luc.

Los lipocomplejos se prepararon, como se indica en el instructivo de Invitrogen, al mezclar 3 µg del plásmido pNiFty-Luc en 150 µL de DMEM incompleto con 3 µL del reactivo Lipofectamina (que son liposomas catiónicos formados por DOSPA y DOPE de Invitrogen) en 150 µL del DMEM incompleto. La mezcla se agitó suavemente en forma manual y se incubó 15 min a 37°C y se usó en la transfección genética de las células HEK-293h.

II.13.- Transfección genética mediada por lipocomplejos de Lipofectamina–pNiFty-Luc de células HEK-293h que expresan un receptor tipo Toll.

El cultivo celular se transfectó con el plásmido pNiFty-Luc que contiene el gen de luciferasa bajo el control de un promotor que debe unirse con cinco moléculas de NF-κB para que se exprese el gen de la luciferasa. Esta técnica es más sensible que la de ELISA para determinar el reconocimiento de las partículas lipídicas por los TLR's. A la monocapa celular en cajas de cultivo de 24 pozos al 90% de confluencia, se le retiró el medio completo, y se le agregaron 100 µL de los lipocomplejos y se incubaron durante 5 h a 37°C con de CO₂ al 5%. A continuación, se retiraron los lipocomplejos y se agregaron los agonistas a probar (LPS para células HEK-293hTLR4, FSL1 para HEK-293HTLR2/6, flagelina para HEK-293hTLR5, HKLM para HEK-293hTLR2 y ssRNA40 para HEK-293hTLR8), o liposomas con lípidos en bicapa o que llevan partículas inducidas con Mn²⁺, diluidos en 900 µL de DMEM completo, con el antibiótico

correspondiente y se incubó 24 h más a 37°C con CO₂ al 5%. La expresión genética en los cultivos de las células transfectadas se determinó por la actividad de la luciferasa.

II.14.- Determinación de la transfección genética de células HEK-293h que expresan un receptor tipo Toll por la expresión de luciferina-luciferasa.

Después de 24 h de que las células HEK-293h transfectadas con Lipofectamina-pNiFty-Luc se incubaron con los agonistas, o con liposomas con o sin partículas lipídicas, se determinó la actividad de la luciferasa, con el sistema comercial de Promega. La monocapa celular se lavó con 1 mL de PBS, se trató con 25 µL de solución de lisis celular 1X. El contenido de cada pozo se transfirió a tubos eppendorf en hielo, se mezclaron en vortex 15 seg y se centrifugaron a 4°C a 12,000 x g. A continuación se colocaron 20 µL del lisado en cada pozo de una placa de 96 (Perkin Elmer L2250042), y se adicionaron 100 µL de reactivo de luciferasa a cada uno de ellos y a un pozo adicional que se utilizó como blanco de reactivos. La emisión de luz se leyó en el luminómetro (Synergy 2 BioTek), la intensidad de la luz emitida se expresa en cuentas por minuto.

III.- RESULTADOS

III. 1.- Inducción de partículas lipídicas en liposomas con cloropromacina, procainamida y $MnCl_2$.

Se formaron liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) en Tris-NaCl (10 mM, 1 mM), pH 7.0 y se incubaron a 37°C por 30 min con los inductores de partículas lipídicas cloropromacina en concentraciones de 0.5 mM a 2.5 mM, $MnCl_2$ de 2 a 10 mM y procainamida 2, 4, 8, 16, 32 y 80 mM.

Los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato en Tris-NaCl tuvieron por citofluorometría el perfil de granularidad característico (Figuras 11A, 12A y 13A). Cuando se incubaron con Mn^{2+} , se observó un incremento significativo en su granularidad, el número de liposomas con partículas aumentó al aumentar la concentración del Mn^{2+} (Figura 11 B-F). La fluorescencia relativa de los liposomas no se modificó por la presencia de las partículas lipídicas; sin embargo, se observó un ligero aumento del tamaño liposomal por efecto de la fusión de bicapas que inducen estas partículas. La diferencia (D), en escala logarítmica, en la granularidad con respecto a los liposomas sin inductor tuvo un valor de $D=0.75$, $p < 0.001$, a concentraciones de 5 mM de Mn^{2+} (Figura 11D). Valores de $D \geq 0.5$ ($p < 0.001$) indican que la diferencia en granularidad entre las poblaciones de liposomas con y sin el inductor de partículas, es muy significativa estadísticamente (Darzynkiewicz y Kapuscinski, 1990; Aguilar *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 1994).

Con cloropromacina, la inducción de partículas lipídicas fue muy evidente a una concentración de 0.5 mM (Figura 12B) con un valor de $D=0.81$, ($p < 0.001$). Con el inductor cloropromacina no se modificó la fluorescencia liposomal por la presencia de partículas lipídicas, ni aumentó el tamaño liposomal (Figura 12B-F), en forma similar al efecto del Mn^{2+} mostrado en la figura 11.

Con procainamida se observaron cambios en la señal de granularidad de los liposomas incubados con todas las concentraciones usadas (de 4 a 80 mM) (Figura 13B-F). El

mejor inductor de partículas en estos liposomas fue la clorpromacina, porque produjo mayor granularidad en los liposomas a concentraciones más bajas que Mn^{2+} y procainamida.

Con base en los resultados de citofluorometría-liposomal, se prepararon liposomas con las formulaciones de lípidos PC:PA (2:1), y se incubaron con los inductores indicados en las figuras (11 a 13) para incubarlos con las células HEK-293 que expresan cada uno de los receptores tipo Toll.

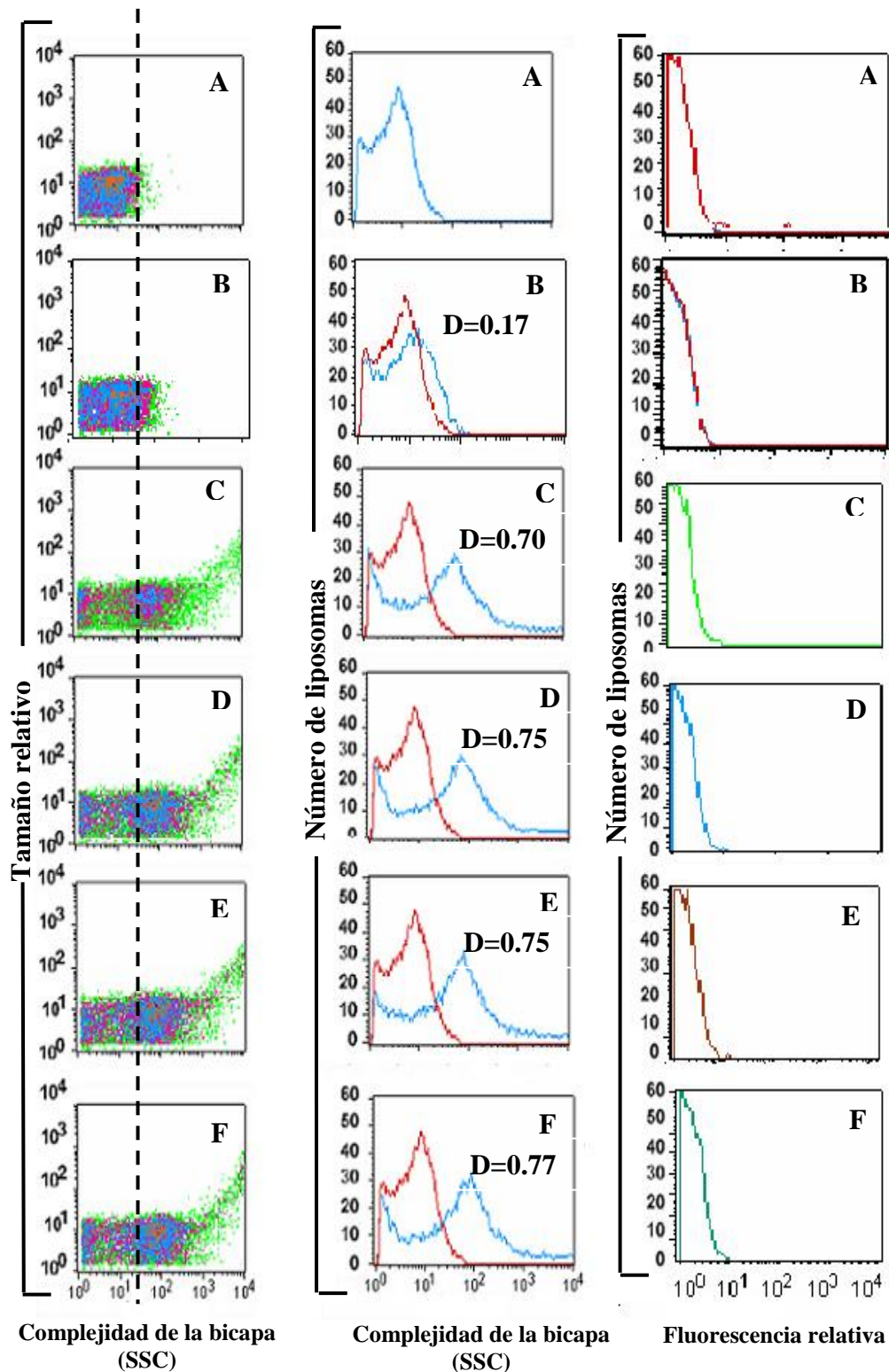


Figura 11. Efecto del Mn^{2+} en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1). Citofluorometría de liposomas incubados con Tris-NaCl (10 mM, 1 mM) a pH 7.0 (A), ó con Mn^{2+} a concentraciones de: 0.5 mM (B), 2.0 mM (C), 4.0 mM (D), 5.0 mM (E), ó 10.0 mM (F).

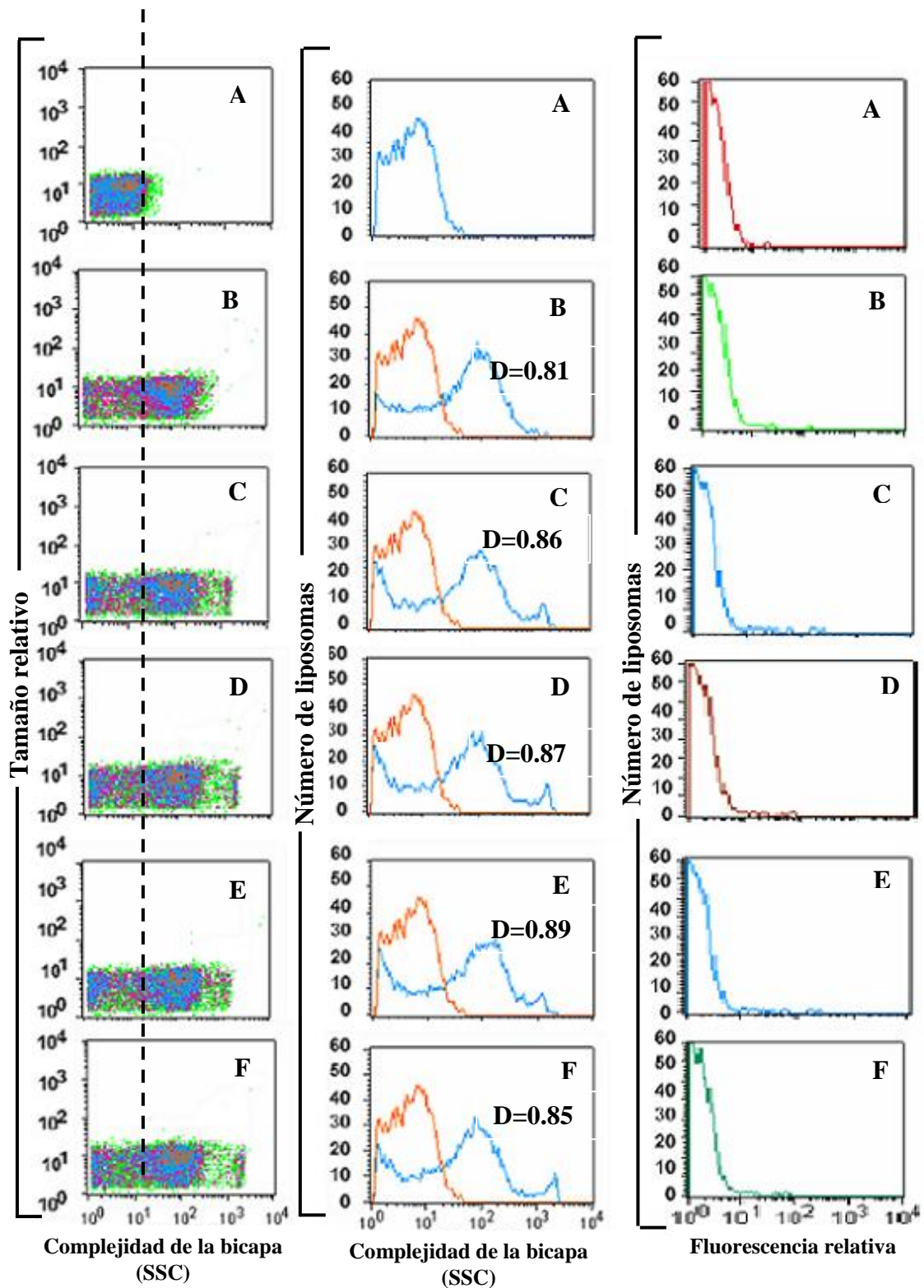


Figura 12. Efecto de la clorpromacina en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1). Citofluorometría de liposomas con Tris-NaCl (10 mM, 1 mM) a pH 7.0 (A), ó con clorpromacina a concentraciones de: 0.5 mM (B), 1.0 mM (C), 1.5 mM (D), 2.0 mM (E), ó 2.5 mM (F).

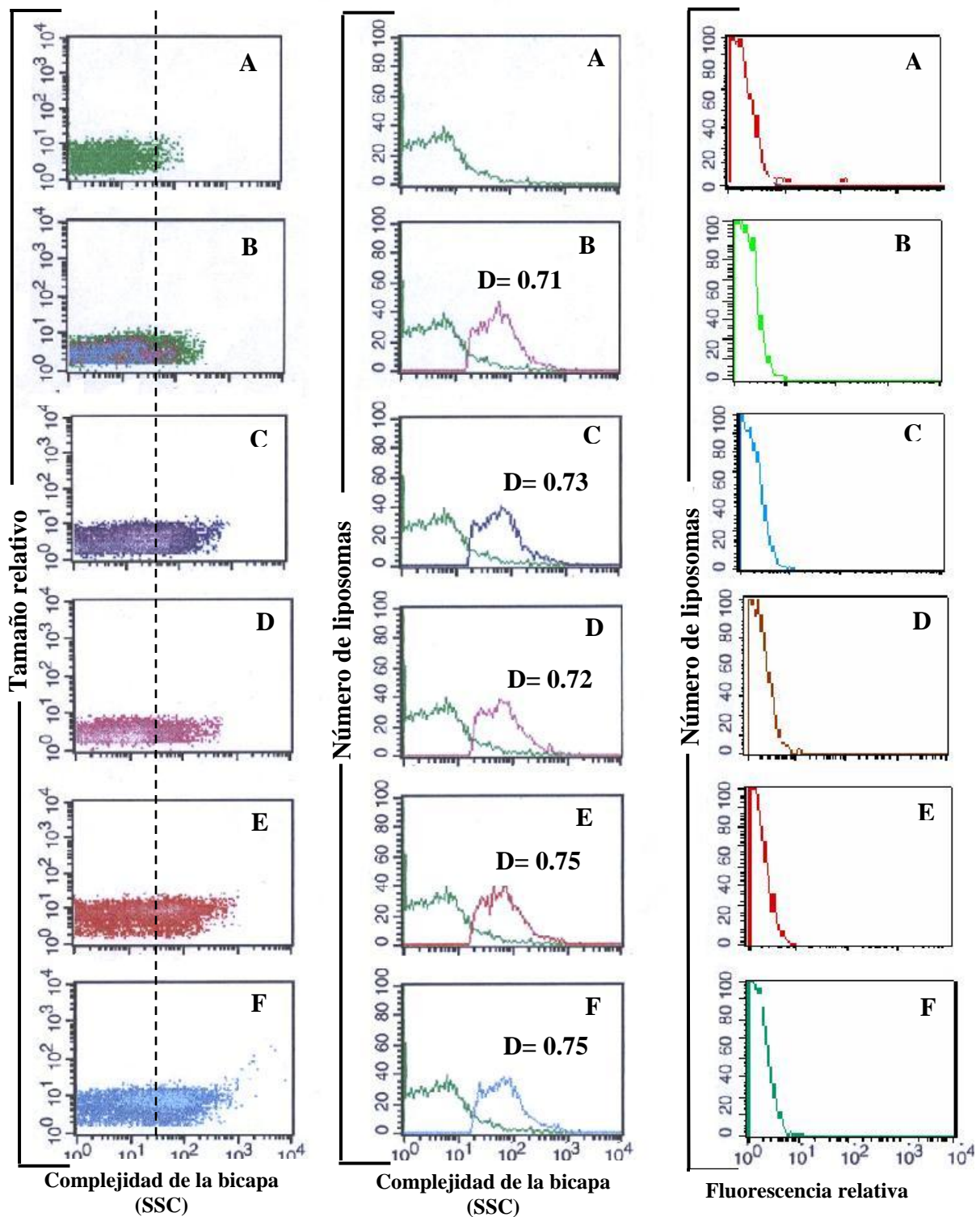


Figura 13. Efecto de la procainamida en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1). Citofluorometría de liposomas incubados con Tris-NaCl (10 mM, 1 mM) a pH 7.0 (A), ó con procainamida a concentraciones de: 4.0 mM (B), 8.0 mM (C), 16 mM (D), 32.0 mM (E), ó con procainamida 80.0 mM (F).

III. 2.- Determinación de la citotoxicidad de los inductores y de los liposomas con partículas lipídicas inducidas con cloropromacina, procainamida y manganeso en cultivos de células HEK-293h.

Para esta determinación se usó el método de coloración con azul tripán, en el cual las células muertas o con daño en la membrana celular son teñidas de color azul.

Al adicionar alícuotas de los tres inductores Mn^{2+} , cloropromacina y procainamida, a las concentraciones indicadas en las figuras 11 a 13, a los cultivos de células HEK-293hTLR4, HEK-293hTLR2/6, HEK-293hTLR5, HEK-293hTLR8 y HEK-293 (Miyake, 2003), las células se despegaron inmediatamente, incluso con las concentraciones más bajas de los tres inductores. Sin embargo, la viabilidad de los cultivos no se vio afectada, al incubar los cultivos con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos o con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} en concentraciones de 2.0 a 4.5 mM con tiempos de incubación hasta de 3 h a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. No obstante, liposomas con partículas lipídicas con cloropromacina o procainamida también causaron que los cultivos de las diferentes líneas se despegaran. También se analizaron los PAMP's de cada uno de los TLR's e incluso un ligando al que no reconocen (FSL1 para TLR2/6, HKLM para TLR2, LPS para TLR4, flagelina para TLR5 y ssRNA40 para TLR8); para el TLR4 se utilizó el inhibidor del LPS el antibiótico polimixina B. Como control negativo se utilizaron células HEK-293 sin transfectar por lo que no expresan algún TLR. En las figuras 14 a 18 se muestran micrografías de las células e histogramas del porcentaje de viabilidad celular.

Cuando las células HEK-293hTLR4 (Figura 14A) se incubaron con LPS o con LPS + polimixina B la viabilidad fue del 95 y 96% respectivamente (Figura 14C y D), y al incubar con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos o con partículas inducidas con Mn^{2+} se observaron porcentajes de viabilidad celular también cercanos al 100% en las concentraciones del inductor empleadas (Figura 14B, E-H, e histograma).

Al incubar las células HEK-293hTLR2/6 (Figura 15A) con sus ligandos como HKLM que es un preparado de *Listeria monocytogenes*, se obtuvo una viabilidad del 90% (Figura 15C), con FSL1, que es una lipoproteína sintética, la viabilidad fue del 95% (Figura 15D), con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato con partículas inducidas con Mn^{2+} , fue entre 90 y 98% a concentraciones de 2.0 mM, 3.5 mM o 4.0 y 4.5 mM, respectivamente (Figura 15E-H), e histograma de la figura 15.

Para células que expresan TLR5 (Figura 16A) la viabilidad fue del 90% con LPS (Figura 16C) y del 95% con su agonista natural flagelina de *S. typhimurium* (Figura 16D). Al incubar con liposomas con partículas lipídicas con Mn^{2+} se observó una disminución muy importante con respecto a las células que expresan TLR4 y TLR2/6, para 2.0 mM la viabilidad fue del 70%, con 3.5 mM fue del 65%, y para 4.0 y 4.5 mM fue de 60 y 50%, respectivamente (Figura 16E-H); en cambio con liposomas solos fue cercana al 100% (Figura 16B, e histograma).

Para las células HEK-293hTLR8 (Figura 17A) cuando se incubaron con LPS la viabilidad fue del 80% (Figura 17C), con el agonista ssRNA40 fue del 90% (Figura 17D). Con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} la viabilidad también disminuyó al aumentar la concentración del Mn^{2+} para 2.0 y 3.5 mM fue del 90%, con 4.0 mM fue 80% y con Mn^{2+} 4.5 mM fue 60% (Figura 17E-H, e histograma), con liposomas solos fue de 95% (Figura 17B).

Con células HEK-293 (Figura 18A) la viabilidad con liposomas fue de 95% con LPS de 50%, con FSL1 fue 95%, con HKLM de 98%, al emplear flagelina la viabilidad fue de 95%, con ssRNA40 fue 85%, finalmente con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM la viabilidad fue de 95% (Figura 18A-H, e histograma).

Con base en los resultados obtenidos en estas pruebas de citotoxicidad, se procedió a recolectar los sobrenadantes en donde se encontró mayor viabilidad celular y a

cuantificar la cantidad de IL-8 producida como consecuencia del reconocimiento por los TLR's de lípidos asociados en partículas lipídicas en los liposomas.

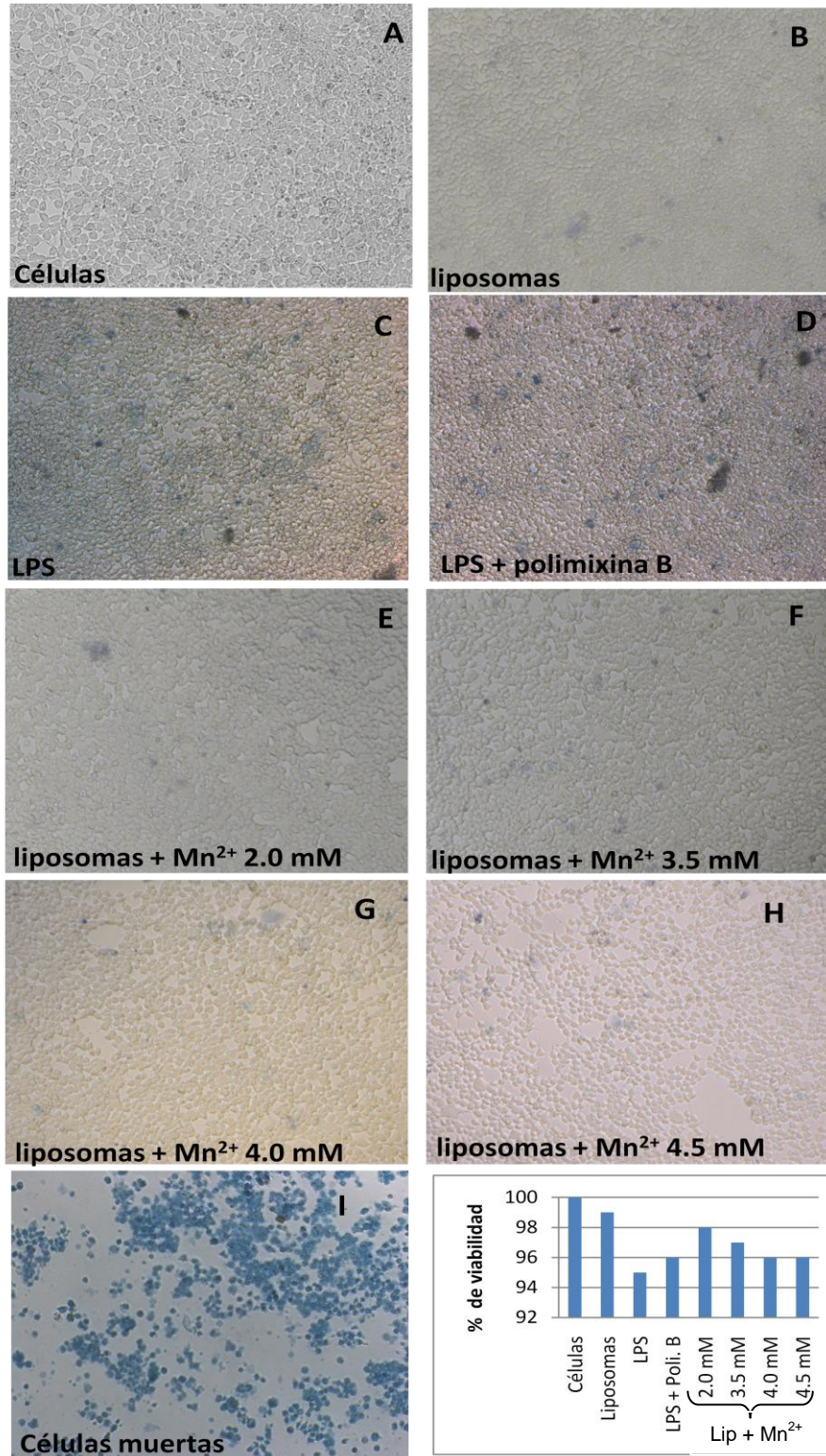


Figura 14. Efecto de liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} , del LPS y de LPS + polimixina B⁺ sobre cultivos de células HEK-293hTLR4. Se muestra el histograma que indica la viabilidad con los ligandos analizados y micrografías de células HEK293hTLR4 en medio de cultivo (A), e incubadas con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (B), con LPS (C), LPS + polimixina B (D) ó con liposomas tratados con Mn^{2+} a concentraciones de: 2.0 mM (E), 3.5 mM (F), 4.0 mM (G), y 4.5 mM (H). Células HEK-293hTLR4 incubadas con Mn^{2+} 1mM en donde se muestra el 100% de muerte celular (I).

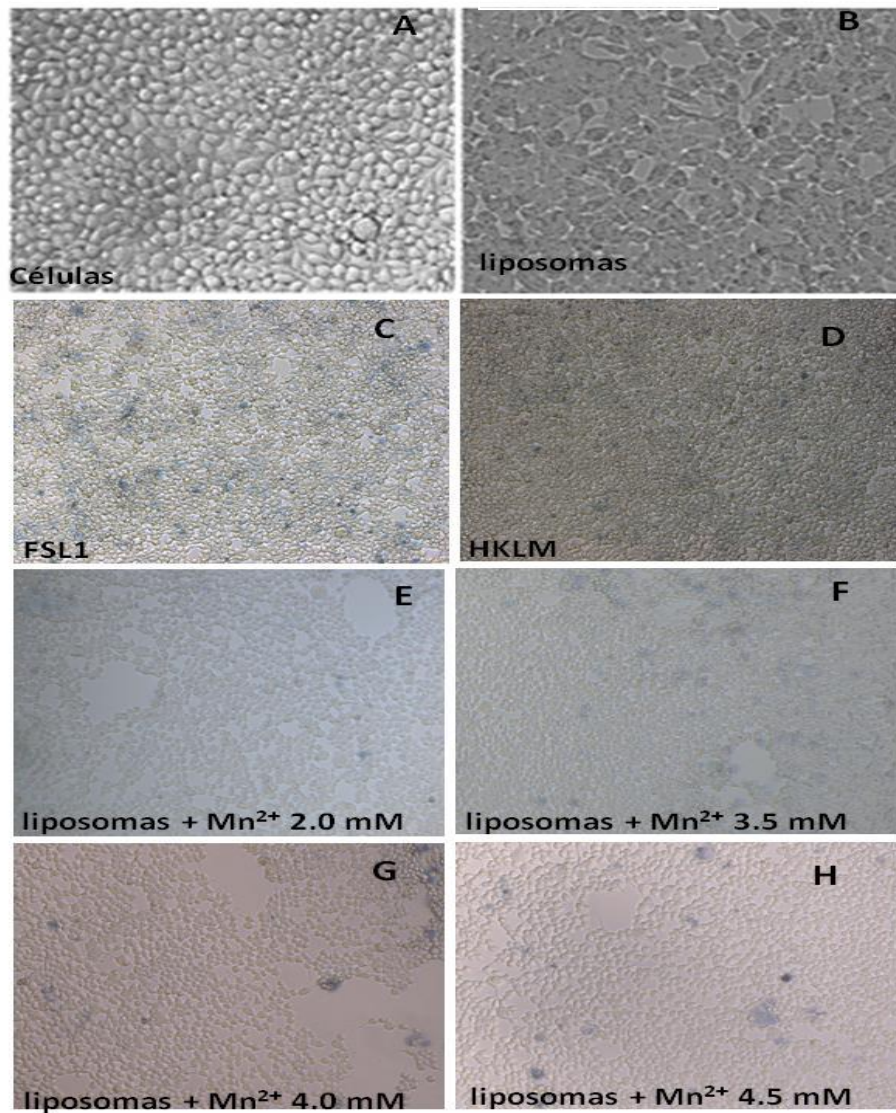
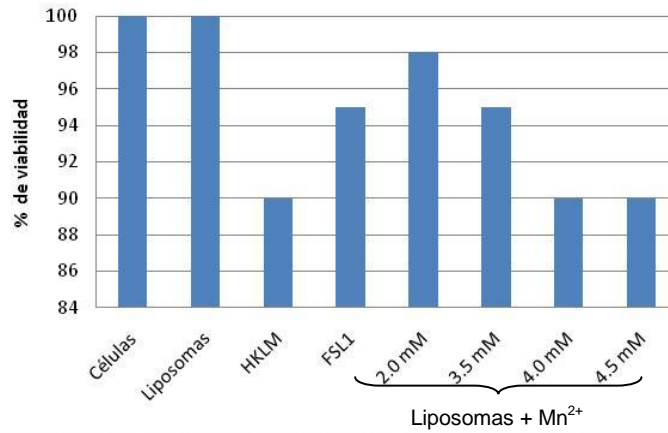


Figura 15. Efecto de los agonistas FSL1 y HKLM y de liposomas con partículas inducidas con Mn²⁺ sobre cultivos de células HEK-293hTLR2/6. Se muestra el histograma que indica la viabilidad con los ligandos analizados y micrografías de células HEK293hTLR2/6 en medio de cultivo (A), e incubadas con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (B), con FSL1 (C); HKLM (D) ó con liposomas tratados con Mn²⁺ a concentraciones de: 2.0 mM (E), 3.5 mM (F), 4.0 mM (G), y 4.5 mM (H).

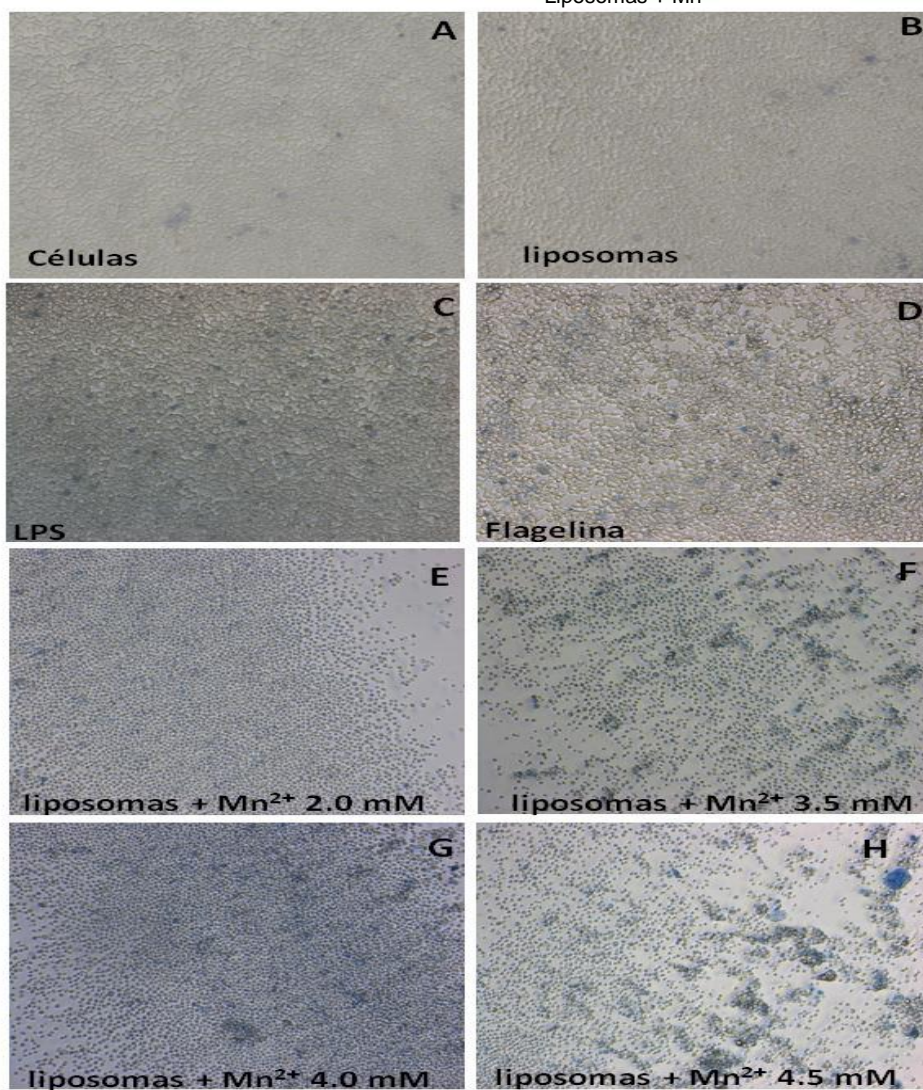
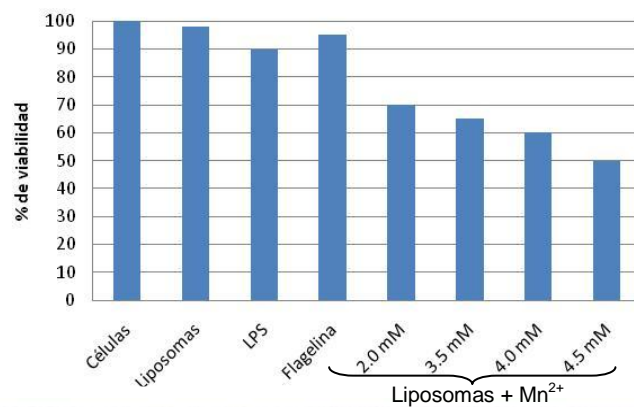


Figura 16. Efecto del LPS, flagelina y de liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn²⁺ sobre cultivos de células HEK-293hTLR5. Se muestra el histograma que indica la viabilidad con los ligandos analizados y micrografías de células HEK293hTLR5 en medio de cultivo (A), e incubadas con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (B), con LPS (C), flagelina (D) ó con liposomas tratados con Mn²⁺ a concentraciones de: 2.0 mM (E), 3.5 mM (F), 4.0 mM (G), y 4.5 mM (H).

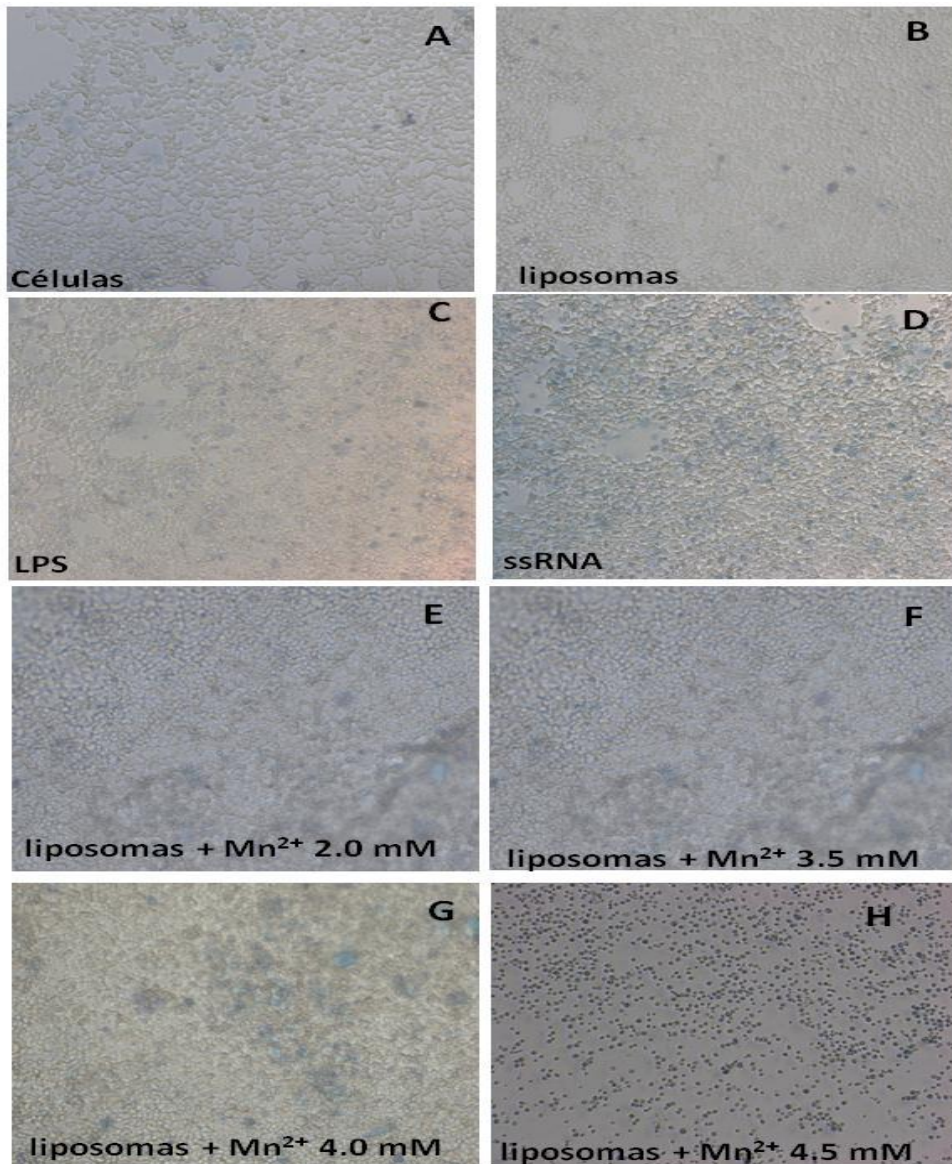
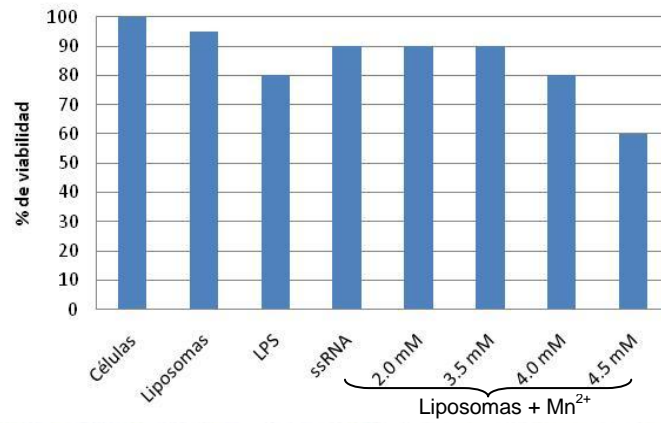


Figura 17. Efecto del LPS, ssRNS40 y liposomas con partículas lipídicas inducidas con Mn²⁺ sobre cultivos de células HEK-293hTLR8. Se muestra el histograma que indica la viabilidad con los ligandos analizados y micrografías de células HEK293hTLR8 en medio de cultivo (A), e incubados con liposomas de PC:PA (B), con LPS (C), ssRNA40 (D) ó con liposomas tratados con Mn²⁺ a concentraciones de: 2.0 mM (E), 2.5 mM (D), 4.0 mM (E), y 4.5 mM (F).

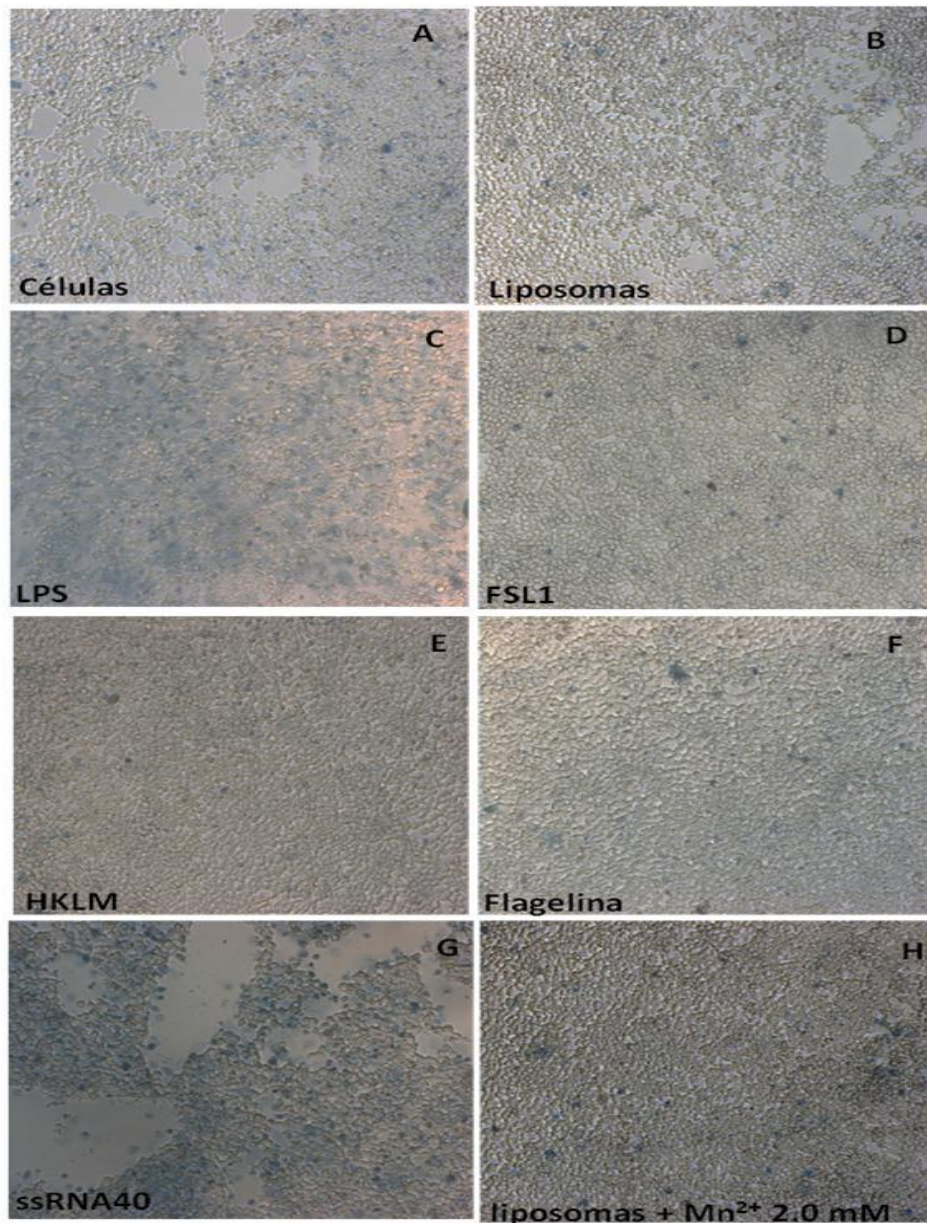
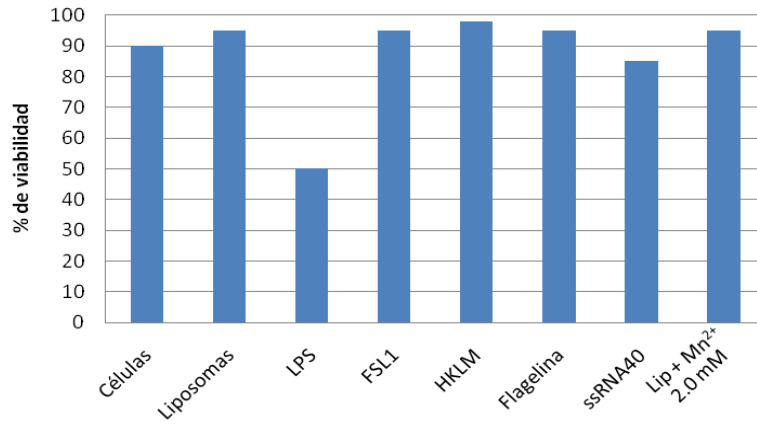


Figura 18. Efecto de las diferentes PAMP's y de liposomas con partículas inducidas con Mn⁴⁺ sobre cultivos de células HEK-293. Se muestra el histograma que indica la viabilidad con los ligandos analizados y micrografías de células HEK293 en medio de cultivo (A), e incubadas con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (B), con LPS (C), FSL1 (D), HKLM (E), flagelina (F), ssRNA40 (G) y con liposomas tratados con Mn²⁺ a concentraciones de: 2.0 mM (H).

III. 3.- Determinación del reconocimiento de partículas lipídicas por los TLR's por la producción de IL-8.

Para esta detección se utilizó la técnica de ELISA de sándwich, en donde se sensibiliza la placa con un anticuerpo monoclonal anti-antígeno, después se adiciona la muestra que contiene el antígeno (IL-8) y finalmente se agrega un segundo anticuerpo monoclonal anti-antígeno unido a peroxidasa, por lo que la IL-8 se detecta indirectamente por la actividad de esta enzima sobre su sustrato.

En estos ensayos se utilizaron las células HEK-293hTLR4, HEK-293hTLR2/6, HEK-293hTLR5 y HEK-293hTLR8, y células HEK-293 que no expresan TLR's, los cultivos se incubaron con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos o con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} 2.0 Mm. Como controles positivos se utilizaron los agonistas naturales de cada uno de los receptores (FSL1 para TLR2/6, HKLM para TLR2, LPS para TLR4, flagelina para TLR5 y ssRNA40 para TLR8), los cultivos también se incubaron con un agonista al que no reconocen. De las células incubadas con los diferentes estímulos se recolectaron los sobrenadantes, se centrifugaron, y las muestras se congelaron a $-20^{\circ}C$ hasta el momento de ser utilizadas para la determinación de IL-8.

Se utilizó el paquete comercial Human IL-8 ELISA BD OptEIA™), primero se construyó la curva estándar con los logaritmos de las absorbancias en el eje de las ordenadas y de las concentraciones en las abscisas (Figura 19).

Primeramente se hizo una cinética de producción de IL-8 durante 12 h en células HEK-293hTLR4, se encontró que la interleucina se producía a partir de 2 h de incubación y prácticamente se encontró durante las 12 h del experimento. Por lo que se decidió hacer los experimentos con 2 h de incubación con los ligandos, ya que la IL-8 alcanzó su máxima producción con este tiempo de incubación.

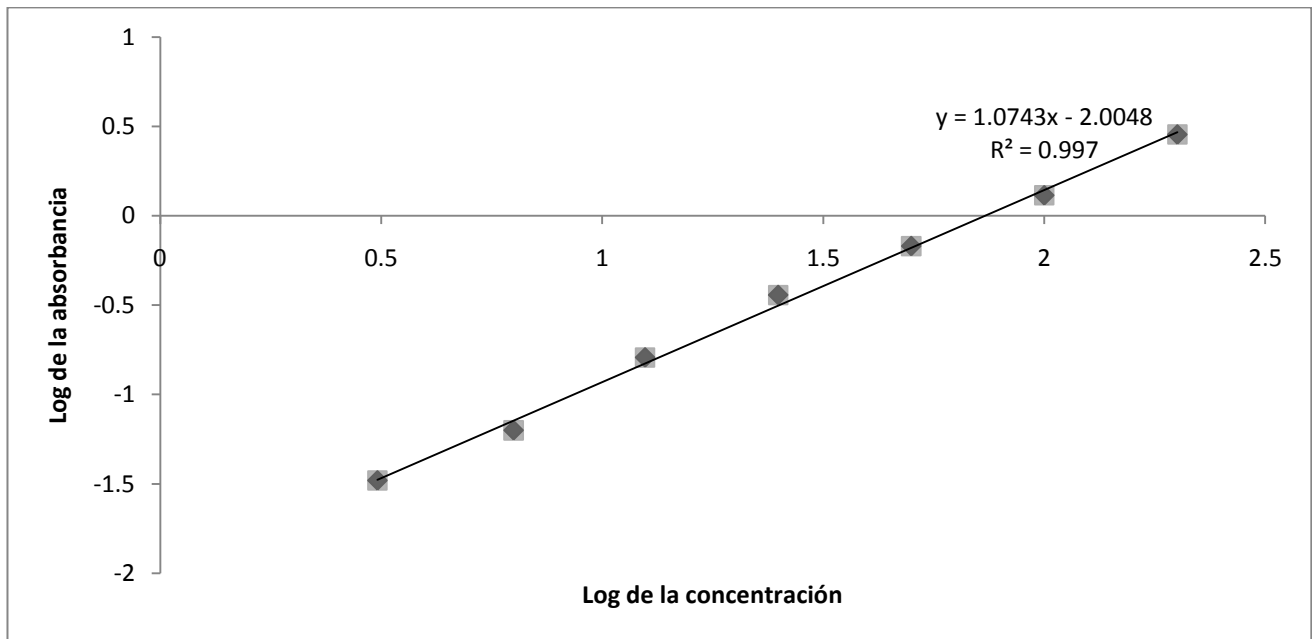


Figura 19.- Curva tipo para la determinación de IL-8. Se muestra la ecuación de la recta en donde se sustituyeron los valores de las absorbancias obtenidas de los sobrenadantes celulares analizados. A los logaritmos de las muestras posteriormente se les determinó el antilogaritmo para obtener la concentración de IL-8, los resultados se obtienen en pg/mL. R2 es el coeficiente de correlación, un valor cercano a 1.0 nos dice que los valores del logaritmo de la absorbancia de los estándares están muy cercanos a una línea recta.

Se obtuvieron lecturas de absorción para el blanco de reactivos (solución de dilución de ensayo) de $A_{s_{450\text{ nm}}} < 0.001$, lo que refleja un bloqueo adecuado de la placa de poliestireno. Las lecturas obtenidas de los controles negativos (células incubadas en medio DMEM completo ó incubadas con liposomas en bicapa) mostraron resultados ligeramente por arriba del blanco de reactivos, probablemente representan la producción basal de IL-8 de las líneas celulares analizadas.

Los resultados obtenidos revelaron producción de IL-8 cuando la línea HEK-293hTLR4, se incubó con LPS el agonista natural de TLR4 (Figura 20C), y disminuyó cuando se agregó polimixina B un inhibidor del LPS (Figura 20D). Se observó una alta producción de IL-8 al incubar las células con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (Figura 20G), de forma similar a los resultados obtenidos con LPS. La producción de IL-8 fue muy escasa en presencia de flagelina (Figura 20F), o de liposomas con partículas incubados con polimixina B (Figura 20E), ó medio DMEM, o con liposomas solos (Figura 20A y B).

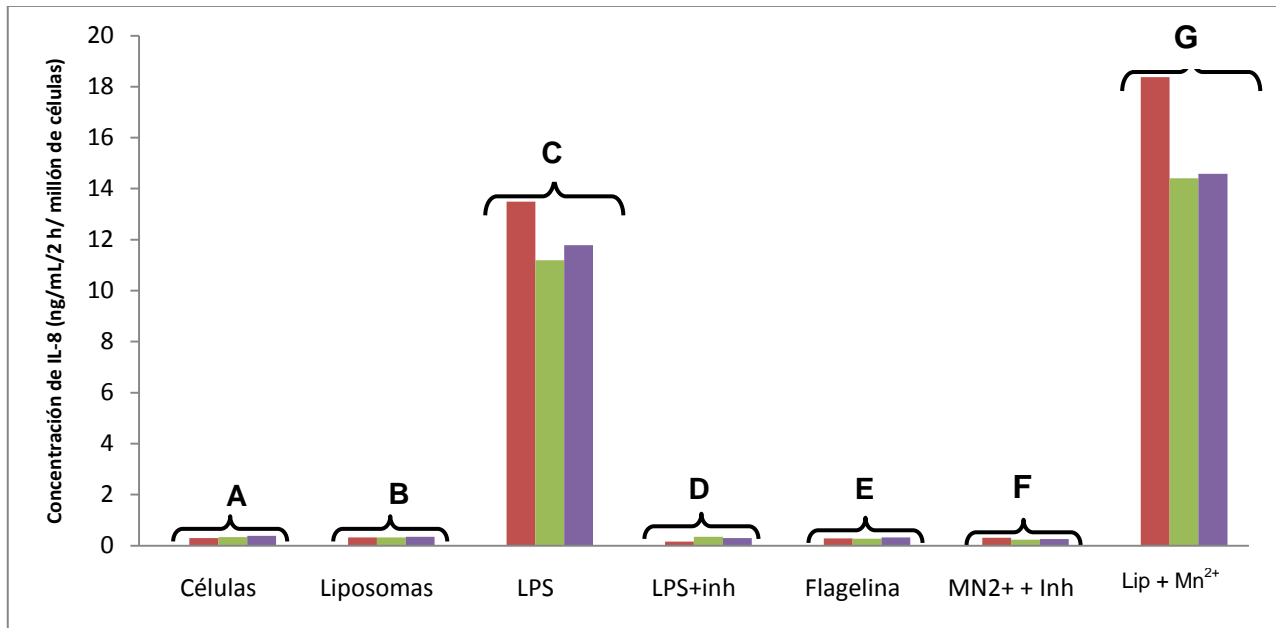


FIGURA 20.- Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293hTLR4. Las células fueron incubadas 2 h con: medio de cultivo (A), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (B), LPS ligando natural del TLR4 (C), LPS + el inhibidor polimixina B (D), liposomas con partículas + polimixina B (D), flagelina (F) y con liposomas con partículas inducidas con Mn²⁺ 2.0 mM (G). Se muestran resultados de tres experimentos.

Adicionalmente se determinó un posible efecto de la polimixina B sobre la formación de las partículas lipídicas en los liposomas. Este estudio se hizo por citofluorometría y se encontró que la polimixina B prácticamente no afectó la formación de las partículas lipídicas porque la granularidad en ausencia y en presencia de polimixina fue muy similar (Figura 21).

El análisis de los sobrenadantes de HEK-293hTLR2/6, mostró una producción de IL-8 menor en relación a la obtenida por las células HEK-293hTLR4, al incubar las células con liposomas con partículas inducidas con Mn²⁺ 2.0 mM (Figura 22F). La IL-8 aumentó con su ligando natural FSL1, resultados similares se obtuvieron con HKLM agonista del TLR2 (Figura 22C, D). La producción de IL-8 fue muy escasa con medio DMEM, con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos o con flagelina (Figura 22B).

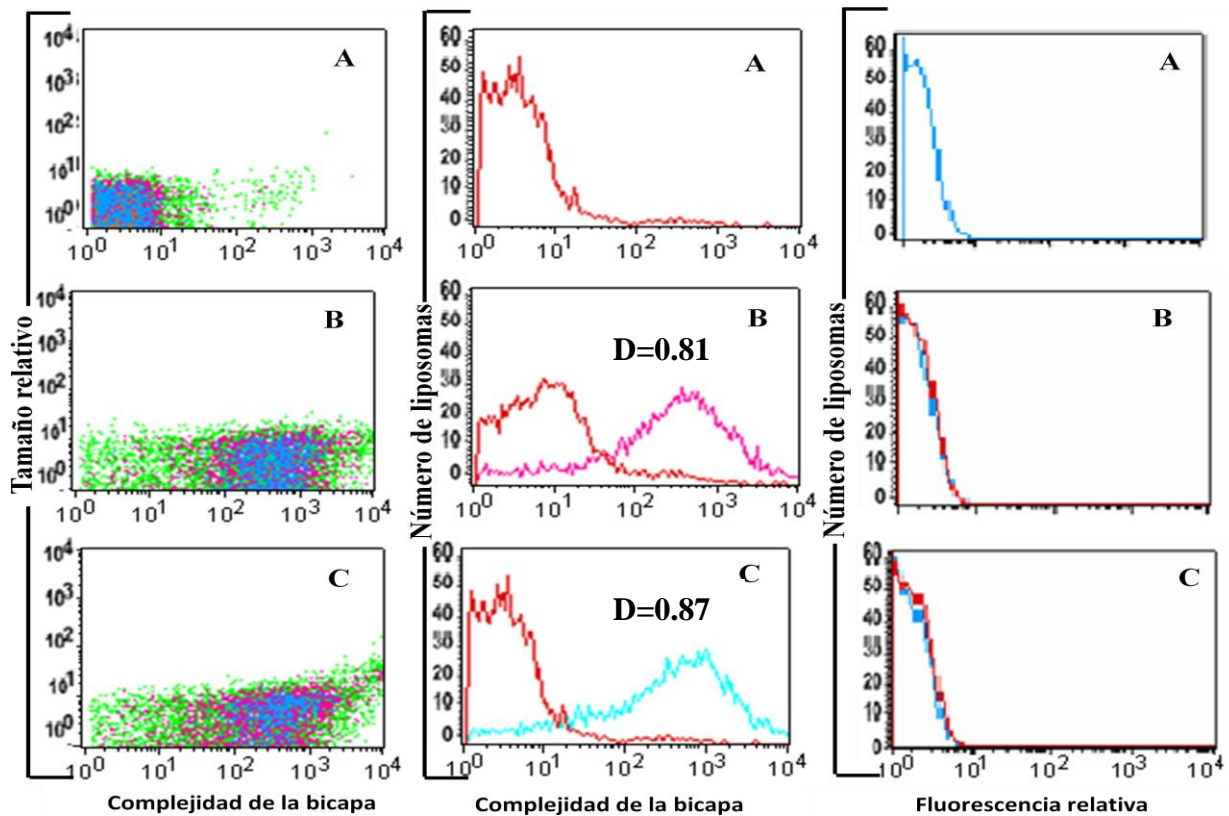


Figura 21. Efecto de la polimixina B en la formación de partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) con Mn^{2+} . Citofluorometría de liposomas con Tris-NaCl (10 mM, 1 mM) a pH 7.0 (A), ó con Mn^{2+} a una concentración de: 5.0 mM (B) y Mn^{2+} 5.0 mM + 5 mg de polimixina B (C).

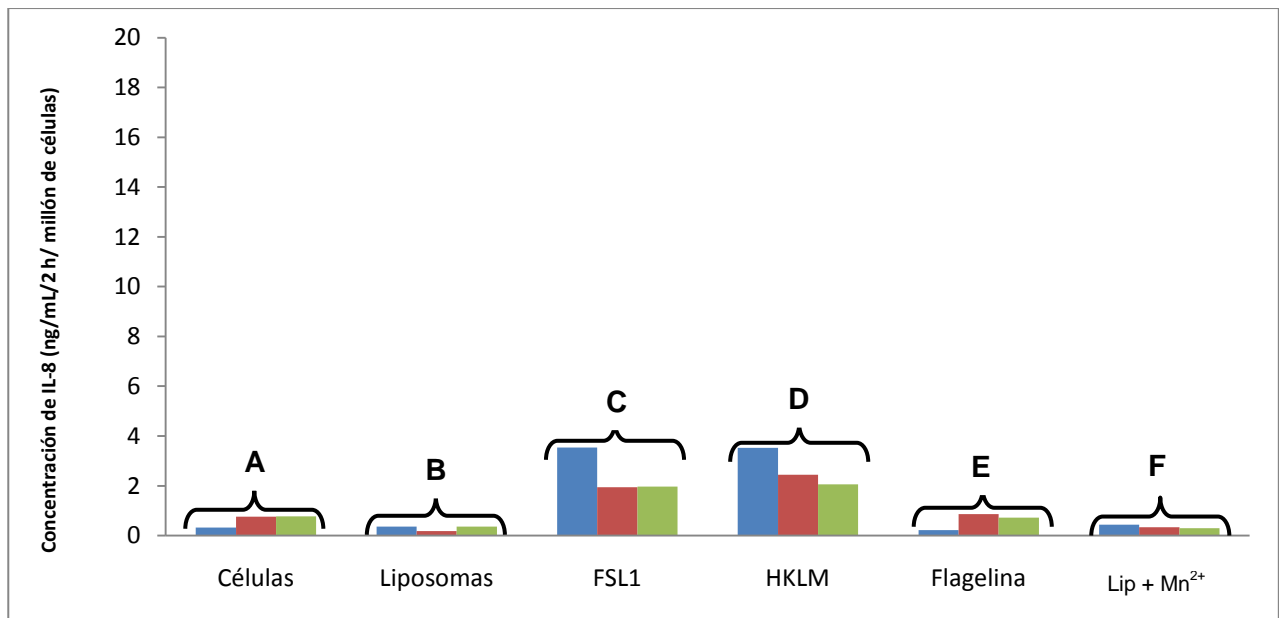


FIGURA 22.- Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293hTLR2/6. Las células fueron incubadas con medio de cultivo (A), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (B), FSL1 ligando natural del TLR2/6 (C), HKLM (D), flagelina ligando del TLR5 (E), y con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (F). Se muestran resultados de tres experimentos.

Para las células HEK-293hTLR5 la producción de IL-8 aumentó al incubarse con flagelina el ligando del TLR5 (Figura 23D), y fue muy escasa cuando los cultivos se incubaron con medio DMEM, o con liposomas solos, con LPS, o liposomas con Mn^{2+} 2.0 mM (Figura 23A, B, C y E).

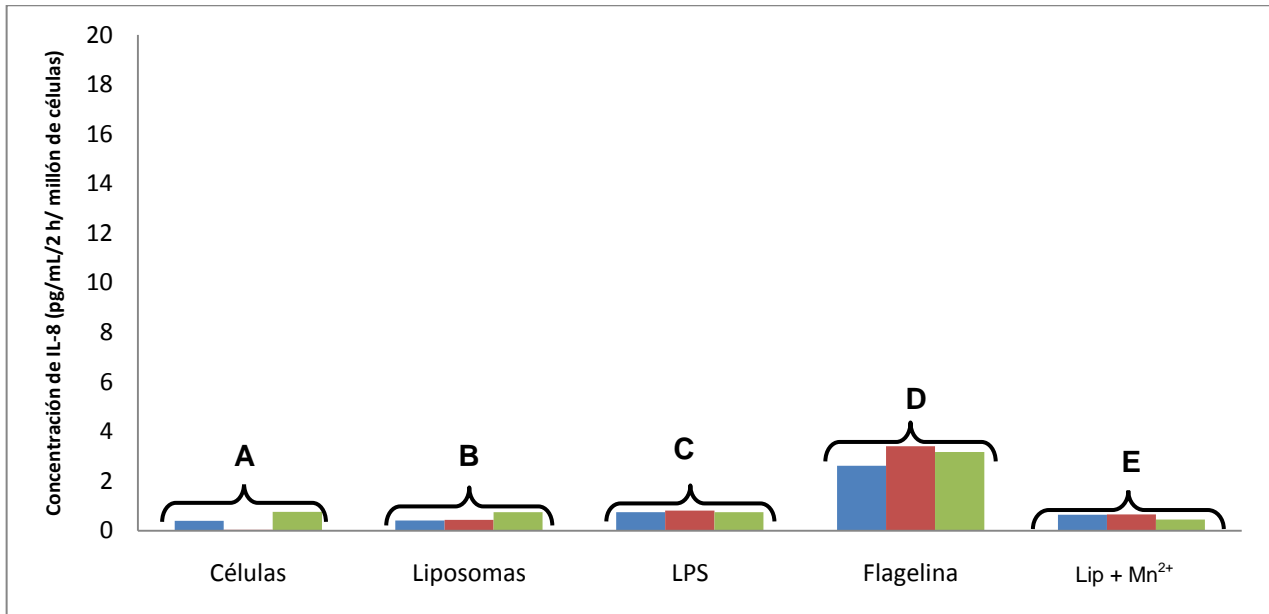


FIGURA 23.- Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293hTLR5. Las células fueron incubadas 2 h con medio de cultivo (A), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (B), LPS (C), flagelina ligando del TLR5 (D), y con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (E). Se presentan resultados de tres experimentos.

La cuantificación en células HEK-293hTLR8 incubadas con su ligando ssRNA40 mostró una alta concentración de IL-8 (Figura 24D), en contraste la producción de IL-8 fue muy escasa al incubarse con liposomas con Mn^{2+} 2.0 mM (Figura 24E), o con medio DMEM o liposomas solos o con LPS (Figura 24A, B, C).

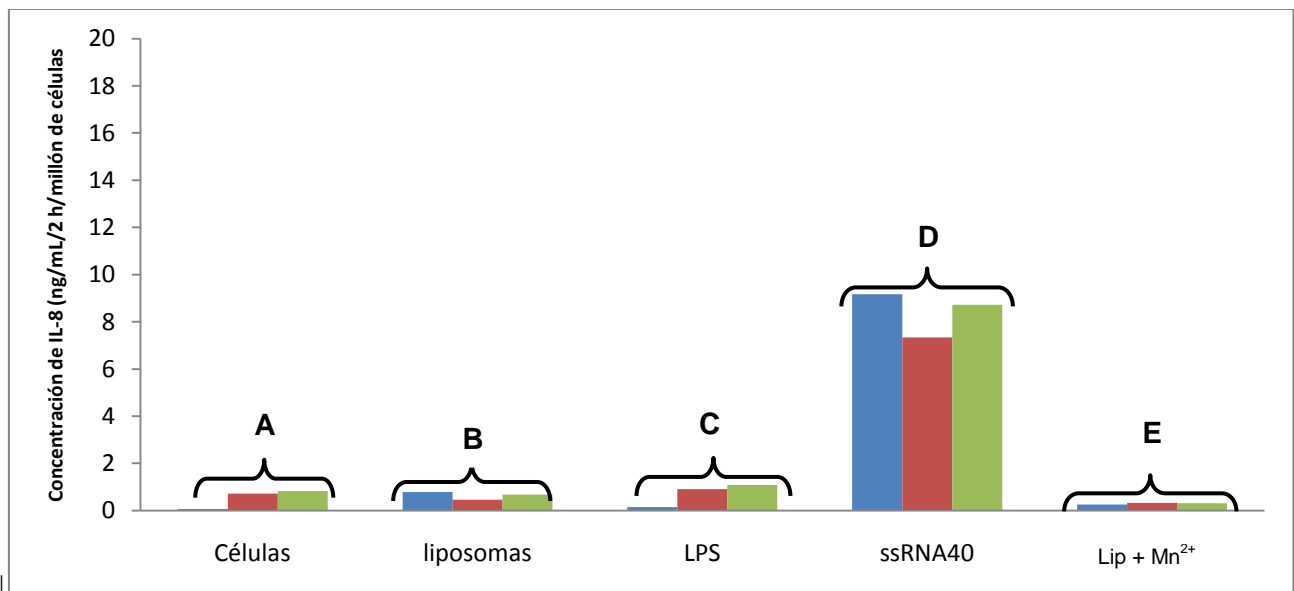


FIGURA 24.- Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293hTLR8. Las células fueron incubadas 2 h con medio de cultivo (A), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (B), LPS (C), ssRNA40 ligando del TLR8 (D), y con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (E). Se muestran resultados de tres experimentos.

Finalmente se analizaron las células HEK-293 que no expresan TLR's, estos cultivos se incubaron con medio DMEM, con liposomas solos, LPS, FSL-1, HKLM, flagelina, ssRNA40 o liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (Figura 25H), en todos los casos la producción de IL-8 fue muy baja con respecto a las células que expresan un TLR y su agonista (Figura25A-H).

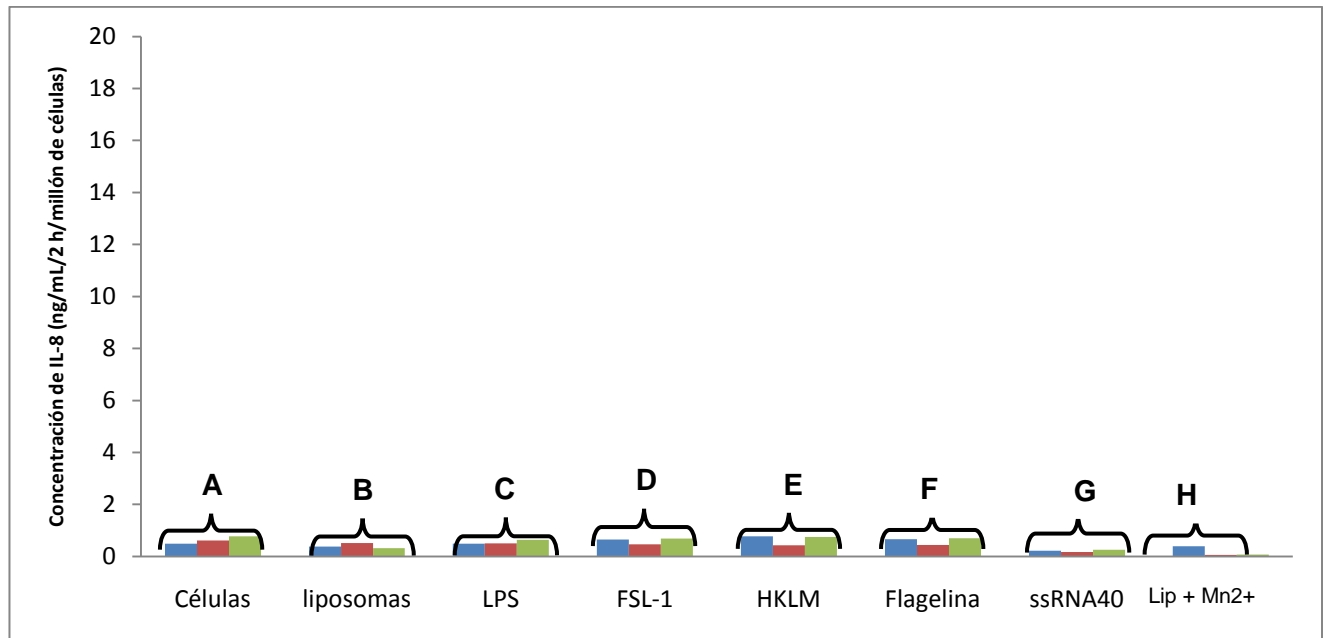


FIGURA 25.-Producción de IL-8 por la línea celular HEK-293. Las células fueron incubadas 2 h con medio de cultivo (A), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (B), LPS (C), FSL-1 (D), HKLM (E), flagelina (F), ssRNS40 (G) y con liposomas incubados con Mn^{2+} 2.0 mM (H). Se muestran resultados de tres experimentos.

Para confirmar estos resultados se llevó a cabo la transfección de las líneas celulares con lipocomplejos de lipofectamina-pNiFty-Luc, que es una técnica más sensible que la de ELISA, para determinar el reconocimiento de un ligando por los receptores tipo Toll.

III. 4.- Aislamiento y purificación del plásmido pNiFty-Luc.

Se purificó el plásmido pNifty-Luc, el cual contiene un sitio con cinco sitios de unión para el NF- κ B, que es el factor de transcripción que se activa posterior al reconocimiento de un agonista por su TLR (Figura 4).

El primer paso consistió en obtener las células competentes de *E. coli* GT120 que produjeran el plásmido pNiFty-Luc por el método de Cohen *et. al.*, 1972. Posteriormente se seleccionaron las células que crecieron en medio sólido Luria-ampicilina, y se procedió a la obtención del pNiFty-Luc de 1 L de cultivo en Luria-ampicilina con cloramfenicol, con el sistema Ultra Clean de los laboratorios MoBio.

La identificación del DNA plásmidico se hizo por electroforesis en geles de agarosa en donde se encontró un 90% de la forma molecular I superenrollada del DNA, que es la forma biológicamente activa, lo que indica la buena calidad del plásmido para utilizarlo en la transfección de las células HEK-293h que expresan los diferentes TLR's (Figura 26).

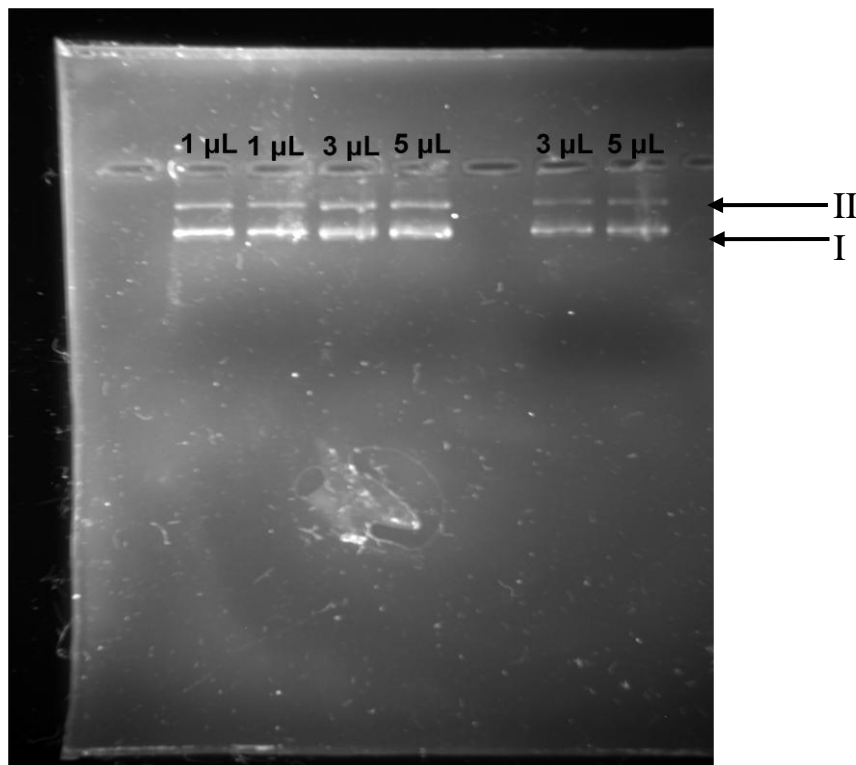


Figura 26.- Electroferograma del plásmido pNiFty-luc. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1%, se indican las concentraciones del DNA plásmidico utilizados en cada carril, la forma molecular más abundante la I o superenrollada.

III. 5.- Determinación del reconocimiento de partículas lipídicas por los TLR'S por la activación de NF-κB.

La activación de NF-κB se determinó por la actividad de la luciferasa, después de la transfección celular con Lipofectamina-NiFty-Luc. Esta es una técnica confirmatoria del reconocimiento de los TLR's por sus ligandos naturales, así como de los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos o con partículas lipídicas; cabe destacar que esta metodología es más sensible que la ELISA para IL-8.

Primeramente se hizo la transfección con Lipofectamina-pNiFty-Luc de las células HEK-293h-TLR4, HEK-293h-TLR2/6, HEK-293h-TLR5, HEK-293h-TLR8 y HEK-293 (que no expresan TLR's) para después adicionar los diferentes agonistas, así como liposomas solos o con partículas lipídicas; posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular y se usó el sistema de Promega para ensayo de la luciferasa. La emisión de luz se determinó en el luminómetro Synergy 2 BioTek. Como blanco de reactivos se utilizaron la solución de lisis 1X los lisados de las líneas celulares analizadas.

Las células HEK-293hTLR4 presentaron lecturas superiores a 5500 cuentas por minuto, al incubar con liposomas con partículas, lo que indica el reconocimiento del TLR4 hacia los liposomas con estas estructuras lipídicas (Figura 27G), con LPS el agonista natural se obtuvieron cuentas de emisión de luz de 2780 (Figura 27F). En cambio con los lisados celulares, liposomas solos, LPS + polimixina B y polimixina B + liposomas con partículas se obtuvieron cuentas ligeramente por arriba del blanco de reactivos, que indica que no hubo activación de NF-κB (Figura 27C, D y E). En el caso de las células HEK-293hTLR4 estos experimentos se realizaron en dos diferentes ocasiones.

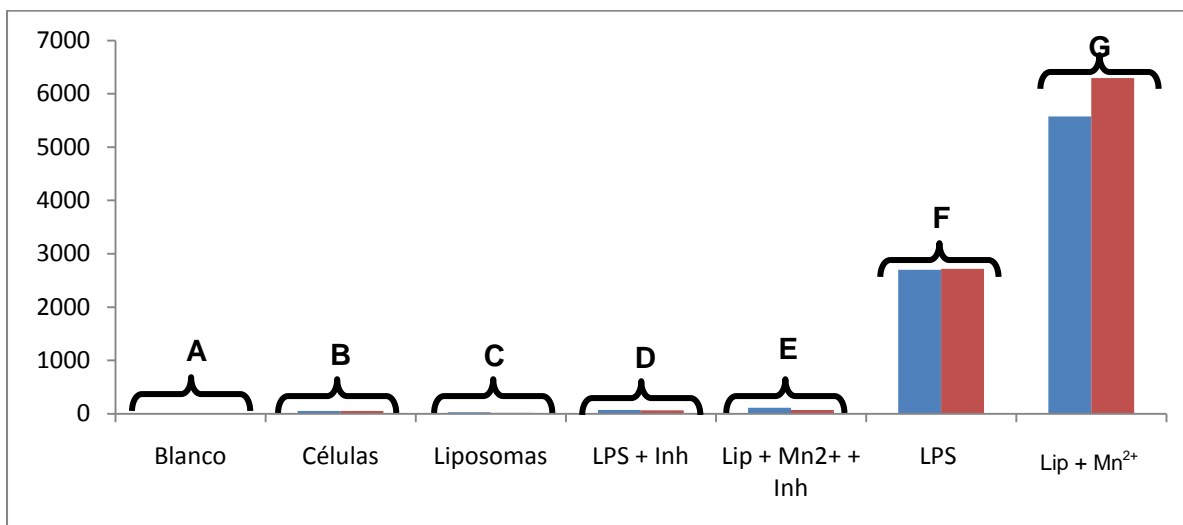


FIGURA 27.- Activación de NF-κB en la línea celular HEK-293hTLR4. Blanco de reactivos (A), las células fueron incubadas 24 h con medio de cultivo (B), con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (C), LPS + polimixina B (D), con liposomas con partículas + polimixina B (E), con LPS ligando natural del TLR4 (F) y con liposomas con partículas inducidas con Mn²⁺ 2.0 mM (G). Se presentan los resultados de dos experimentos.

La emisión de luz en las células que expresan el dímero HEK-293hTLR2/6, fue por arriba del blanco de reactivos al analizar el reconocimiento del TLR2/6 por su ligando natural la lipoproteína sintética FSL1 (Figura 28A y D), con liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato con partículas lipídicas la emisión de luz fue por debajo del agonista natural del TLR2/6 (Figura 28E). Se registraron lecturas de emisión de luz ligeramente por arriba del blanco en los lisados de células y con liposomas solos (Figura 28B y C).

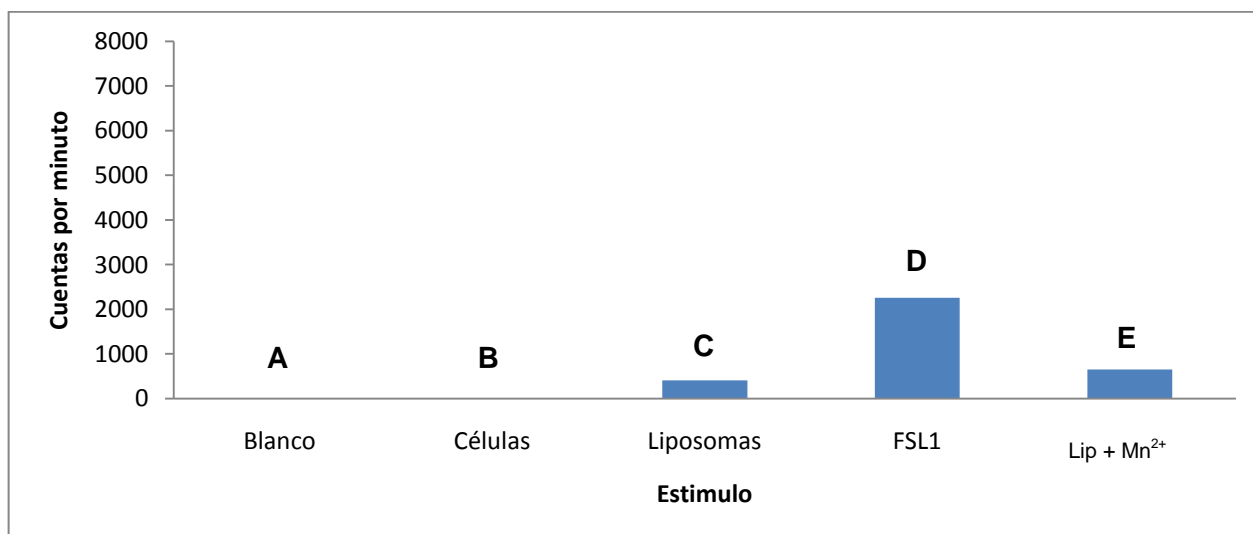


FIGURA 28.- Activación de NF-κB en la línea celular HEK-293hTLR2/6. Blanco de reactivos (A), las células fueron incubadas 24 h con medio de cultivo (B), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (C), FSL1 ligando natural de TLR2/6 (D), y con liposomas con partículas inducidas con Mn²⁺ 2.0 mM (E).

La actividad de la luciferasa de las células HEK-293hTLR5 por el reconocimiento de flagelina su ligando natural fue por arriba del blanco (Figura 29A y D), con células con medio DMEM, liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos o con partículas lipídicas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM la emisión de luz fue muy escasa por arriba del blanco de reactivos (Figura 29B, C y E).

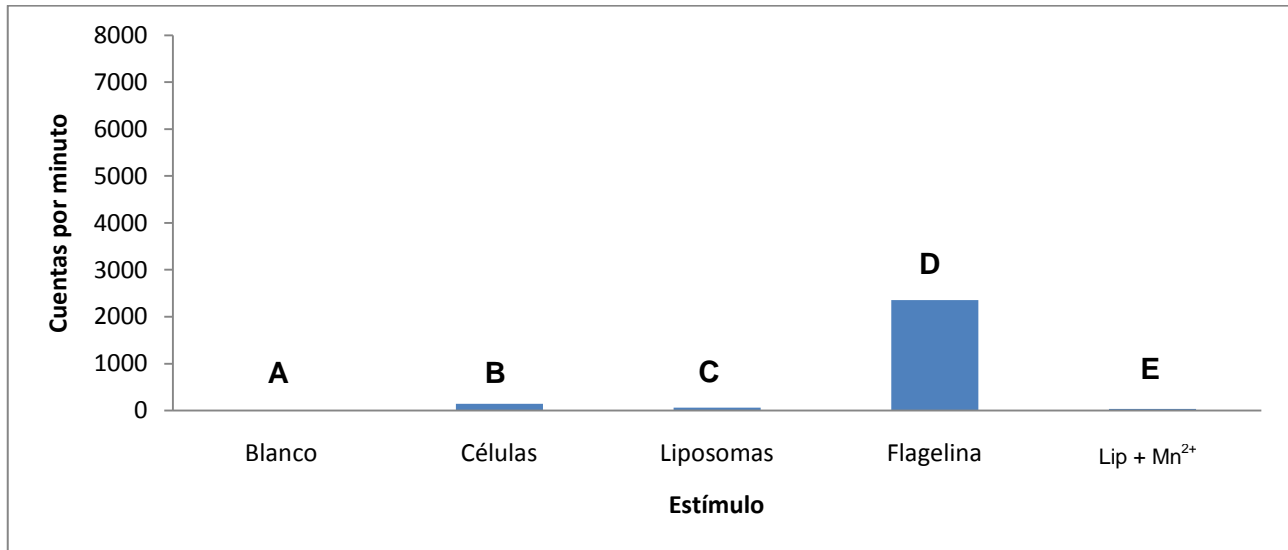


FIGURA 29.- Activación de NF- κ B en la línea celular HEK-293hTLR5. Blanco de reactivos (A), las células fueron incubadas 24 h con medio de cultivo (B), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (C), flagelina su ligando natural (D), y con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (E).



FIGURA 30.- Activación de NF- κ B en la línea celular HEK-293hTLR8. Blanco de reactivos (A), las células fueron incubadas 24 h con medio de cultivo (B), liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato solos (C), ssRNA40 su ligando natural (D), y con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (E).

Finalmente se analizaron las células HEK-293 (que no expresan TLR's) al incubarlas con medio DMEM, liposomas solos, HKLM, FSL-1, LPS, flagelina, ssRNA40 o con liposomas con partículas inducidas con Mn^{2+} 2.0 mM (Figura 31B-I), en todos los casos la emisión de luz fue muy escasa como en el blanco de reactivos (datos no mostrados).

Estos resultados comprueban los obtenidos con la producción de IL-8, respecto a que el TLR4 de las células HEK-293hTLR4 reconoce a las partículas lipídicas en liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato inducidas con Mn^{2+} , seguido por las células HEK-293hTLR2/6; en tanto que los receptores de las células HEK-293HTLR5 y HEK-293TLR8 con ambas metodologías, no mostraron reconocimiento por las partículas lipídicas.

En las células HEK-293 (que no expresan algún TLR) que se usaron precisamente como control negativo del reconocimiento por receptores tipo "Toll" la producción de IL-8 o la activación de NF- κ B fueron muy escasas.

IV. DISCUSIÓN

Los fosfolípidos aniónicos pueden adoptar asociaciones moleculares diferentes a la de bicapa que es la que integra la matriz de las membranas celulares. Estas asociaciones moleculares son transitorias, por microscopía electrónica se observan como protuberancias sobre la superficie lisa de la bicapa, por lo que se les denomina partículas lipídicas; al hacerse permanentes, inducen la formación de anticuerpos anti-partículas que participan en el desarrollo de una enfermedad autoinmune en ratones parecida al lupus humano (Baeza *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006; Baeza *et al.*, 2007). Adicionalmente, se han detectado anticuerpos anti-partículas en sueros de pacientes con LES y LES secundario al SAAF (Lara, 1999; España, 2005). Por lo que es importante determinar el mecanismo de reconocimiento de los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas por el sistema inmunitario, tanto porque es un mecanismo que reconoce a moléculas de fosfolípidos que se encuentran en una asociación tridimensional específica, como por la participación de los anticuerpos anti-partículas lipídicas en el desarrollo de una enfermedad autoinmune en el ratón y posiblemente en el humano.

El modelo experimental de lupus producido en ratones BALB/c y NIH presenta varias características del LES humano y del lupus inducido por fármacos, enfermedades que forman parte del síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, caracterizado por la presencia de autoanticuerpos entre ellos anti-cardiolipina, anticoagulantes y anti-partículas lipídicas (Asherson *et al.*, 1996; Asherson, 2005; Baeza *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006; Baeza *et al.*, 2007).

El lupus experimental se desarrolló por la administración en ratones hembras BALB/c y NIH de los inductores de partículas lipídicas cloropromacina y procainamida tanto solos o al formar estas partículas en liposomas. Los ratones produjeron anticuerpos contra los lípidos asociados en partículas y después de cuatro semanas produjeron anticuerpos anti-cardiolipina, anti-nucleares y anticoagulantes; presentaron alteraciones histológicas

y depósitos de complejos inmunes entre la dermis y la epidermis en forma similar a la banda lúpica descrita en el humano; así como alteraciones renales y depósitos de complejos inmunes en la pared de los capilares y en el mesangio renal (Baeza *et al.*, 2004).

Para analizar los mecanismos que llevan al reconocimiento y después a la producción de los anticuerpos contra el arreglo tridimensional de fosfolípidos en partículas lipídicas, se estudió el papel de los receptores tipo Toll. Porque estos receptores reconocen a patrones de moléculas de superficie que se encuentran altamente conservados en protozoarios, bacterias, hongos y virus (PAMP's), así como a diferentes moléculas endógenas propias del organismo y a moléculas endógenas alteradas o dañadas (Seon y Matzinger, 2004). Los TLR alertan al organismo de una posible infección, porque al reconocer a su ligando desencadenan la activación de la respuesta inflamatoria y la producción de citocinas, interferones del grupo I, quimiocinas, moléculas de superficie celular y receptores quimiotácticos, que preceden a la inducción de la respuesta inmune adaptativa (Krishnan *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2008); también se incrementa en células fagocíticas la propiedad de presentar antígenos microbianos a las células T (Sioud *et al.*, 2005; Krishnan *et al.*, 2007).

Se analizaron TLR del grupo que se expresan en la membrana celular como TLR2/6, TLR4, y TLR5 y de los TLR endosomales a TLR8. El TLR4 reconoce ligandos o agonistas que tienen grandes regiones hidrofóbicas a través de su región no-polar de repetidos ricos en leucina; entre ellas, PAMP como el LPS de bacterias gram negativas, proteínas de fusión del virus respiratorio sincitial y las fimbrias bacterianas. También reconoce moléculas endógenas como el ácido hialurónico y el fibrinógeno de la matriz extracelular, proteínas del núcleo que son liberadas durante la necrosis, la β -defensina y la proteína de choque térmico HSP60 ambas producidas como respuesta a procesos infecciosos; además de moléculas endógenas dañadas (Seong y Matzinger, 2004; Ibeagha-Awemu *et al.*, 2008; Sumbayev, 2008). Si bien la variedad de ligandos del TLR4 es amplia, en todos ellos a excepción del ácido hialurónico hay grandes regiones

no polares; sin embargo el LPS es su agonista más fuerte (Park *et al.*, 2009). Como el TLR4 reconoce las regiones no-polares de sus ligandos, en particular la región de cadenas de hidrocarburo del lípido A del LPS bacteriano, consideramos que pueda participar en el reconocimiento de fosfolípidos en el arreglo molecular de partículas lipídicas, en donde se presentan también grandes regiones no-polares de hidrocarburos.

El dímero TLR2/6 reconoce entre otros ligandos a lipoproteínas y a lipoarabinomanana de origen bacteriano (Krishnan *et al.*, 2007; Ellass *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008), ya que ambos ligandos tienen una región lipídica es posible que TLR2/6 también participe en el reconocimiento de los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas. Como controles negativos se consideraron el TLR5 que tiene como ligando natural la flagelina de bacterias Gram negativas y el TLR8 que reconoce RNA de una cadena de origen viral.

Para evaluar el reconocimiento de lípidos en partículas lipídicas por los TLR, se usaron como ligandos a los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato (2:1) que llevan partículas inducidas con Mn^{2+} , clorpromacina o procainamida. La formación de las partículas se comprobó por citofluorometría de flujo, se utilizó la estadística de Kolgomorov-Smirnov que analiza en forma comparativa la diferencia (D) en la granularidad relativa de los liposomas con y sin partículas lipídicas (Aguilar, *et al.*, 1999; Baeza *et al.*, 2004). El aumento en la granularidad observado en presencia de estas partículas, se atribuye a que estas estructuras producen una mayor dispersión del rayo láser que los lípidos asociados en una bicapa lisa (Baeza *et al.*, 1995; 2004). La clorpromacina fue el mejor inductor de partículas, ya que induce la formación de dichas estructuras a concentraciones más bajas y produce el mayor desplazamiento en la granularidad liposomal. Es importante indicar que las partículas lipídicas inducidas por Mn^{2+} , clorpromacina y procainamida tienen un arreglo estructural muy semejante entre sí, porque las tres son reconocidas por el mismo anticuerpo monoclonal (Aguilar, 1997).

Como células que presentan receptores tipo “Toll” y que pueden reconocer como ligando a los lípidos en partículas lipídicas, se utilizaron líneas celulares derivadas de HEK-293 que expresan un solo TLR: HEK-293hTLR4, HEK-293hTLR2/6, HEK-293hTLR5 y HEK-293hTLR8 (Miyake, 2003); las células HEK-293 se utilizaron como control negativo. Sin embargo las líneas que expresan un TLR fueron muy sensibles a los tres inductores de partículas Mn^{2+} , cloropromacina y procainamida, así como a los liposomas que llevan partículas inducidas por cloropromacina y procainamida; no obstante, mostraron una viabilidad muy cercana al 100% con liposomas con partículas inducidas por el Mn^{2+} , por lo que en el presente estudio se seleccionaron a estos liposomas como portadores de los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas. Adicionalmente, como las partículas inducidas por los tres fármacos son reconocidas por el mismo anticuerpo monoclonal (Aguilar, 1997), puede considerarse que los resultados obtenidos con las inducidas con Mn^{2+} serían equivalentes a los que se obtendrían con las partículas inducidas por cloropromacina y procainamida; esto es importante porque como se ha indicado ambos fármacos producen una enfermedad parecida al lupus en el humano. Así mismo, cabe señalar que los fármacos procainamida y cloropromacina no afectaron la viabilidad de las células HEK-293 a concentraciones similares a las usadas en este estudio (Wong, 2008), lo que marca una diferencia adicional con las células transfectadas que expresan un TLR específico.

Las células HEK-293 que expresan un solo TLR, representan una herramienta de gran utilidad en el estudio de las moléculas que pueden ser reconocidas por estos receptores membranales. Porque al ocurrir el reconocimiento molecular de un TLR por su ligando en la cara externa de la membrana celular, se desencadena al interior de la célula una cascada de señalización, que a través de la activación de sus diferentes componentes (entre ellos IRAK, TRAF6, $I\kappa B$ cinasa) se llega a la activación de NF- κB . Este es un factor que incrementa la transcripción de genes de la respuesta inflamatoria, entre ellos de IL-8 (Abbas *et al.*, 2007; Premkumar *et al.*, 2010). En estos procesos en cascada, el reconocimiento de un TLR por un ligando específico lleva a la producción de un gran número de moléculas de IL-8 que pueden ser detectadas por ELISA. Además, el

reconocimiento molecular puede confirmarse al determinar la activación de NF- κ B en las células HEK-293 que reconocen al ligando. Las células primeramente se transfectan con el plásmido pNiFty-Luc que tiene el gen de luciferasa bajo el control de un promotor que debe unirse con cinco moléculas de NF- κ B para que se exprese este gen, y después se agrega el ligando de prueba. Al ser reconocido el ligando se desencadena la cascada que lleva a la activación de NF- κ B y a la producción posterior de luciferasa; como esta enzima se detecta por la emisión de luz es un método más sensible que el de ELISA para IL-8, en donde se mide la actividad de la peroxidasa por la obtención de un producto colorido.

Nuestra hipótesis respecto a que el TLR4 pueda reconocer a los lípidos asociados en partículas lipídicas, se basa en la gran similitud estructural entre las partículas lipídicas y el lípido A del LPS. El LPS forma en el medio acuoso arreglos lamelares (bicapas) o bien micelares cuando la forma molecular de su lípido A es cilíndrica, en contraste forma arreglos semejantes a la fase H_{II} con el lípido A en forma cónica (Seydel *et al.*, 1989) en esta fase quedan expuestas sus cadenas hidrocarbonadas al medio acuoso. La proteína que se une al LPS (LBP), una proteína plasmática, facilita la transferencia del LPS de estos agregados a CD14, una proteína membranal, que a su vez transfiere el LPS al complejo TLR4/MD2. Cinco de las seis cadenas hidrocarbonadas del lípido cónico A se unen a un sitio hidrofóbico del co-receptor MD2, y la cadena remanente se une al TLR4 (Park *et al.*, 2009), con lo que se lleva a cabo el reconocimiento de este ligando. Posiblemente el reconocimiento de los lípidos asociados en partículas lipídicas se lleve a cabo en forma similar al del lípido A, porque los lípidos que forman la micela invertida de la partícula son de forma molecular cónica y se encuentran en el arreglo o fase H_{II}, si bien hay más de seis cadenas de hidrocarburo en la micela invertida; estas cadenas quedarían expuestas al medio acuoso al separarse la monocapa que los cubre, quizá por competencia con la LBP (Figura 30) y después serían transferidos por la propia LBP al complejo TLR4/MD2, en donde el reconocimiento sería similar al del lípido A.

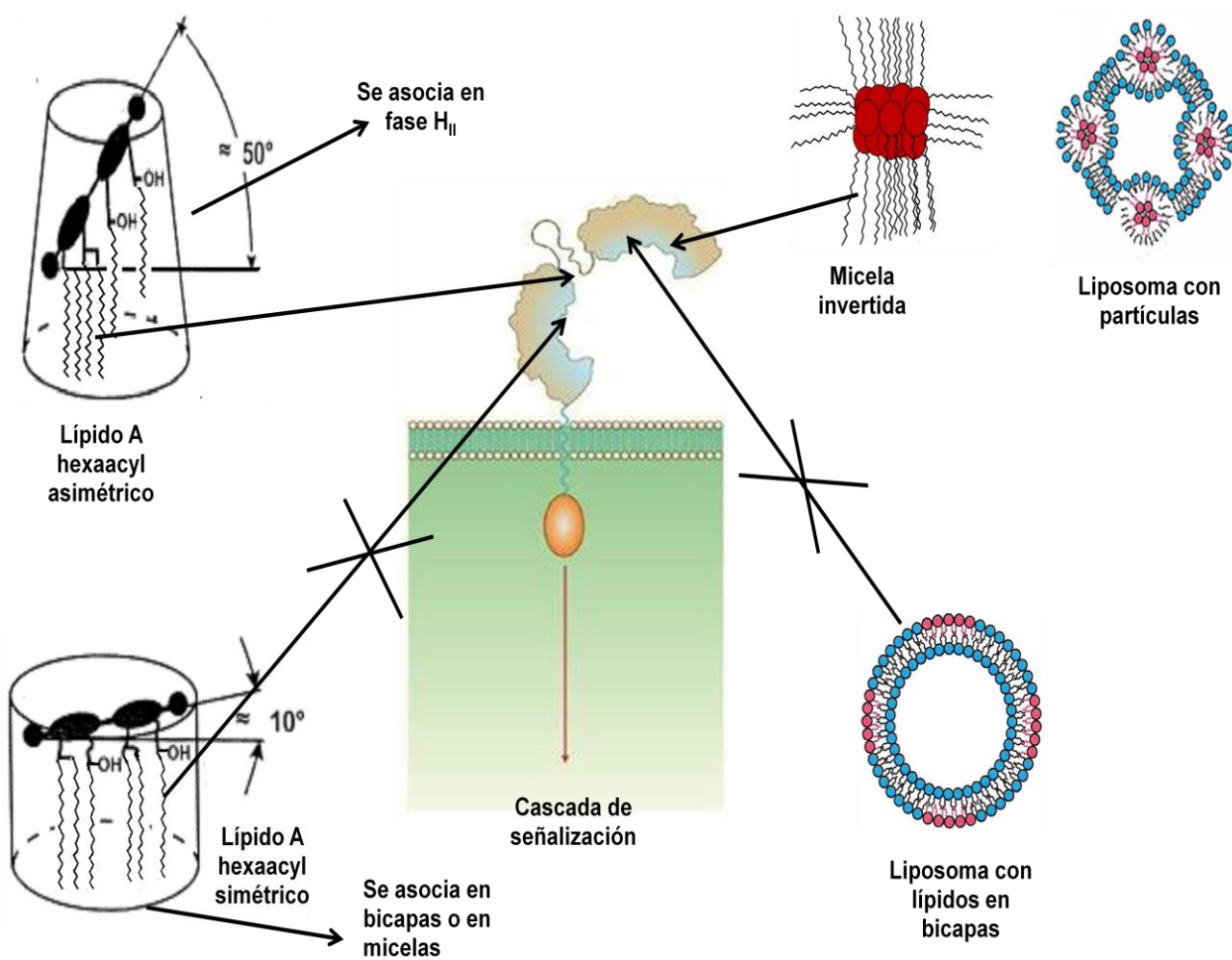


Figura 31. Esquema del TLR4, del lípido A y de los lípidos asociados en partículas lipídicas. Se muestran las formas moleculares cónica y cilíndrica del lípido A y se indican las asociaciones moleculares en fase hexagonal H_{II} y en bicapas o en micelas que pueden tener en el medio acuoso (Park *et al.*, 2009). También se muestra el esquema de un liposoma con partículas lipídicas en donde está expuesta parte de una micela invertida, y de la micela invertida sola para apreciar el arreglo cónico de seis cadenas hidrocarbonadas no polares de los fosfolípidos aniónicos que la forman; además de presenta un liposoma con los lípidos asociados en bicapa. El lípido A en forma cilíndrica y los liposomas en bicapa no son reconocidos por el TLR4

La hipótesis propuesta se confirmó al demostrar en este trabajo, que el TLR4 también reconoce a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas y no a los fosfolípidos asociados exclusivamente en bicapa. De este hallazgo podemos concluir, que la región de cadenas hidrocarbonadas no-polares de los fosfolípidos de la micela invertida, comparte un arreglo tridimensional parecido a la región no-polar cónica de las cadenas hidrocarbonadas del lípido A, y que este arreglo tridimensional hidrofóbico y de forma cónica es el reconocido por el TLR4 de las células HEK-293hTLR4. Por lo que es

probable que el TLR4 de las células presentadoras de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas también pueda reconocer a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas. Es importante destacar que la producción de IL-8 resultante del reconocimiento de liposomas con partículas lipídicas como ligando, fue prácticamente igual a la obtenida con el LPS en las células HEK-293hTLR4; en cambio el reconocimiento medido por la activación de NF- κ B fue 45% mayor en los liposomas con partículas lipídicas con respecto al LPS.

La cantidad de IL-8 producida por el reconocimiento del LPS o de los lípidos asociados en partículas lipídicas fue en promedio de 0.190 pg/mL/24 h/millón de células, que puede compararse con la que producen células de cáncer de mama cuando la producción de IL-8 es estimulada por TNF- α , de 0.247 pg/mL/24 h/millón de células (De Larco *et al.*, 2001).

Un apoyo importante respecto a que el TLR4 reconoce arreglos tridimensionales similares entre el LPS y la partícula lipídica, es el hecho de que el antibiótico polimixina B que inhibe el reconocimiento del LPS por TLR4, también inhibió el reconocimiento de las partículas lipídicas por este receptor. Así mismo, se demostró que las partículas lipídicas permanecen en los liposomas en presencia de la polimixina B, por lo que la inhibición del reconocimiento de las partículas en presencia de este antibiótico posiblemente es por un mecanismo similar al que ocurre con el LPS y no porque las partículas lipídicas cambien a la asociación de bicapa en presencia del antibiótico. Adicionalmente, la falta de reconocimiento por las células HEK-293hTLR4 de la flagelina, ligando de TLR5, así como la demostración de que los liposomas con o sin Mn²⁺ no están contaminados con LPS (con base en la prueba de Lymulus), son también un fuerte apoyo a que el TLR4 de las células HEK-293hTLR4 realmente reconoce un arreglo tridimensional hidrofóbico y de forma cónica en la partícula lipídica.

Es importante destacar que los liposomas de fosfatidilcolina:fosfatidato, que tienen la misma composición de fosfolípidos pero en donde estos fosfolípidos están en la

asociación molecular de bicapa, no fueron reconocidos por el TLR4 de las células HEK-293hTLR4. Lo que apoya fuertemente el hallazgo respecto a que el TLR4 identifica a los fosfolípidos sólo cuando se encuentran asociados en la partícula lipídica en los liposomas. Adicionalmente, este hallazgo es importante porque los liposomas con lípidos asociados en bicapa al no ser inmunogénicos se pueden emplear en diversos protocolos de tratamientos médicos, ya que no despiertan una respuesta inmunitaria en su contra.

El dímero TLR2/6 de las células HEK-293hTLR2/6 no reconoció a los lípidos asociados en partículas lipídicas, a diferencia del reconocimiento de sus agonistas naturales FSL1 y HKLM, a través tanto de la activación de NF- κ B como de la producción de IL-8. Seguramente en FSL1, una lipoproteína sintética, y en HKLM, un extracto de *Listeria monocytogenes*, los lípidos tendrán un arreglo molecular diferente al de los fosfolípidos asociados en partícula lipídica, que es el arreglo molecular que reconoce el TLR4 de las células HEK-293hTLR4.

La activación de NF- κ B y la producción de IL-8 en células HEK-293hTLR5 y HEK-293hTLR8 solamente en presencia de sus respectivos agonistas flagelina y ssRNA40; así como, la falta de respuesta en células HEK-293 (que carecen de TLR's) con todos los agonistas de los TLR's probados, incluso con los liposomas lisos o con partículas lipídicas, que en conjunto constituyen los controles negativos usados además de los ya indicados, permiten, al validar las metodologías empleadas en este estudio, concluir que el TLR4 es el receptor que reconoce a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas.

Aún falta analizar otros receptores del sistema inmune innato, como los receptores carroñeros y los receptores CD1 de los linfocitos NKT, porque es probable que éstos también reconozcan a las partículas lipídicas. Los carroñeros por su falta de especificidad y los CD1 porque sus ligandos también son de naturaleza lipídica. Es

probable que más de un mecanismo del sistema inmune esté implicado en el reconocimiento de los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas.

Así mismo, es de igual importancia identificar en el enfermo cuáles son los mecanismos o las moléculas que hacen que las partículas lipídicas cambien de su estado transitorio y se hagan permanentes, con lo que se lleva a cabo la producción de los anticuerpos anti-partículas lipídicas que pueden participar en el desarrollo de la enfermedad. Como se demostró en los ratones BALB/c y NIH que son la procainamida y la clorpromacina los inductores y estabilizadores de las partículas lipídicas en liposomas y en células, y que éstas inducen la formación de anticuerpos anti-partículas con el desarrollo de una enfermedad autoinmune parecida al lupus eritematoso sistémico del humano (Baeza *et al.*, 2004, 2007; Campos *et al.*, 2006).

V. CONCLUSIONES

1. La cloropromacina, la procainamida y el manganeso inducen la formación de partículas lipídicas en liposomas que contienen un lípido de forma molecular cónica como el fosfatidato.
2. La cloropromacina es el inductor de partículas más efectivo, ya que induce la formación de estas estructuras a concentraciones hasta 50 veces más pequeñas que los otros inductores.
3. El TLR4 de las células HEK-293hTLR4 reconoció a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas en liposomas.
4. La región de cadenas hidrocarbonadas no-polares de los fosfolípidos de la micela invertida de la partícula, comparte un arreglo tridimensional parecido a la región no-polar cónica de las cadenas hidrocarbonadas del lípido A, y este arreglo tridimensional hidrofóbico y de forma cónica es el reconocido por el TLR4 de las células HEK-293hTLR4.
5. Es probable que el TLR4 de las células presentadoras de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas también pueda reconocer a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas.
6. Los TLR2/6, TLR5 y TLR8 de las células HEK-293hTLR2/6, HEK-293hTLR5 y HEK-293hTLR8 no reconocieron a los fosfolípidos asociados en partículas lipídicas.

VI-. PERSPECTIVAS

Analizar otros receptores del sistema inmune innato, como los receptores carroñeros y los receptores CD1 de los linfocitos NKT, porque es probable que éstos también reconozcan a las partículas lipídicas. Los carroñeros por su falta de especificidad y los CD1 porque sus ligandos también son de naturaleza lipídica.

En ratones Knockout a TLR4 tratar de reproducir el modelo experimental de lupus, como se ha desarrollado anteriormente, por la administración de los inductores de partículas clorpromacina, procainamida y Mn^{2+} solos o al formar partículas lipídicas en liposomas, para confirmar que el TLR4 es el receptor que reconoce a las partículas lipídicas.

Determinar las moléculas que hacen permanentes a las partículas lipídicas en el humano, para evitar su administración como medicamentos, en alimentos y en otros productos de uso humano.

Diseñar nuevas estrategias de tratamiento para que una vez que se hayan formado las partículas lipídicas en las membranas celulares, se puedan revertir al arreglo normal en bicapa, mediante fármacos estabilizadores de membranas como el Lupressan que ha sido diseñado y sintetizado por el Dr. Carlos Wong del laboratorio de Enzimología de esta Escuela.

Determinar las siguientes etapas que llevan a la producción de los anticuerpos anti-partículas lipídicas tanto en el ratón como en el humano.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, K. A., Lichtman, H. A. and Pillai, S. (2007). Cellular and molecular immunology. 6th Edition. Ed. Saunders Elsevier. 19-46, 427.

Aguilar, L., Ortega-Pierres, G., Campos, B., Fonseca, R., Ibáñez, M., Wong, C., Farfán, N., Naciff, J. M., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R. and Baeza, I. (1999). Phospholipid membranes form specific non-bilayer molecular arrangements which are antigens. *J. Biol. Chem.* 274: 25193-25196.

Alarcón-Segovia, D. and Cabral, A. R. (1992). Functional and immunochemical heterogeneity of antiphospholipid antibodies: A classification. *J. Rheumatol.* 19: 1166-1169.

Alving, C. R., Schijo, S. and Mattsby-Baltzer, I. (1984). Preparation and use of liposomes in immunological studies. En: *Liposome technology* (Ed. por Gregoriadis, G.). Vol. III. C.R.C. Press, Boca Ratón. pp 157-175.

Amital H, Govoni M, Maya R, Meroni PL, Ori B, Shoenfeld Y, Tincani A, Trotta F, Sarzi-Puttini P, Atzeni F. (2008). Role of infectious agents in systemic rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 26: 27-32.

Anders, J. H., Zecher, D., Pawar, D. R. and Patole, S. P. (2005). Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection. *Art. Res. & Ther.* No. 5: 215-224.

Asea, A. (2008). Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp. Pharmacol.* 183: 111-127.

Asherson, R. A. (2005). The catastrophic antiphospholipid (Asherson's) syndrome in 2004 a review. *Autoimmun Rev.* 4: 48-54.

Asherson, R. A., Cervera, R., Piette, J. and Shoenfeld, Y. (1996). The antiphospholipid syndrome: History, definition, classification, and differential diagnosis. En: *Antiphospholipid syndrome*. (Ed. por Asherson, R. A., Cervera, R., Piette, J., Shoenfeld, Y). CRC Press, Boca Raton, New York, Londres: 3-12.

Baeza, I., Gariglio, P., Rangel, L. M., Chavéz, P., Cervantes, L., Argüello, C., Wong, C. and Montañés, C. (1987). Electron microscopy and biochemical properties of polyamine-compacted DNA. *Biochemistry* 26:6387-6392.

Baeza, I., Ibáñez, M., Santiago, J. C., Argüello, C. and Oró, J. (1990). Diffusion of Mn²⁺ into liposomes mediated by phosphatidate and monitored by the activation of an encapsulated enzymatic system. *J. Mol. Biol.* 31: 453-461.

Baeza, I., Leyva, E., Campos, B., Lara, M., Ibáñez, M., Farfan, N., Orozco, H., Flores-Romo, L., Hernández-Pando, R. and Wong, C. (2004). Antibodies to non-bilayer phospholipid

arrangements induce a murine autoimmune disease resembling human lupus. *Eur. J. Immunol.* 34: 576-586.

Baeza, I., Ibañez, M. y Wong, C. (2007). La membrana celular y el transporte. En: *Bioquímica*. (Ed. por J.J. Hicks). McGraw Hill México: 168-200.

Baker, W. F. and Bick R. L. (2008). The clinical spectrum of antiphospholipid syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 22(1): 33-52.

Balmelli, C., Alves. P. M., Steiner, E., Zingg, D., Pedutto, N., Ruggli, N., Gerber, H., McCullough, K. and Summerfield, A. (2008). Responsiveness of fibrocytes to toll-like receptor danger signals. *Immunobiology* 212: 693-699.

Brandenburg K, Mayer H, Koch MH, Weckesser J, Rietschel ET, Seydel U. (1993). Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *Eur J. Biochem.* 218(2): 555-563.

Campos, B., Chames, M., Lantry, J. M., Bill, J. P., Eis, A., Brockman, D., Neil, J., Tischner, E., Barton, J., Wong, C., Schwemberger, S., Cornelius, J., Myatt, L., Baeza, I. and Hnat, M. (2006). Determination of non-bilayer phospholipid arrangements and their antibodies in placenta and sera of patients with hypertensive disorders of pregnancy. *Placenta.* 27: 215-224.

Carter, C., Houston, D. and Vickers, L. (2004). The antiphospholipid syndrome. The Thrombosis Interest Group of Canada.

Chen, P. P. and Giles, I. (2010). Antibodies to serine proteases in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 121: 45-52.

Cullis, P., De Kruijff, B., Hope, M., Nayar, R. and Schmid, S. (1980). Phospholipids and membrane transport. *Can. J. Biochim.* 58: 1091-1100.

Cullis, P. R. and Hope, M. J. (1991). Physical properties and functional roles of lipids in membranes: En: *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. New Comprehensive Biochemistry. (Ed. por Vance, D. E., Vance, J.) New York: 1-41.

Cutolo, M., Sulli, A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Seriolo, B. and Straub, R. (2004). Sex hormones influence on the immune system: Basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*: 13: 635-638.

de Laat, B., Mertens, K. and de Groot P. G. (2008). Mechanisms of Disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 19: 192-199.

Dietrich, N., Lienenklaus, S., Weiss, S. and Gekara, N. O. (2010). Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. *PLoS One*. Apr 20;5(4): 1-10.

Doménech, Ó., Sanz, F., Montero, T. M. and Borrell, H. J. (2006). Thermodynamic and structural study of the main phospholipid components comprising the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et Biophysica* 1758(2):213-21.

Doz, E., Rose, S., Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G., Erard, F., Ryffel, B. and Quesniaux, V. F. (2007). Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNR1- independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan. *J Biol Chem*. 282(36): 26014-26025.

Elass, E., Coddeville, B., Kremer, L., Mortuaire, M., Mazurier, J. and Guérardel, Y. (2008). Mycobacterial lipomannan induces MAP kinase phosphatase-1 expression in macrophages. *FEBS Lett*. 6: 582(3): 445-450.

España, L. (2005). Detección de anticuerpos contra lípidos asociados en partículas lipídicas en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Tesis de Maestría en Biomedicina y Biotecnología Molecular. ENCB-IPN.

Fisher, M. J., Rauch, J. and Levine, J. S. (2007). The antiphospholipid syndrome. *Semin Nephrol*. 27(1): 35-46.

Földes, G., Liu, A., Badiger, R., Paul-Clark, M., Moreno, L., Lendvai, Z., Wright, J. S., Ali, N. N., Harding, S. E. and Mitchell J. A. (2010). Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. *PLoS One*. 5;5(5): 1-12.

Franchini, M. and Veneri, D. (2005). The antiphospholipid syndrome. *Hematology* 10: 265-269.

Freshney, R. I. (2005). *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Fifth edition. Wiley-Liss John Wiley & Sons INC: 340, 375-395.

Galli, M. (2004). Antiphospholipid syndrome: association between laboratory test and clinical practice. *Path. Haemostasis and Thromb*. 33: 249-255.

Gigante A, Gasperini ML, Cianci R, Barbano B, Giannakakis K, Di Donato D, Fuiano G, Amoroso A. (2009). Antiphospholipid antibodies and renal involvement. *Am J Nephrol*. 30: 405-412.

Gresele P, Migliacci R, Vedovati MC, Ruffatti A, Becattini C, Facco M, Guglielmini G, Boscaro E, Mezzasoma AM, Momi S, Pengo V. (2009). Patients with primary antiphospholipid antibody syndrome and without associated vascular risk factors present a normal endothelial function. *Thromb Res Elsevier*. 123(3): 444-451.

- Hafez, M. and Cullis, P. (2001). Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 139-148.
- Hanly, G. J. (2003). Antiphospholipid syndrome: an overview. *Canadian Medical Association or its licensors.* 168: 1675-1682.
- Harrison, Fauci, Braunwald, Isselbacher, Wilson, Martin, Kasper, Hauser y Longo. (1998). *Principios de Medicina Interna.* Vol. II. 14^a Ed. McGraw Hill-Interamericana: 2127-2135.
- Hang, L., Slack, J. H., Amundson, C., Izui, S., Theofilopoulos, A. N. and Dixon, F. J. (1983). Induction of murine autoimmune disease by chronic polyclonal B cell activation. *J Exp Med.* Mar 1:157(3): 874-83.
- Hoffman, W. R. (2004). T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology Ed. Elsevier* (113): 4-13.
- Ibeagha-Awemu, E. M., Lee, J. W., Ibeagha, A. E., Bannerman, D. D., Paape, M. J. and Zhao, X. (2008). Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary. *Vet Res.* 39(2):11: 1-12.
- Ieko M, Naito S, Yoshida M. (2010). Laboratory examinations in antiphospholipid syndrome. *Rinsho Byori.* 58(4): 343-351.
- Kawasaki, K., Ernst, R. K. and Miller SI. (2004). 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 279(19): 20044-20048.
- Kim W. U., Sreih A. and Bucala R. (2009). Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus; prospects for therapeutic intervention. *Autoimmun Rev.* 8: 3: 204-208.
- Kinnunen, P., Koovi, A., Lehtonen, J., Rytömaa, M. and Mustoney, P. (1994). Lipid dynamic and periferal interaction of proteins with membrane surfaces. *Chem. Phys Lipids.* 73. : 181-207.
- Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee1, G. and Choi. S. (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Experimental and Molecular Medicine.* 39 (4): 421-438.
- Lahita, R. G., Chiorazzi, N. y Reeves, W. H. (2004). *Tratado de enfermedades autoinmunitarias.* 2^a Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana: 575-587.
- Lara, M. (1999). Detección de anticuerpos contra partículas lipídicas en el suero de pacientes con síndrome de antifosfolípidos. Tesis de Maestría en Ciencias Químico-biológicas. ENCB-IPN.
- Lee, H. M., Sugino, H. y Nishimoto, N. (2010). Cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 15: 1-6

Lenert, P. S. (2010). Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for Toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators. Inflamm.* 18: 1-10.

Levine, J. S., Branch D. W. and Rauch J. (2002). The antiphospholipid syndrome. *The New England J. of Med.* Vol 346, No. 10: 752-763.

Levy, Y., Almog, O., Gorshtein, A. and Shoenfeld, Y. (2006). The environment and antiphospholipid syndrome. *Lupus* (15): 784-790.

Lim, W. (2009). Antiphospholipid antibody syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 233-9.

Liphaus, B. L. y Kiss M. H. 2010. The role of apoptosis proteins and complement components in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clinics (Sao Paulo, Brasil)*. 65(3): 327-333.

Lockshin, D. M. (2006). Update on antiphospholipid syndrome. *Bulletin of NYU Hospital for Joint Diseases*. 1 & 2: 57-59.

Lockshin, M. D. and Derksen, R. H. (2008). New developments in lupus-associated antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 17(5): 443-446.

Lampropoulos, C. E. and D'Cruz, D. P. (2010). Topical calcineurin inhibitors in systemic lupus erythematosus. *Ther Clin Risk Manag.* 15;6: 95-101.

López-Lira, F., Rosales L. L., Monroy, M. V. and Ruiz, O. B. H. (2005). The role of beta2-glycoprotein I (B2GP-I) in the activation of plasminogen. *Biochim Biophys Acta* 11. Apr. Vol. 1764(4): 815-823.

Manson, J. J and Rahman, A. (2006). Systemic lupus erythematosus. *Orphanet J Rare. Dis*: 1-6.

Maya, R., Gershwin, M. E. and Shoenfeld, Y. (2008). Hepatitis B Virus (HBV) and Autoimmune Disease. *Feb*:34(1): 85-102.

McNeil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N. and Krilis, S. A. (1990). Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β -glycoprotein I (Apolipoprotein H). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 87: 4120-4124.

Miller, I. S., Ernst, K. R. and Bader, W. M. (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(1): 36-46.

Meroni, P. L. (2008). Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: an additional example of the mosaic of autoimmunity. *J Autoimmun.* 30(1-2): 99-103.

Mishra, B.B., Gundra, U. M. and Teale, J. M. (2008) Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation*. Dec 12. 5:53: 1-11.

Miyake, K. (2003). Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol*. 3(1): 119-128.

Miyakis, S., Lockshin, M. D., Atsumi, T., Branch, D. W., Brey, R. L., Cervera, R., Derksen, W. M., De Groot, P. G., Koike, T., Meroni, P. L., Reber, G., Shoenfeld, Y., Tincani, A., Vlachoyiannopoulos, G. P. and Krills, A. S. (2006). International Consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Throm Haemos*. 4: 295-306.

Mok, C. and Lau, C. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin. Pathol*. 56: 481-490.

Namjou, B., Kilpatrick, J. and Harley J. B. (2007). Genetics of clinical expression in SLE. *Autoimmunity*. 40 (8): 602-612.

Niu, J., Azfer, A. and Kolattukudy, P. E. (2008). Protection against lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction in mice by cardiac-specific expression of soluble Fas. *J Mol Cell Cardiol*. 44(1): 160-169.

Nojima, J., Iwatani, Y., Suehisa E., Kuratsune, H. and Kanakura, Y. (2006). The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *The hemato. J*. 91(5): 699-702.

Oviedo, B. J., Ochoa, Z. A., López, M. J., Valdez, A. J.J. y Baizabal, A. V. (2005). Interferencia molecular en la ruta de transducción de NF- κ B por bacterias patógenas. 24(1): 12-20.

Papadimitraki, E. D., Bertias, G. K. and Boumpas, D. T. (2007) . Toll like receptors and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun*. 29(4): 310-318.

Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., and Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD2 complex. *Nature* 458: 1191-1195.

Patole, P. S., Gröne, H. J., Segerer, S., Ciubar, R., Belemezova, E., Henger, A., Kretzler, M., Schlöndorff, D. and Anders, H. J. (2005). Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol*. 16(5): 1326-1338.

Pawar, R. D., , Patole, P. S., Zecher, D., Segerer, S., Kretzler, M., Schlöndorff, D. and Anders, H. J. (2006). Toll-like receptor-7 modulates immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 17(1): 141-149.

Premkumar, V., Dey, M., Dorn, R. and Raskin, I. (2010). MyD88-dependent and independent pathways of Toll-Like Receptors are engaged in biological activity of Triptolide in ligand-stimulated macrophages. *BMC Chem Biol.* 12: 10:13.

Pickholz, M., Olivera, O. and Skaf, M. (2006). Molecular dynamics simulations of neutral chlorpromazine in zwitterionic phospholipids monolayers. *J. Phys Chem Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys.* 17: 8804-8814.

Quehenberg, P. and Wagner, O. (2005). Laboratory diagnosis of the lupus anticoagulants. *Hamostaseologie.* 25: 50-54.

Raj, R., Sekar, C. S. and Kumaresan M. (2010). Antiphospholipid syndrome in dermatology: an update. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 76(2): 116-124.

Robson, G. M. (2009). Toll like receptors and renal disease. *Exp nephrol.* 113(1): 1-7.

Rojas-Espinosa, O. (2006). *Inmunología (de memoria)*. Tercera edición. Ed. Panamericana. México D.F: 27-55.

Roit, I., Brostoff, J. and Male, D. (1988). *Immunology*. 5th Ed. Mosby. New York: 442-470.

Sabroe, I., Parker, L., Dower, S. and Whyte, M. (2008). The role of TLR activation in inflammation. *J. Pathol.* 214(2): 126-135.

Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kasumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A. and Miyake, K. (2004). Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4) MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol.* 16(7): 961-969.

Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Moran AP, Koch MH, Rietschel ET, Seydel U. (2000). Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur J Biochem.* 267(7): 2008-2013.

Séne, D., Piette, J. C. and Cacoub, P. (2008). Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev.* 7(4): 272-277.

Seong, S. Y. and Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature reviews|Immunology.* 4: 469- 478.

Seydel, U., Oikawa, M., Fukase, K., Kusumoto, S. and Brandenburg, K. (2000). Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur. J. Biochem.* 267: 3032-3039.

Shoenfeld, Y., Twing, G., Katz, U. and Sherer, Y. (2008). Autoantibody explosion in antiphospholipid syndrome. *Jl Autoimmum.* 30(1-2): 74-83.

Sumbayev, V. V. (2008). LPS-induced Toll-like receptor 4 signalling triggers cross-talk of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and HIF-1a protein. *FEBS Letters* 582: 319-326.

Szoka, F. and Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198.

Tan E. M., Cohen, A. S., Masi, A. T., Mcshane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. and Winchester, R. J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25(11): 1271-1277.

Tierney, L., McPhee, S. and Papadakis, M. (2008). *Diagnostico Clínico y Tratamiento*. 34^a. Ed. El Manual Moderno. México D.F: 796-799.

Tomioka, R., Tani, K., Sato, K., Suzuka, C., Toyoda, Y. Kishi, J. and Sone, S. (2008). Observations on the occurrence of exacerbations in clinical course of systemic lupus erythematosus. *J Med Invest.* 55(1-2): 112-119.

Wang, R. F., Miyahara, Y. and Wang, H. Y. (2008). Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene.* 27(2): 181-189.

Wiens, M., Korzhev, M., Krasko, A., Thakur, N. L., Perović-Ottstadt, S., Breter, H. J., Ushijima, H., Diehl-Seifert, B., Müller, I. M. and Müller, W. E. (2005). Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway. Induction of a perforin-like molecule. *J Biol Chem.* 280(30): 27949-27959

Wittebole, X., Castanares-Zapatero, D. and Laterre P. F. (2010). Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators Inflamm.* 14: 1-9.

Woo K. S., Kim K.E., Kim J. M., Han J. Y., Chung W. T. and Kim K. H. (2010). Prevalence and Clinical Associations of Lupus Anticoagulant, Anticardiolipin Antibodies, and Anti-beta2-glycoprotein I Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Korean J Lab Med.* 30(1): 38-44.

Wu D, Zajonc DM, Fujio M, Sullivan BA, Kinjo Y, Kronenberg M, Wilson IA, Wong CH. (2006). Design of natural killer T cell activators: structure and function of a microbial glycosphingolipid bound to mouse CD1d. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(11): 3972-7397.