



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA INTERLEUCINA 17 EN MACRÓFAGOS M1 Y M2a  
HUMANOS ACTIVADOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**SANDRA ESPINDOLA GARIBAY**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA**

**VOCAL:**                   **Profesor: PÉREZ TAPIA SONIA MAYRA**

**SECRETARIO:**           **Profesor: CHÁVEZ SÁNCHEZ LUIS**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: PÉREZ MONTESINOS GIBRÁN**

**2do. SUPLENTE:**       **Profesor: CASTRO ESCAMILLA OCTAVIO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA, UNIDAD DE ALTA ESPECIALIDAD DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA “DR. SILVESTRE FRENK FREUND”, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. LUIS CHÁVEZ SÁNCHEZ**

**SUSTENTANTE:**

---

**SANDRA ESPINDOLA GARIBAY**

## CARTA COMPROMISO

INSSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

PRESENTE

El suscrito Sandra Espindola Garibay, en mi calidad de estudiante de la carrera de Química Farmacéutica Bióloga de la Facultad de Química de la UNAM, manifiesto bajo protesta de decir verdad que soy el autor del trabajo de Tesis denominado, el cual ha sido dirigido por el doctor Luis Chávez Sánchez. Este trabajo de investigación ha sido desarrollado en las instalaciones del Instituto Mexicano del Seguro Social, específicamente en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, haciendo uso de su infraestructura y experiencia científica en la materia. Por tanto, me comprometo a que para la divulgación del contenido de dicha Tesis y cualquier resultado de investigación, el suscrito deberá de contar necesariamente con la anuencia de los demás coautores participantes que en el presente caso sería el asesor mencionado con anterioridad.

Asimismo, manifiesto que para el caso de que el presente trabajo tenga como consecuencia algún resultado novedoso (invención) susceptible de protección de derechos de propiedad industrial, la titularidad de los mismos corresponde al Instituto Mexicano del Seguro Social. En caso de que el suscrito tenga participación como inventor, su participación será determinada por sus asesores y participará con el porcentaje correspondiente de contribución a dicha invención.

ATENTAMENTE

Sandra Espindola Garibay

Este trabajo fue financiado en parte con el apoyo del programa del Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con número FIS/IMSS/PROT/G18/1815. Así como con el apoyo al fortalecimiento y desarrollo de la infraestructura científica y tecnológica con número 226292 de la convocatoria 2013 del CONACYT.

# ÍNDICE

Abreviaturas.....	i
Índice de figuras.....	iii
Introducción.....	1
Marco teórico.....	2
Inflamación.....	2
Interleucina 17.....	4
Receptor de IL-17 y su señalización.....	6
Papel de IL-17 en defensa del huésped.....	8
IL-17 en la enfermedad.....	8
Macrófagos.....	9
Macrófagos e IL-17.....	12
Justificación.....	14
Planteamiento del problema.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
Metodología.....	16
Obtención de células mononucleares.....	16
Purificación de monocitos clásicos.....	16
Diferenciación de monocitos a macrófagos.....	17
Estimulación interleucina 17 (IL-17).....	17
Determinación de TNF- $\alpha$ por ELISA.....	17
Determinación de moléculas de superficie en macrófagos.....	18
Determinación de citocinas.....	19
Análisis estadístico.....	19
Diagrama de flujo.....	20
Resultados.....	21
Diferenciación y activación de macrófagos M1 y M2a.....	21

Concentración de IL-17. ....	24
Efecto de la IL-17 en macrófagos M1. ....	25
Efecto de la IL-17 en macrófagos M2a. ....	27
Papel de la IL-17 en la producción de citocinas en macrófagos M1 activados. ....	29
Citocinas particulares de macrófagos M2a en macrófagos M1. ....	29
Efecto de la IL-17 en la producción de citocinas en macrófagos M2a. ....	34
Citocinas particulares de macrófagos M2a. ....	34
Citocinas particulares de macrófagos M1 en M2a. ....	34
Discusión. ....	39
Conclusiones. ....	41
Referencias. ....	42

## Abreviaturas.

<b>Act 1</b>	Activador 1
<b>APC</b>	Aloficocianina
<b>ASF/SF2</b>	Factor de empalme alternativo / Factor 2 de empalme
<b>BSA</b>	Albumina de suero bovino
<b>C/EBP</b>	Proteína de unión al promotor CCAAT
<b>CCL2</b>	Quimiocina quimioatrayante de monocitos 1
<b>CCR2</b>	Receptor C-C de quimiocina tipo 2
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación
<b>IKK</b>	Conección a I $\kappa$ B quinasa y proteína quinasa activada por estrés
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>DC</b>	Células dendríticas
<b>EDTA</b>	Acido etilendiamonotetraacético
<b>FcR</b>	Receptor Fc
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de crecimiento de colonias de macrófagos y granulocitos
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>HuR</b>	Antígeno humano R
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intracelular 1
<b>IKK</b>	Cinasa de I $\kappa$ B
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-7R</b>	Receptor de interleucina 17
<b>ILC3</b>	Células linfoides innatas del grupo 3
<b>IMF</b>	Intensidad media de fluorescencia
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón- $\gamma$
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibidor del factor nuclear kappa-beta



<b>IκBζ</b>	Inhibidor de NF-κB Zeta
<b>JNK</b>	Cinasa Jun N terminal
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>LFA-1</b>	Antígeno de función linfocitaria 1
<b>LDLox</b>	Lipoproteína de baja densidad oxidada
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>μg</b>	Microgramos
<b>MAC-1</b>	Molécula de adhesión celular 1
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógeno
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos.
<b>MHCII</b>	Complejo principal de histocompatibilidad II
<b>MIP -2</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos -2
<b>NF-κB</b>	Factor de transcripción nuclear kappa B
<b>NK</b>	Células Natural Asesina
<b>NKT</b>	Célula T Natural Asesina
<b>NLRs</b>	Receptores tipo NOD
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>SA-PE</b>	Estreptavidina - Ficoeritrina
<b>TAK1</b>	Cinasa 1 activadora del factor
<b>TARC</b>	Quimiocina regulada y activada del timo
<b>TBK1</b>	Cinasa 1 de unión a TANK
<b>TGF- β</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral α
<b>TPL2</b>	Proteincinasa de locus 2 de progresión de tumor
<b>TRAF</b>	Factor asociado al recetor del factor de necrosis tumoral
<b>UTR</b>	Región no codificante
<b>VCAM 1</b>	Molécula de adhesión vascular 1
<b>VLA-4</b>	Antígeno tardío 4

## Índice de figuras.

- Figura 1** Reclutamiento del monocito a través del endotelio vascular.
- Figura 2** Interleucina 17.
- Figura 3** Vía de señalización del receptor de interleucina 17.
- Figura 4** Modelo de macrófagos M1 y M2.
- Figura 5** Estrategia para la determinación de moléculas de superficie en macrófagos
- Figura 6** Caracterización de macrófagos M1 y M2a.
- Figura 7** Interleucina 17 en macrófagos M1
- Figura 8** Interleucina 17 en macrófagos M2a
- Figura 9** Papel de la IL-17 en la producción de citocinas asociadas a los macrófagos M1.
- Figura 10** Papel de la IL-17 en la producción de citocinas asociadas a los macrófagos M2a.
- Figura 11** Producción de citocinas en macrófagos M2a en respuesta a IL-17
- Figura 12** Producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos M2a en respuesta a IL-17.

## **Introducción.**

Los macrófagos son células del sistema inmune innato presentes en todos los tejidos que desempeñan un papel central en la homeostasis y respuesta inmune.

Dependiendo de las señales que prevalezca en el microambiente, los macrófagos pueden adquirir distintos fenotipos como macrófagos M1, los cuales producen citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , así como altos niveles de marcadores como MHCII, CD80 y CD86. Mientras tanto, los macrófagos M2a, producen principalmente IL-10 y receptores “scavenger” como el receptor de manosa (CD206) y producen bajos niveles de citocinas pro-inflamatorias. Diversas evidencias han establecido que los macrófagos M1 contribuyen en la defensa del huésped ante infecciones y en enfermedades inflamatorias. Por otro lado, los macrófagos M2a contribuyen en la resolución de la inflamación y reparación del tejido.

En la respuesta inflamatoria intervienen diversos mediadores inflamatorios que afectan la actividad funcional de los macrófagos como citocinas, entre las que se encuentra la IL-17, la cual juega un papel esencial en la defensa del huésped y en enfermedades inflamatorias ya que se ha demostrado que induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e incrementa la expresión de moléculas como CCL2, CXCL1 y CD14 en macrófagos humanos derivados de monocitos.

Sin embargo a pesar de las evidencias existentes se desconoce el efecto de la IL-17 en la expresión de marcadores y citocinas en macrófagos M1 y M2a humanos activados.

Por esta razón en este proyecto se determinó la expresión de las moléculas de superficie relacionadas a macrófagos M1 y M2a, así como las citocinas asociadas a estos macrófagos en respuesta a IL-17.

## **Marco teórico.**

### **Inflamación.**

La inflamación es un mecanismo del sistema inmune, que se desencadena en respuesta a daño a tejidos, agentes patógenos o sustancias tóxicas. (Medzhitov, 2008)

La respuesta inflamatoria es iniciada por inductores endógenos y exógenos. La exposición a estos inductores puede ocurrir por distintas vías, una de ellas puede ser mediante una lesión en la piel, en donde los queratinocitos secretan citocinas y quimiocinas que favorecen la inflamación, permitiendo el reclutamiento de células capaces de eliminar microorganismos que hayan ingresado al organismo, a este tipo de inductores se les conoce como exógenos, los cuales pueden ser de origen microbiano, que expresan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y factores de virulencia, que pueden ser reconocidos mediante receptores como los receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs), receptores para manosa, entre otros.

Por otro lado, los inductores endógenos, incluyen a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que pueden ser producidos cuando hay lesión a algún tejido. (Abbas et al., 2015; Medzhitov, 2008)

Las células residentes del tejido inicialmente producen citocinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , desencadenando la activación del endotelio vascular, favoreciendo un aumento en la expresión de moléculas de adhesión como selectina E y P, la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (Gerhardt & Ley, 2015); además de la quimiocina CXCL8 (IL-8), que permite el reclutamiento de neutrófilos a través de los receptores CXCR1 y CXCR2 (Abbas et al., 2015). Posteriormente, el endotelio activado expresa la quimiocina quimioatrayante de monocitos 1 (CCL2) que interacciona con el receptor CCR2 expresado en monocitos, los cuales se adhieren al endotelio y ruedan a través de las selectinas; posteriormente los monocitos se anclan al endotelio a través de las moléculas: antígeno tardío 4 (VLA-4), antígeno de función linfocitaria 1 (LFA-1) y la molécula de adhesión celular 1 (MAC-1), las cuales interaccionan con VCAM-1 e ICAM-1 expresadas en las células endoteliales, contribuyendo a la

extravasación de monocitos a través de las uniones de las células endoteliales; en el tejido los monocitos se pueden diferenciar a macrófagos a través del efecto biológico del factor estimulador de crecimiento de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), los macrófagos en el tejido pueden responder a diferentes mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , lo que le permite al macrófago llevar a cabo una respuesta contra el agente causal del daño (Gerhardt & Ley, 2015; Chávez-Sánchez et al., 2014).

Además de estos componentes que contribuyen al proceso inflamatorio cabe mencionar que en el microambiente existen otros mediadores inflamatorios como la IL-17, la cual juega un papel esencial en la respuesta inflamatoria en la defensa del huésped y en enfermedades inflamatorias. (Monin & Gaffen, 2018)

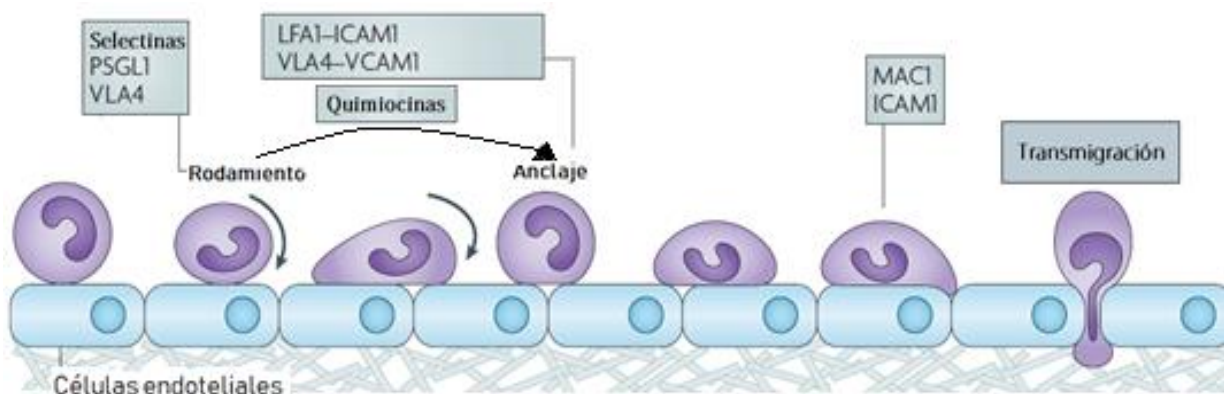


Figura 1. Reclutamiento del monocito a través del endotelio vascular.

La respuesta inflamatoria desencadena la activación del endotelio vascular, favoreciendo el reclutamiento de leucocitos al sitio de inflamación, este proceso puede ocurrir en tres pasos: rodamiento, anclaje y transmigración. Durante la activación del endotelio aumenta la producción de algunas quimiocinas como CXCL8 y CCL2 que permiten el reclutamiento de células como neutrófilos y monocitos y aumenta la expresión de moléculas de adhesión como selectina E y P que permiten el rodamiento de las células y su subsiguiente anclaje al endotelio mediante la unión de VCAM-1 e ICAM-1 con su receptor VLA-4 e LFA-1 expresados en leucocitos. Posteriormente el proceso de transmigración se da mediante la interacción de ICAM-1 con MAC-1, lo que le permite a la célula atravesar el endotelio y llegar al sitio de inflamación (Ley et al., 2007).

Imagen modificada de (Ley et al., 2007).

## **Interleucina 17.**

La IL-17 es una citocina que se describió y clonó partir de un hibridoma de linfocito T citotóxico de ratón en 1993, al cual inicialmente se le denominó antígeno 8 asociado a linfocito T citotóxico (CTLA-8) (Gu et al., 2013; Iwakura et al., 2011).

La familia de la IL-17 está constituida por seis miembros IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17 E e IL-17F (en este texto, a la IL-17A la referiremos como IL-17). La IL-17 es una citocina pro inflamatoria cuya estructura es una glicoproteína de aproximadamente 35 kDa, la cual puede secretarse como homodímero unido por puentes disulfuro o heterodímero IL-17A/F (Xu & Cao, 2010). Esta citocina es producida por diversas células como linfocitos Th17, T CD8+, células T $\gamma\delta$ , natural killer (NK), natural killer T (NKT) y células linfoides innatas del grupo 3 (ILC3).

La interacción de la IL-17 con su receptor favorece la producción de citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$ , quimiocinas como CXCL1 y CXCL8 y péptidos antimicrobianos como defensinas entre otros (Veldhoen, 2017; Xu & Cao, 2010).

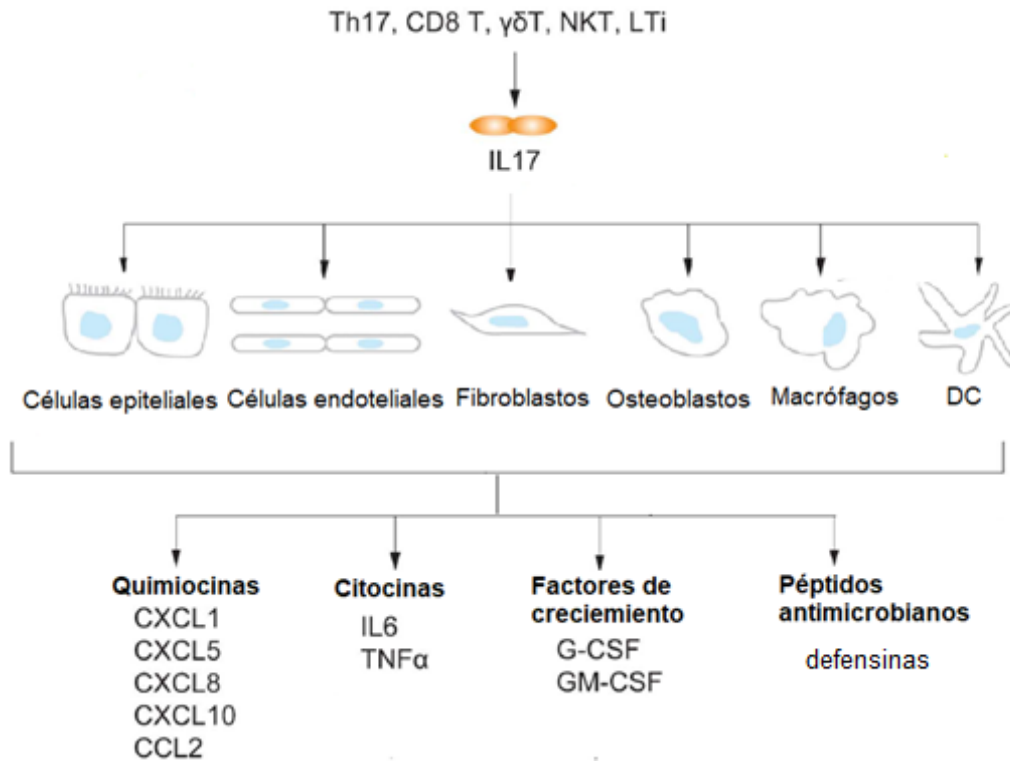


Figura 2. Interleucina 17.

Diversos tipos celulares son capaces de secretar IL-17, que incluyen a linfocitos Th17, TCD8, células T $\gamma\delta$ , natural killer T (NKT) y células linfoides innatas del grupo 3 (ILC3). La IL-17 puede inducir la producción de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y péptidos antimicrobianos en células como macrófagos, células epiteliales, células dendríticas (DC), osteoblastos y células endoteliales. (Xu & Cao, 2010).

Imagen modificada de (Xu & Cao, 2010).

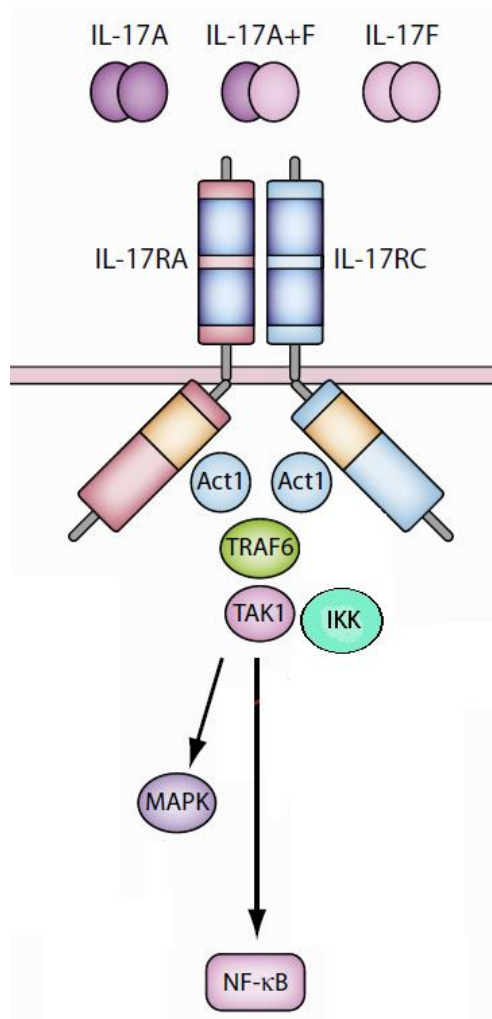
## **Receptor de IL-17 y su señalización.**

La familia de los receptores de IL-17 está compuesta por cinco miembros, IL-7AR (en lo sucesivo se denominará como IL-17R), IL-17BR, IL-17CR, IL-17DR e IL-17ER. Diversos tipos celulares expresan IL-17R e incluye monocitos, células epiteliales, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, células dendríticas y queratinocitos. Al receptor tiene la capacidad de unirse a IL-17, IL-17F y el heterodímero IL-17A/F (Kirkham et al., 2013; Xu & Cao, 2010).

El receptor de IL-17 es una proteína transmembranal tipo I que consiste en dos subunidades de IL-17RA y una de IL-17RC, cuenta en su estructura con una región conservada llamada SEFIR (dominio corto de SEF/IL-17R) al que se une Act1 conocida también como CIKS (conexión a I $\kappa$ B quinasa y proteína quinasa activada por estrés) que actúa como una molécula adaptadora (Amatya et al., 2017; Miossec & Kolls, 2012; Xu & Cao, 2010) que recluta y ubiquitina TRAF6 que posteriormente se asocia con el complejo TAK1 (TAK1-TAB2-TAB3) (Song & Qian, 2013) y el inhibidor del complejo de NF- $\kappa$ B cinasa (IKK) compuesto por IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$  desencadenando la activación de NF- $\kappa$ B, lo que lleva a la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Además de la activación de la vía de NF- $\kappa$ B, la IL-17 también puede activar la vía MAPK (Proteína cinasa activada por mitógeno) en la cual IKK fosforila p105, liberando TPL2 lo que activa p38 y JNK (Amatya et al., 2017).





*Figura 3. Vía de señalización del receptor de interleucina 17.*

El receptor de IL-17 está estructurado por dos subunidades IL-17AR y una de IL-17CR, las cuales tienen una región SEFIR a la que se une Act1 la cual recluta TRAF6, TAK1 e IKK desencadenando la activación de NF-κB, llevando a la síntesis de citocinas y quimiocinas. Otra vía de señalización que puede ser activada es la de MAPK en la cual se activa p38 y JNK. (Amatya et al., 2017; Xu & Cao, 2010).

Imagen modificada de (Iwakura et al., 2011)

## **Papel de IL-17 en defensa del huésped.**

La activación de los leucocitos en los tejidos es esencial en la respuesta inflamatoria y ante la infección. En este sentido, la IL-17 tiene un papel importante en la respuesta inmune contra infecciones bacterianas y fúngicas, ya que desencadena la expresión de citocinas y quimiocinas que inducen el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de infección, además favorece la expresión de péptidos antimicrobianos como lipocalina-2 (Lcn2) la cual compite con los sideróforos bacterianos para la adquisición de hierro libre y con ello limitar el crecimiento bacteriano. (Medzhitov, 2008; Monin & Gaffen, 2018)

Otras evidencias han demostrado que ratones IL-17<sup>-/-</sup>, tienen un menor control de la infección por *Klebsiella pneumoniae*, así como de la producción de G-CSF y el reclutamiento de neutrófilos. También, se ha encontrado que ratones deficientes en IL-17 son más susceptibles a la infección intestinal por *Citrobacter rodentiu* (Monin & Gaffen, 2018; Ye et al., 2001) Asimismo, ratones knockout para IL-17R, así como para IL-17 desarrollan infecciones en la piel por *Staphylococcus aureus* de manera espontánea (Miossec & Kolls, 2012). Por otro lado, se ha establecido que las células  $\gamma\delta$ T constituyen una de las principales fuentes de IL-17 en el pulmón y la deficiencia de estas células en una infección por *Mycobacterium tuberculosis*, provoca la formación de granulomas desorganizados en el pulmón, debido a la reducción del reclutamiento de linfocitos al granuloma (Cua & Tato, 2010) Estas evidencias en su conjunto sugieren que la IL-17 contribuye a la respuesta inmune del huésped contra una variedad de infecciones.

## **IL-17 en la enfermedad.**

La IL-17 es una citocina que participa en el desarrollo de enfermedades con fondo inflamatorio como el asma y en enfermedades autoinmunes como la artritis y psoriasis (Gu et al., 2013).

La IL-17 también está implicada en otras enfermedades como la aterosclerosis, que se caracteriza por una respuesta inflamatoria crónica en la que los macrófagos son esenciales en la enfermedad; los macrófagos en el tejido reconocen la lipoproteína de baja

densidad oxidada (LDLox) y forman células espumosas, que contribuyen al proceso inflamatorio. (Li et al., 2017; Sánchez-Martínez et al., 2017). Interesantemente, se ha establecido que la IL-17 tiene un papel importante en la progresión de esta enfermedad, debido a que ratones apoE<sup>-/-</sup>, susceptibles a desarrollar aterosclerosis, al ser tratados con anticuerpo anti-IL-17 disminuye el área de la lesión aterosclerosa, así como la cantidad de macrófagos presentes en la lesión. (Erbel et al., 2009) Estos reportes vinculan el papel de la IL-17 en enfermedades inflamatorias, así como con células del sistema inmune innato como los macrófagos, los cuales contribuyen en la respuesta inflamatoria.

## **Macrófagos.**

Los monocitos tienen la capacidad de migrar del torrente sanguíneo hacia los tejidos y diferenciarse a macrófagos en los principales órganos que incluyen al hígado, piel, cerebro, bazo, pulmón, entre otros. Independientemente de su ubicación, los macrófagos son responsables del mantenimiento de tejidos sanos a través de la fagocitosis de células apoptóticas, materiales extraños, así como de la reparación y remodelación de tejidos durante la cicatrización de heridas

También, los macrófagos son importantes en la respuesta inflamatoria en la enfermedad y en la infección, ya que actúan como un puente entre la inmunidad innata y adaptativa al monitorear el microambiente a través de una variedad amplia de receptores de superficie (Italiani & Boraschi, 2014; Zhou et al., 2014).

Dependiendo del microambiente en el que se encuentren los macrófagos pueden adquirir distintos fenotipos como M1 o M2 en un proceso conocido como polarización; sin embargo, al ser células de gran plasticidad tienen la capacidad de polarizarse hacia un perfil M2 aun siendo M1 (Shapouri-Moghaddam et al., 2018; Murray, 2017).

Los macrófagos M1 *in vitro* se obtienen a partir de la polarización de monocitos a macrófagos en presencia GM-CSF y se activan de manera clásica con interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) producido principalmente por linfocitos Th1, y lipopolisacárido (LPS). Los macrófagos M1 producen citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-23 y expresan altos niveles de moléculas como MHCII, CD68, CD80 y CD86 (Chávez-Galán et al., 2015;

Chávez-Sánchez et al, 2014; Mosser & Edwards, 2008). Mientras tanto los macrófagos M2 se pueden dividir en tres subtipos, los macrófagos M2a, M2b y M2c. Los macrófagos M2a se diferencian *in vitro* en presencia de M-CSF y se activan con citocinas Th2 como IL-4 e IL-13. Estos macrófagos producen principalmente IL-10 y expresan receptores “scavenger” como el receptor de manosa (CD206) y CD163. Los macrófagos M2b también conocidos como inmunoreguladores, pueden ser inducidos mediante TLRs y por el reconocimiento de complejos inmunes o mediante el receptor IL-1R; expresan CCL1 y grandes cantidades de IL-10. El subtipo M2c es inducido en presencia de IL-10 y glucocorticoides y produce gran cantidad de IL-10 y TGF-  $\beta$  (Martínez & Gordon, 2014; Wang et al., 2018; Chávez-Sánchez et al., 2014; Mosser & Edwards, 2008). Estas evidencias demuestran que los macrófagos tienen una notable plasticidad y que señales del microambiente como citocinas influyen en la adquisición de diferentes funciones. Además de las citocinas involucradas en la activación de macrófagos M1 o M2, otras citocinas de la respuesta inflamatoria como la interleucina 17 (IL-17) podría afectar biológicamente a los macrófagos (Sánchez-Martínez et al., 2017).

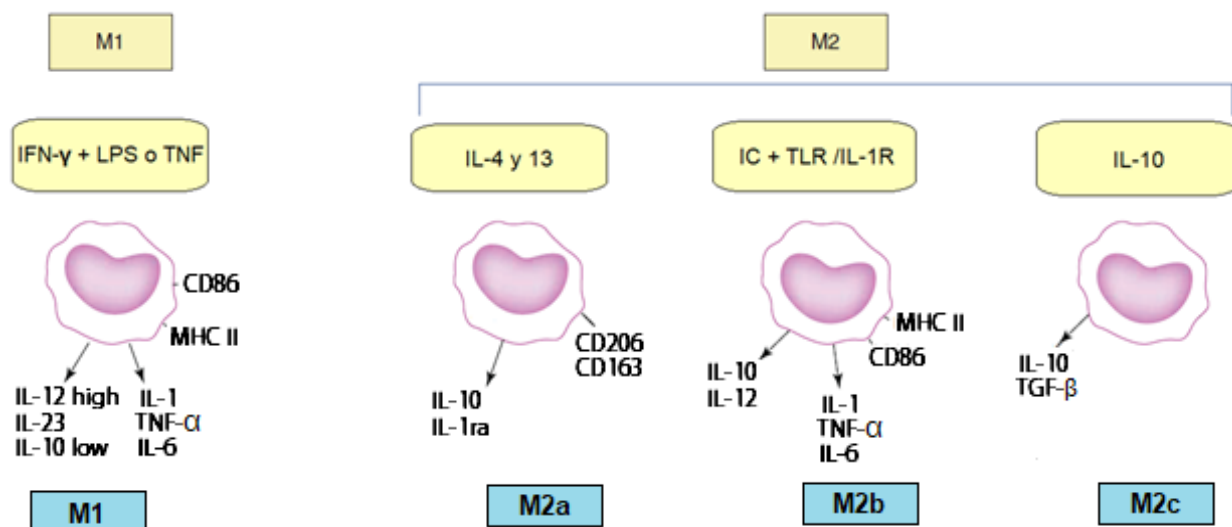


Figura 4. Modelo de macrófagos M1 y M2.

Los macrófagos dependiendo del microambiente pueden adquirir distintos fenotipos, como macrófagos M1 que se polarizan en presencia GM-CSF y se activan con INF-γ y LPS. Estos macrófagos expresan moléculas de co-estimulación y citocinas involucradas en procesos inflamatorios. Los macrófagos M2 que se dividen en tres subtipos, M2a que se polarizan en presencia de M-CSF y se activan con IL-4 e IL-13; expresan receptores “scavenger” y citocinas anti-inflamatorias. Los M2b que pueden ser inducidos por TLRs y complejos inmunes o IL-1R y los M2c se polarizan con IL-10 y glucocorticoides (Martínez & Gordon, 2014).

## Macrófagos e IL-17.

La IL-17 juega un papel importante en el sistema inmune ante infecciones y enfermedades. La IL-17 ejerce su efecto biológico sobre diversos blancos celulares que incluyen a los macrófagos.

Evidencias iniciales demostraron que la IL-17 induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  en macrófagos. (Jovanovic et al., 1998). En el mismo sentido, en macrófagos derivados de monocitos humanos, cultivados en presencia de IL-17 se induce un incremento de IL-6, IL-1 $\alpha$ , CCL2, CXCL1, CD14, CD40 y CD163, en comparación con aquellos no tratados (Erbel et al., 2014). Estas evidencias sugieren que la IL-17 afecta funcionalmente a los macrófagos, lo que es importante, ya que los macrófagos se distribuyen ampliamente en los tejidos y contribuyen en distintos procesos homeostáticos e inmunes como los desafíos infecciosos (Gordon & Plüddemann, 2017; Veldhoen, 2017).

Al respecto, la fiebre Q es una enfermedad infecciosa zoonótica, causada por la bacteria intracelular *Coxiella burnetti*, que infecta esencialmente a los macrófagos. (Clemente et al., 2018), los cuales aún después de ser infectados son capaces de tener cierto nivel de polarización, ya que aquellos macrófagos que permiten la supervivencia de la bacteria pero no su replicación exhiben un perfil similar a M1. Sin embargo, aquellos macrófagos en donde la bacteria es capaz de replicarse presentan un perfil similar a M2 (Eldin et al, 2017). La *Coxiella burnetti* requiere del sistema de secreción tipo IVB (T4BSS) para translocar proteínas bacterianas al citoplasma de la célula huésped. (Clemente et al., 2018) Sin embargo, ratones con mutaciones en *icmD* y *dotA* componentes de la T4BSS, presentan una sobreexpresión del gen de IL-17 en macrófagos y de citocinas pro-inflamatorias como IL-1a, IL-1b y TNF- $\alpha$ , así como de las quimiocinas CXCL2 y CCL5 comparación con ratones silvestres infectados con *C.burnetti*, esto sugiere que *C.burnetti* regula la vía de señalización de IL-17 en macrófagos, la cual es importante en el reclutamiento de células al sitio de infección, lo que lleva a la formación de granulomas; compuestos principalmente por macrófagos, células epiteliales y algunas otras células;

adicionalmente la IL-17 tiene un efecto bactericida que ayuda a la protección del huésped. (Clemente et al., 2018; Eldin et al., 2017)

Múltiples citocinas contribuyen en las enfermedades, como la IL-17 que ésta implicada en la aterosclerosis, la cual es una enfermedad cardiovascular inflamatoria caracterizada por la formación de placas aterosclerosas en las arterias, las lesiones aterosclerosas se caracterizan por una alta densidad de macrófagos que reconocen LDLox a través del receptor “scavenger” CD36, la cual endocitan y se convierten en células espumosas, las cuales secretan citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, lo que induce un proceso inflamatorio que contribuye al desarrollo de la enfermedad (Kavurma et al., 2017; Koltsova et al., 2012) Interesantemente pacientes con enfermedad cardiovascular presentan altos niveles de IL-17 en circulación (Mora-Ruíz et al., 2019; Liuzzo et al., 2013).

Estudios en ratones Apoe -/- tratados con anticuerpo anti IL-17, presentan una disminución en la progresión de la lesión aterosclerótica, que se asocia a una disminución de la expresión de CCL2 que induce una disminución de macrófagos presentes en la lesión; además, los macrófagos disminuyeron su grado de activación; también, el bloqueo de la IL-17 en los ratones causó una disminución de los niveles de GM-CSF circulantes en comparación con los ratones no tratados. (Erbel et al., 2014) Por otro lado, macrófagos diferenciados con IL-17 expresan un incremento de TLR2 y TLR4, similar a los macrófagos M1 y M2a; en el mismo sentido, los macrófagos diferenciados con IL-17 en presencia de LDLox secretan niveles similares de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 en comparación con los macrófagos M1 (Sánchez-Martínez et al., 2017), estos resultados sugieren que la IL-17 induce macrófagos orientados hacia un perfil M1. Los reportes previos demuestran que la IL-17 podría influir en el desarrollo de las lesiones de la enfermedad aterosclerosa a través de diferentes mecanismos como es la activación de macrófagos M1, lo cual exacerbaría la enfermedad.

## **Justificación.**

Los macrófagos se encuentran presentes en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, y llevan a cabo importantes funciones tanto para mantener la homeostasis en tejidos sanos, como en los mecanismos de defensa ante la infección por microorganismos patógenos, promoviendo la reacción inflamatoria. Existe una gran variedad de tipos de macrófagos dentro de los que incluye a los macrófagos M1 con actividad pro-inflamatoria y a los macrófagos M2a con actividad anti-inflamatoria. Evidencias previas han demostrado que los macrófagos tienen la capacidad de incrementar su actividad funcional por efecto sinérgico de citocinas. En este sentido, se ha demostrado que la IL-17 es una citocina inflamatoria que induce la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos humanos; mientras tanto, la combinación de IL-17 y TNF $\alpha$  incrementa dramáticamente el efecto inflamatorio. Estas evidencias sugieren que IL-17 participa en la respuesta inmune induciendo un fenómeno inflamatorio, más aún IL-17 tiene la capacidad de inducir un efecto sinérgico con citocinas pro-inflamatorias. A pesar de las evidencias existentes no se tiene evidencia del efecto de la IL-17 en macrófagos M1 y M2 a activados.

## **Planteamiento del problema.**

La respuesta inmune contra patógenos o en enfermedades inflamatorias, involucra diversos mediadores inflamatorios como citocinas, así como macrófagos. Múltiples evidencias han demostrado que la IL-17 juega un papel en la respuesta inmune en la activación de macrófagos induciendo la producción de citocinas para la eliminación de hongos y bacterias patógenas. Cabe destacar que la IL-17 dispara un efecto sinérgico en otras citocinas pro-inflamatorias provocando el incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias entre las que se incluye a la IL-1 $\beta$ . Estas evidencias establecen que la IL-17 es capaz de disparar la activación de los macrófagos. A pesar de las evidencias demostradas, no se conoce el efecto de la IL-17 en la expresión de marcadores y citocinas en macrófagos M1 y M2a.



## **Hipótesis.**

- La IL-17 modificará la expresión de marcadores de superficie y citocinas en macrófagos M1 y M2a.

## **Objetivos.**

### **Objetivo general.**

Determinar el fenotipo y citocinas de los macrófagos M1 y M2a en respuesta a la IL-17.

### **Objetivos particulares.**

1. Caracterizar el patrón de expresión de las moléculas de superficie relacionadas a macrófagos M1: CD80, CD86 y HLA DR y M2a: CD36, CD163 y CD206 en respuesta a la IL-17.
2. Determinar el patrón de citocinas asociadas a macrófagos M1: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, IL-12p70, IL-23 e IP-10 y M2a: IL-1RA, IL-10 y TARC en respuesta a la IL-17.

## **Metodología.**

### **Obtención de células mononucleares.**

A partir de 7 concentrados leucocitarios “Buffy Coat” de individuos sanos proporcionados por el Banco de Sangre del CMN XXI se obtuvieron células mononucleares por gradiente sobre Lymphoprep (Axis-Shield, Liverpool, UK) con 12 mL de Lymphoprep y 30 mL del concentrado celular, el cual se diluyó con solución salina 1:2.

El gradiente se centrifugó a 2000 rpm por 30 minutos, y se recuperó la interface formada entre el Lymphoprep y el plasma, que corresponde a células mononucleares. Las células mononucleares se lavaron dos veces con solución salina y se centrifugaron a 1200 rpm por 15 minutos y 900 rpm por 10 minutos, respectivamente.

El botón de células recuperado se resuspendió en “MACS buffer” (PBS 1X pH 7.4, BSA 0.5%, EDTA 2mM) y se realizó el conteo de las células en la cámara de Neubauer con azul tripano.

### **Purificación de monocitos clásicos.**

Se purificaron monocitos clásicos a partir de células mononucleares por selección negativa con el kit “Classical Monocyte Isolation kit, human” (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Por cada  $10^7$  células, se resuspendieron en 30  $\mu$ L de “MACS buffer”, 10  $\mu$ L de coctel de anticuerpos biotinilados dirigidos a CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 y CD235a, 10  $\mu$ L de reactivo bloqueador de FcR y 5  $\mu$ L de reactivo de trombocitos, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 30  $\mu$ L de “MACS buffer” y 20  $\mu$ L de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpo anti-biotina y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, después se pasaron las células por la columna de separación LS MACS (Miltenyi Biotec MACS), acoplada a un campo magnético y se recuperó la fracción negativa, correspondiente a monocitos clásicos.

## **Diferenciación de monocitos a macrófagos.**

Los monocitos purificados se cultivaron en placas de 96 pozos a una concentración de 300 000 células por pozo con medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos y suero fetal bovino (SFB) al 10%, en presencia de 50 ng/mL de GM-CSF para M1 y 50 ng/mL de M-CSF para M2a durante 6 días a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% con cambio de medio cada 2 días. Posteriormente, al sexto día los M1 polarizados se activaron con 100 ng/mL de LPS y 50 ng/mL de IFN- $\gamma$  y los M2a con 50 ng/mL de IL-4 (Miltenyi Biotec) y 40 ng/mL de IL-13 (R&D Systems, Minneapolis) y se incubaron durante 24 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.

## **Estimulación interleucina 17 (IL-17)**

Los macrófagos M1 y M2a al mismo tiempo que se activaron como se describe en la sección de diferenciación de monocitos a macrófagos se les adicionó IL-17 (R&D Systems, Minneapolis) a una concentración de 90 ng/mL y se incubaron por 24 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. En ensayos separados para bloquear el efecto biológico de la IL-17 se realizó el bloqueo de la IL-17 con 30  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti IL-17 (R&D Systems, Minneapolis) el cual previamente se incubó por 1 hora con 90 ng/mL de IL-17 (R&D Systems, Minneapolis), posteriormente los macrófagos M1 y M2a se incubaron por 24 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo anti-IgG de cabra (R&D systems, Minneapolis).

## **Determinación de TNF- $\alpha$ por ELISA.**

Se recuperaron los sobrenadantes de cultivos de macrófagos M1 y M1 estimulados por separado con 30 ng/mL, 60ng/mL y 90 ng/mL de IL-17 por 24 horas y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  mediante el kit "TNF alpha Human Uncoated ELISA" (Invitrogen). A una placa de 96 pozos se le colocaron 100  $\mu$ L del anticuerpo de captura y se incubó por

24 horas a 4°C, se lavaron 3 veces los pozos con 250 µL de regulador de lavado, posteriormente se bloquearon los pozos con 200 µL de diluyente ELISA/ELISPOT 1X, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces los pozos con 250 µL de regulador de lavado, se adicionaron 100 µL de la muestra o 100 µL de sobrenadante (los sobrenadantes de macrófagos M1 se diluyeron 1:20), se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces los pozos con 250 µL de regulador de lavado, posteriormente se adicionaron 100 µL de anticuerpo de detección y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces los pozos con 250 µL de regulador de lavado y se adicionaron 100 µL de Estreptavidina-peroxidasa de rábano y se incubó por 30 minutos, se lavaron 3 veces los pozos con 250 µL de regulador de lavado, se adicionaron 100 µL de tetrametilbenzidina (TMB) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionó 50 µL de ácido sulfúrico 2N. La lectura se realizó a 450 nm en el lector de micro placas Dynatech MR 5000.

### **Determinación de moléculas de superficie en macrófagos**

Inicialmente, todas las células cultivadas con los diferentes estímulos se recuperaron y se tiñeron con 50 µL del marcador de viabilidad “Ghost dye Red 780” (TONBO biosciences) por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez con PBS 1X y se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm, posteriormente se tiñeron con un cóctel de anticuerpos, anti CD80 VB, anti CD86 PE y anti HLA DR PECy7 para macrófagos M1 y anti CD36 FITC, anti CD206 PE, anti CD163 APC para M2a durante 20 minutos a 4°C, se lavaron con FACS buffer (PBS 1X pH 7.4, SFB 10%, EDTA 2mM, azida de sodio 0.01%) y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm, posteriormente se resuspendieron en FACS buffer, para su análisis en el citómetro de flujo MACS Quant Analyzer 10 de Miltenyi Biotec. El análisis de los datos obtenidos se realizó en el programa FlowJo V10.

## **Determinación de citocinas.**

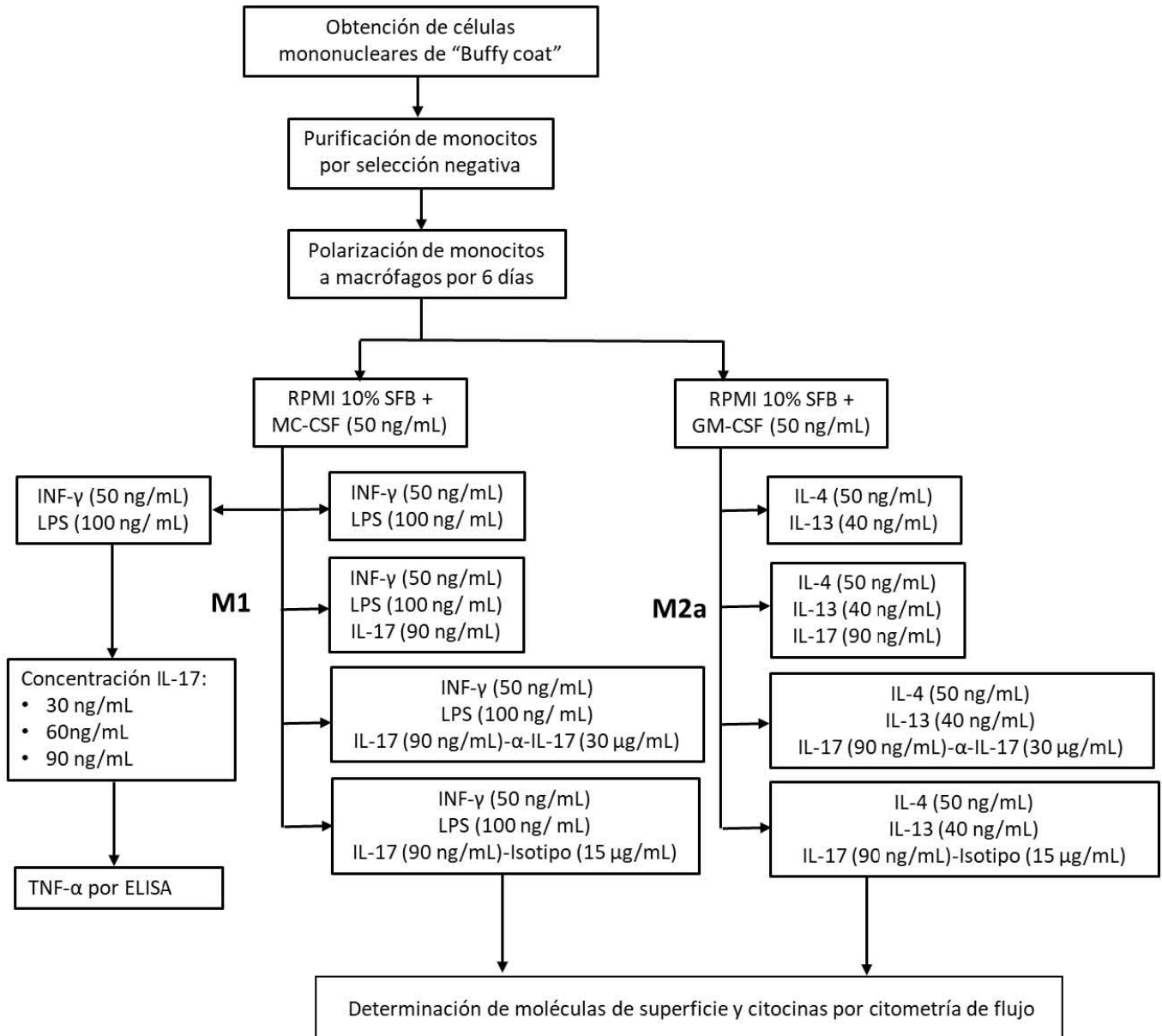
Se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos de los macrófagos M1, M2, M1 y M2 con IL-17, M1 y M2 con anti-IL-17, M1 y M2 con un anticuerpo anti-IgG de cabra y se realizó la determinación de citocinas mediante el kit "LEGENDplex, Human M1/M2 Macrophage Panel" (Biolegend). A una placa de 96 pozos se le agregaron 30  $\mu$ L de regulador de lavado por pozo, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se descartó el exceso, posteriormente se agregaron 10  $\mu$ L de regulador de ensayo, 10  $\mu$ L de perlas pequeñas y grandes con intensidades diferentes de fluorescencia, conjugadas a un anticuerpo de captura para un analito en particular (IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , TARC, IL-1RA, IL-12p40, IL-23 e IP-10) y 10  $\mu$ L de sobrenadante (los sobrenadantes de macrófagos M1 se diluyeron 1:20) o estándar (10 000 pg/mL, 2 500 pg/mL, 625 pg/mL, 156.3 pg/mL, 39.1 pg/mL, 9.8 pg/mL, 2.4 pg/mL), se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, después se realizaron dos lavados con buffer de lavado y se adicionaron 10  $\mu$ L de anticuerpo biotinilado de detección por pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente formando una reacción de sándwich entre el anticuerpo de captura, el analito y el anticuerpo de detección, posteriormente se adicionaron 10  $\mu$ L de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) por pozo que se une al anticuerpo biotinilado de detección y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con buffer de lavado y se resuspendió con 65  $\mu$ L de buffer de lavado.

La adquisición de datos se realizó en el citómetro de flujo MACS Quant Analyzer 10 de Miltenyi Biotec. El análisis de los datos obtenidos se realizó en el programa LEGENDplex Data Analysis Software Version 8.

## **Análisis estadístico.**

Para la comparación de variables cuantitativas entre grupos se utilizó Kruskal-Wallis. Los datos están representados con error estándar (SEM). Se consideró un valor de  $p \leq 0.05$ . El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa de computo Graphpad prism7.

## Diagrama de flujo.



## Resultados.

### Diferenciación y activación de macrófagos M1 y M2a.

Los monocitos purificados por selección negativa a partir de concentrados leucocitarios, posteriormente se diferenciaron a macrófagos M1 y M2a en las siguientes condiciones: los monocitos se polarizaron durante 6 días a macrófagos M1 con GM-CSF (50 ng/mL), y se activaron con INF $\gamma$  (50 ng/mL) y LPS (100 ng/mL) durante 24 horas. Mientras tanto, monocitos fueron polarizados hacia un perfil M2 con M-CSF (50 ng/mL) y se activaron a macrófagos M2a con IL-4 (50 ng/mL) e IL-13 (40 ng/mL) durante 24 horas. Posteriormente se realizó la siguiente estrategia de análisis de citometría de flujo para evaluar marcadores característicos de macrófagos M1 y M2a. La estrategia se inició con una gráfica de singletes para descartar dobles eventos (*Figura 5 A*), a partir de esta gráfica se realizó una gráfica de puntos de tamaño contra granularidad, de la cual se seleccionó la región de macrófagos (*Figura 5 B*); después se realizó una gráfica de complejidad contra el marcador de viabilidad (Ghost dye), para descartar las células muertas del análisis (*Figura 5 C*), a partir de esta región se realizó otra región para analizar los diferentes marcadores de los macrófagos (*Figura 5 D*).

Al evaluar la expresión de los marcadores CD80 y CD86 en macrófagos M1 activados, se encontró que estas células expresan altos niveles de estos marcadores (*Figura 6 A y B*) y expresan bajos niveles de CD163 y CD206 (*Figura 6 C y D*). Mientras tanto, los macrófagos M2a expresan característicamente altos niveles de CD163 y CD206 (*Figura 6 C y D*), y expresan niveles menores de CD80 y CD86 (*Figura 6 A y B*). Estos resultados están acorde con reportes que demuestran altos niveles de los marcadores CD80 y CD86, así como de CD206 y de CD163, para macrófagos M1 y M2a, respectivamente (Chávez-Galán et al., 2015; Martínez & Gordon, 2014).

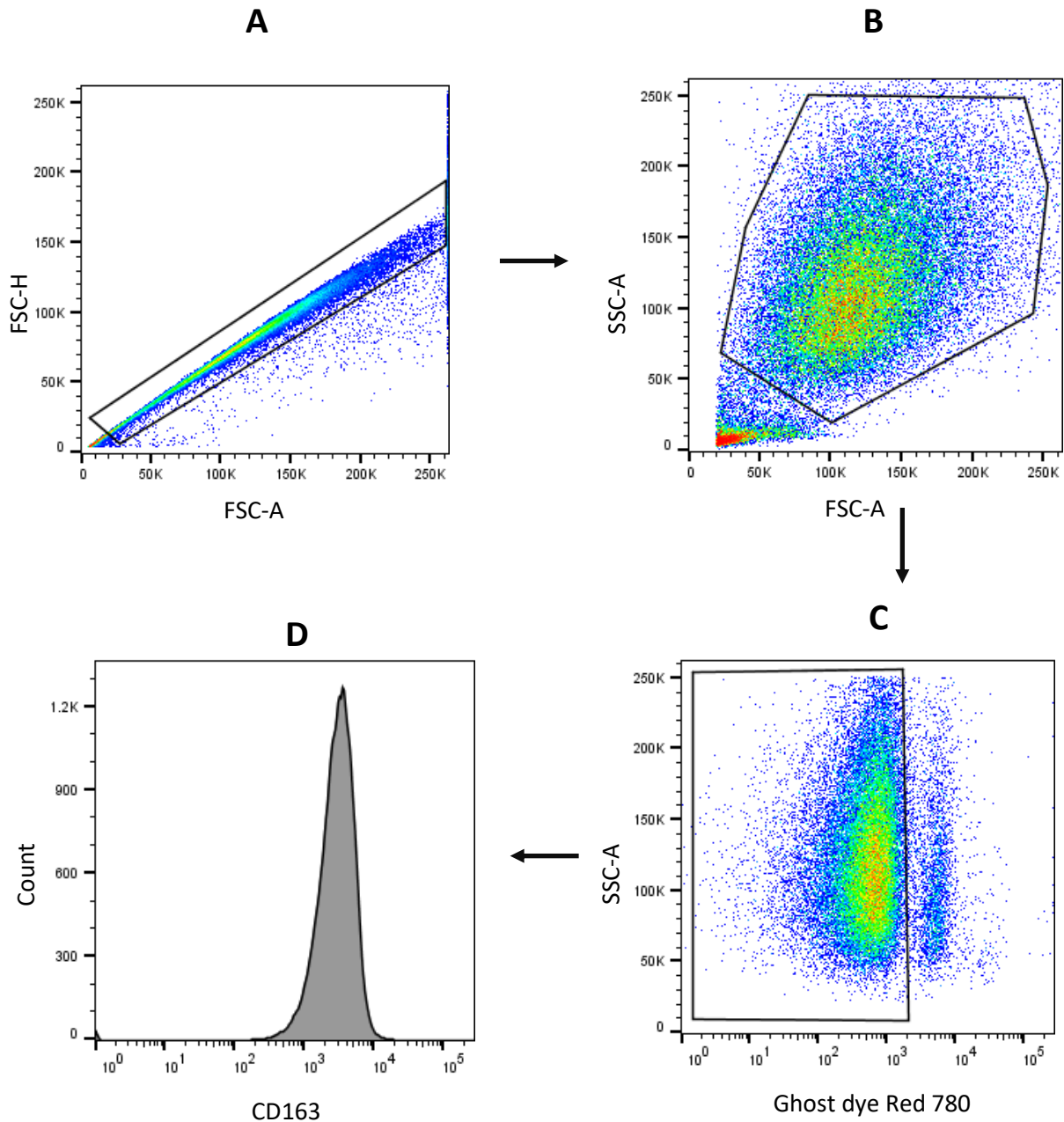


Figura 5. Estrategia para la determinación de moléculas de superficie en macrófagos.

A) A partir de una gráfica de singletes (FSC-A vs FSC-H) se excluyeron eventos dobles, B) usando la gráfica de tamaño contra granularidad (SSC-A y FSC-A) se realizó la región de macrófagos y C) utilizando la gráfica de complejidad contra el marcador de viabilidad Gost Dye, se excluyeron las células muertas del análisis y a partir de esta región D) se analizaron los marcadores asociados a los macrófagos.



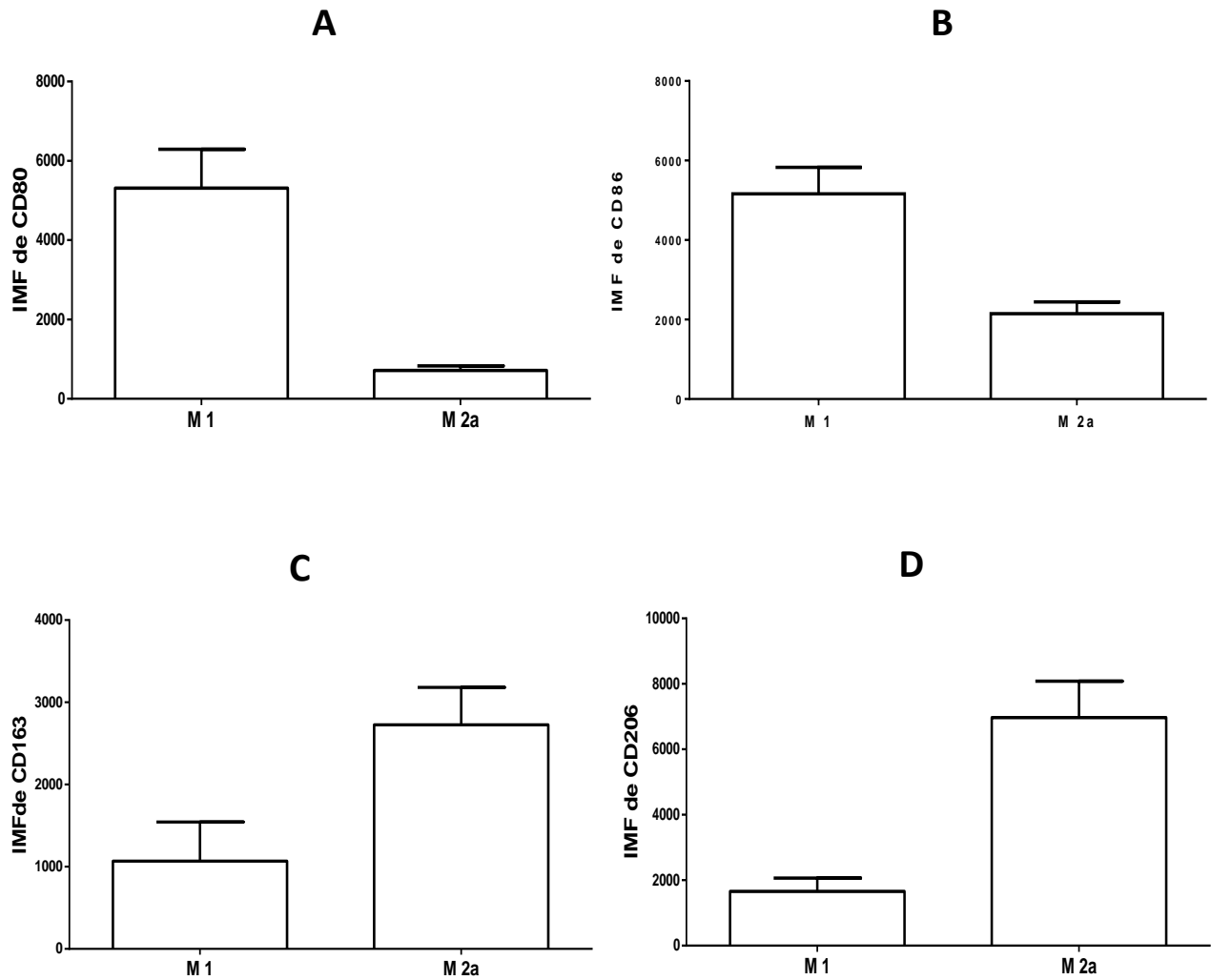


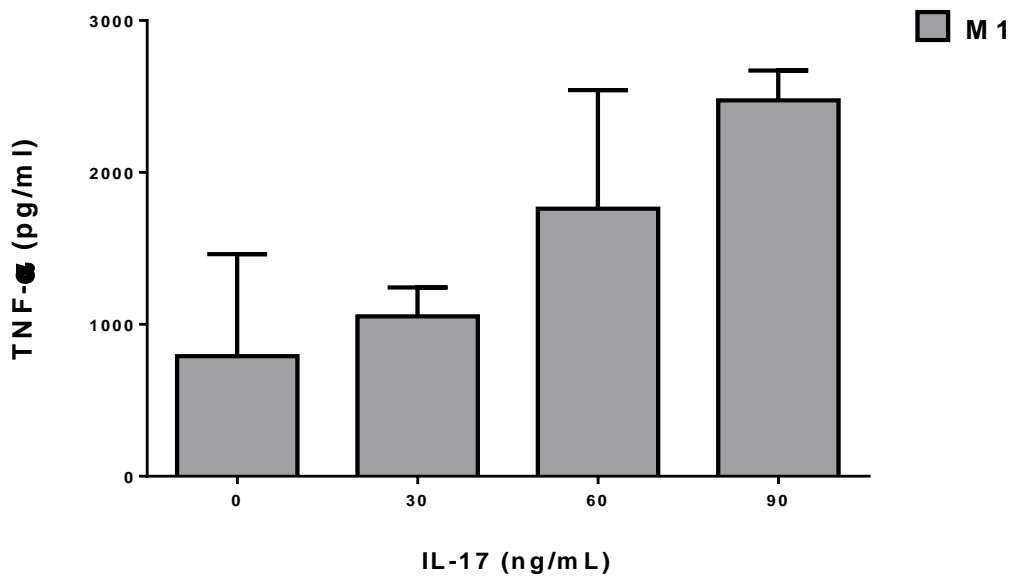
Figura 6. Caracterización de macrófagos M1 y M2a.

Los monocitos de sujetos sanos, fueron tratados durante 6 días con GM-CSF (25 ng/mL) y posteriormente con IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) y LPS (100 ng/mL) durante 24 horas. Los macrófagos M2a fueron cultivados durante 6 días con M-CSF (50 ng/mL), y después durante 24 horas con IL-4 (50 ng/mL) e IL-13 (40 ng/mL). Se evaluaron los marcadores A) CD80; B) CD86; C) CD163 y D) CD206. Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF). Los datos obtenidos se realizaron por duplicado con n=7, p<0.05

## Concentración de IL-17.

La IL-17 es considerada una citocina inflamatoria; por consiguiente, determinamos su efecto biológico en macrófagos M1. Monocitos humanos se diferenciaron a macrófagos M1 y se estimularon en presencia de 30, 60 y 90 ng/mL de IL-17 por 24 horas. Posteriormente del sobrenadante se evaluó la concentración de TNF- $\alpha$ .

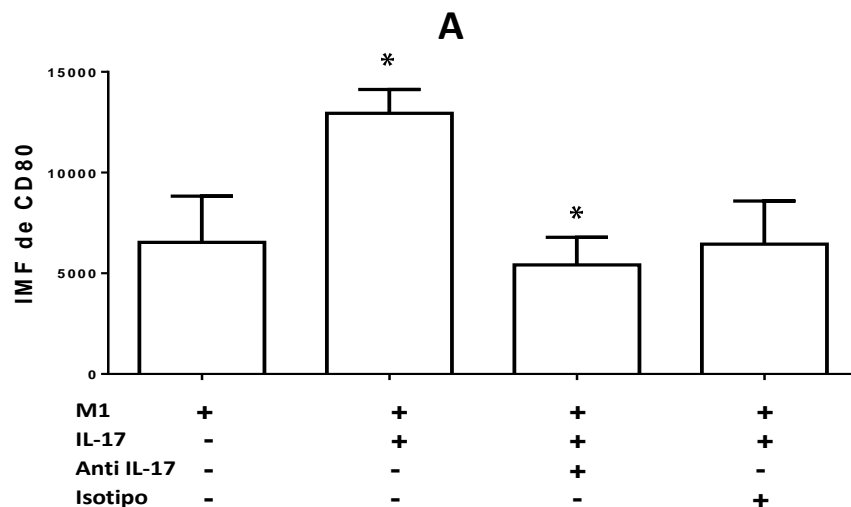
Los macrófagos M1 estimulados con IL-17 incrementaron la secreción TNF- $\alpha$  de manera dependiente de la concentración de IL-17. Por lo que, se decidió utilizar la concentración de 90 ng/mL de IL-17 en los ensayos posteriores.



## Efecto de la IL-17 en macrófagos M1.

Para evaluar el efecto biológico de la IL-17 en los macrófagos. Al momento de la activación de los macrófagos M1 y M2a se adicionó también la IL-17 y se cultivaron durante 24 horas. Por otro lado, se realizaron ensayos de bloqueo del efecto biológico de la IL-17 con anticuerpo anti-IL-17 y como control de isotipo se utilizó un anticuerpo anti-IgG de cabra.

En los macrófagos M1 en presencia de IL-17 aumentó significativamente 2 veces más los niveles de expresión de CD80 (*Figura 7A*) con respecto a los macrófagos M1 activados con INF $\gamma$  y LPS. Mientras tanto, la IL-17 no afectó los niveles de expresión de CD86, y HLA DR (*Figura 7B y C*) en comparación con macrófagos M1 activados. Al inhibir el efecto biológico de la IL-17 se indujo una disminución significativa de 2.3 veces en la expresión de CD80 con respecto a los macrófagos M1 activados (*Figura 7A y C*). Mientras, el bloqueo de la IL-17 disminuyó los niveles de CD86 y HLA DR con respecto a los macrófagos M1 activados sin embargo no es significativo (*Figura 7B y C*). Estos resultados sugieren que la IL-17 contribuye de manera directa al aumento de la expresión de CD80, pero no en las moléculas CD86 y HLA DR en los macrófagos M1.



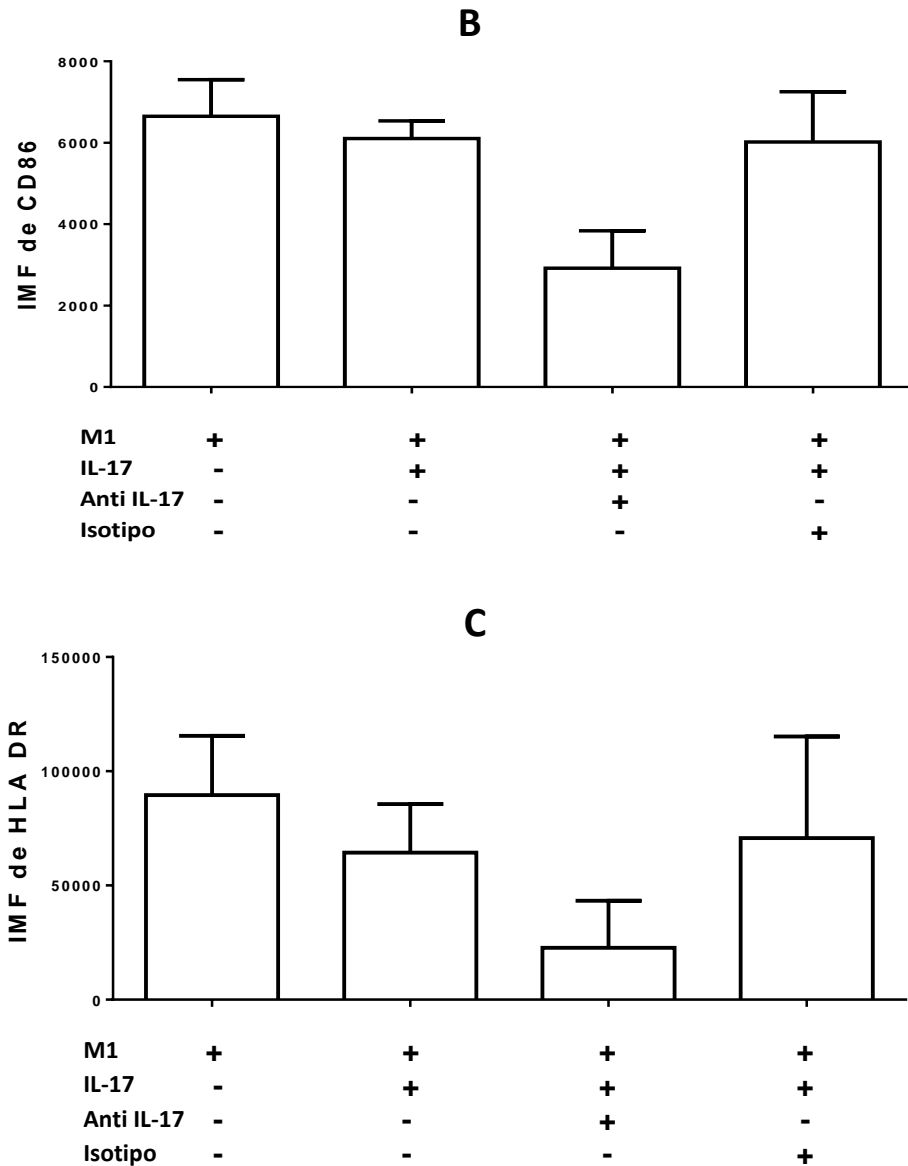
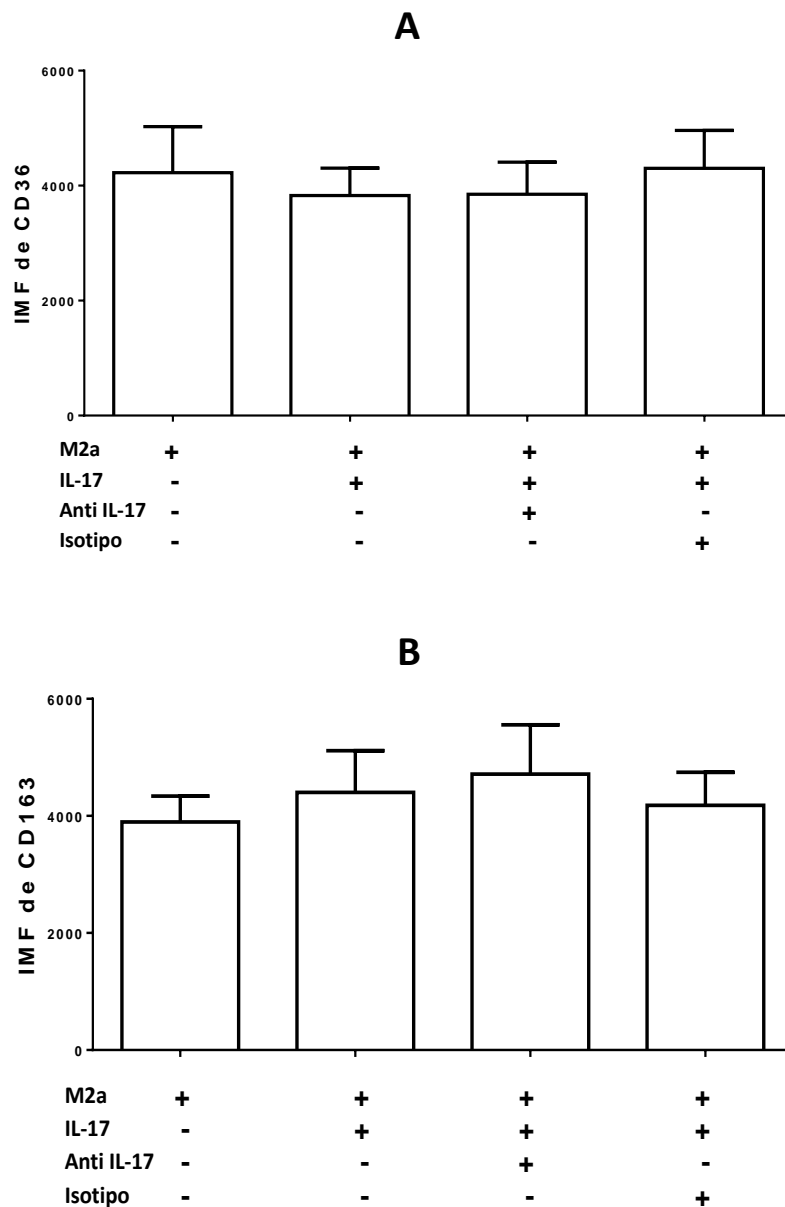


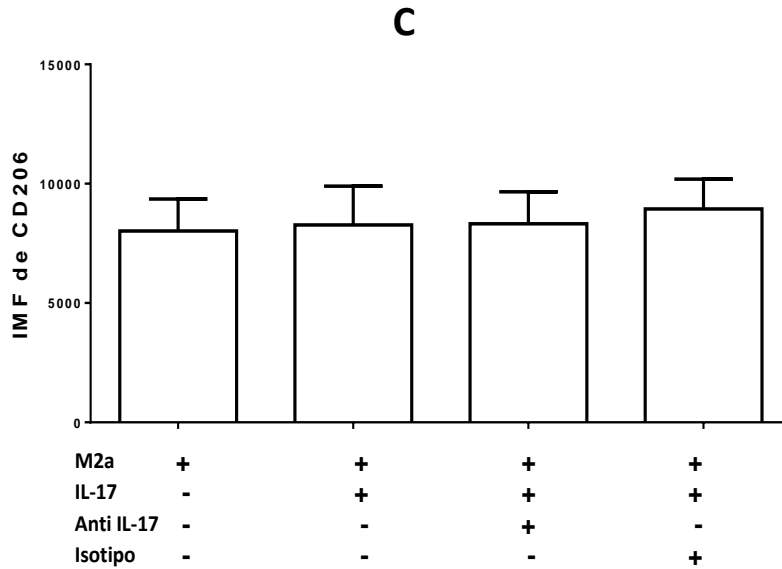
Figura 7. Interleucina 17 en macrófagos M1.

Los macrófagos M1 activados se trataron en las siguientes condiciones: en presencia de IL-17, en presencia de interleucina 17 y anticuerpo anti interleucina 17, así como con IL-17 y anticuerpo anti IgG de cabra como control de isotipo. Posteriormente se caracterizaron por citometría de flujo para la expresión de los marcadores A) CD80, B) CD86, C) HLA DR. Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF). Los datos obtenidos se realizaron por duplicado con n=7, p<0.05

## Efecto de la IL-17 en macrófagos M2a.

También, en los macrófagos M2a activados se determinó el efecto de la IL-17 en la expresión de marcadores asociados a estos macrófagos. Los distintos tratamientos de IL-17 e inhibición del efecto biológico de la IL-17 no provocaron cambios en la expresión de los marcadores CD36, CD163 y CD206 con respecto a los macrófagos M2a activados en ausencia de la IL-17 (*Figura 8*), lo que sugiere que la IL-17 no contribuye en la expresión de marcadores asociados a macrófagos M2a.





*Figura 8. Interleucina 17 en macrófagos M2a.*

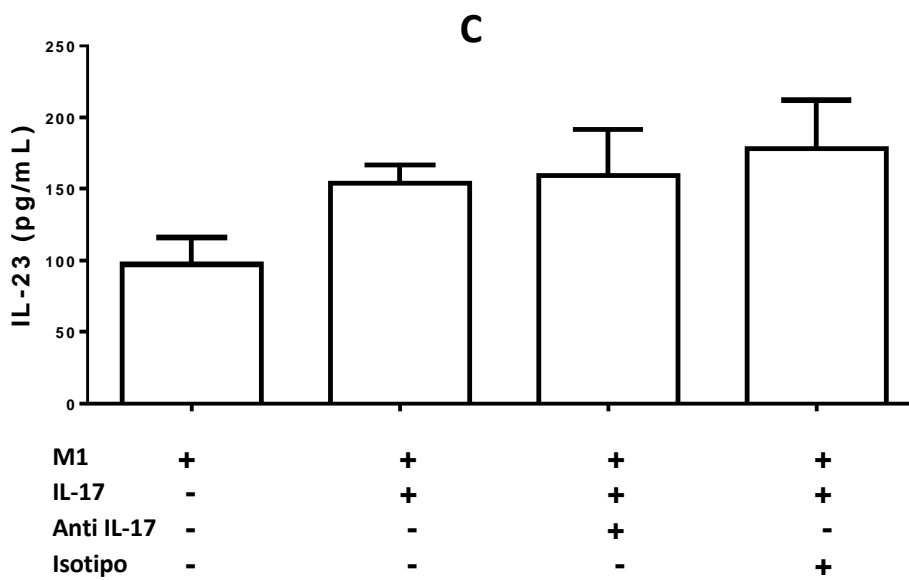
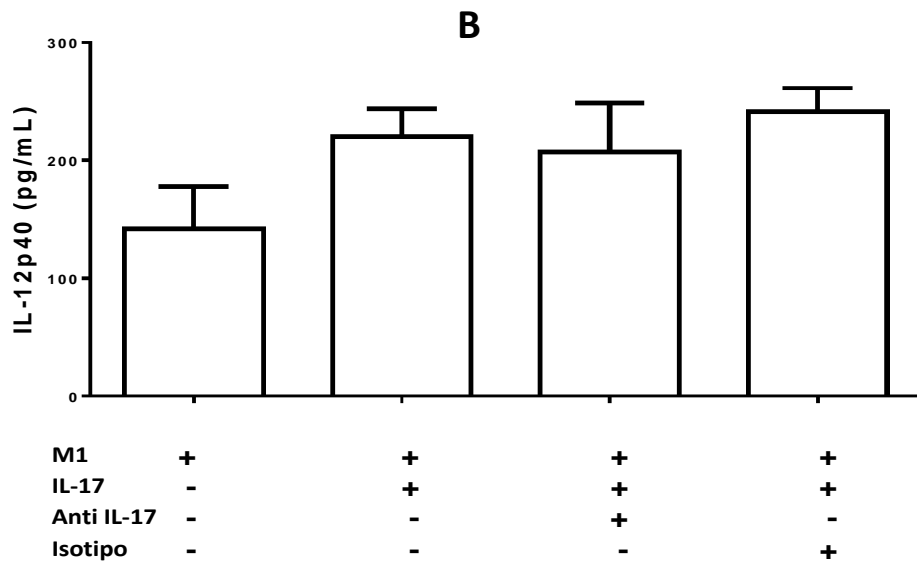
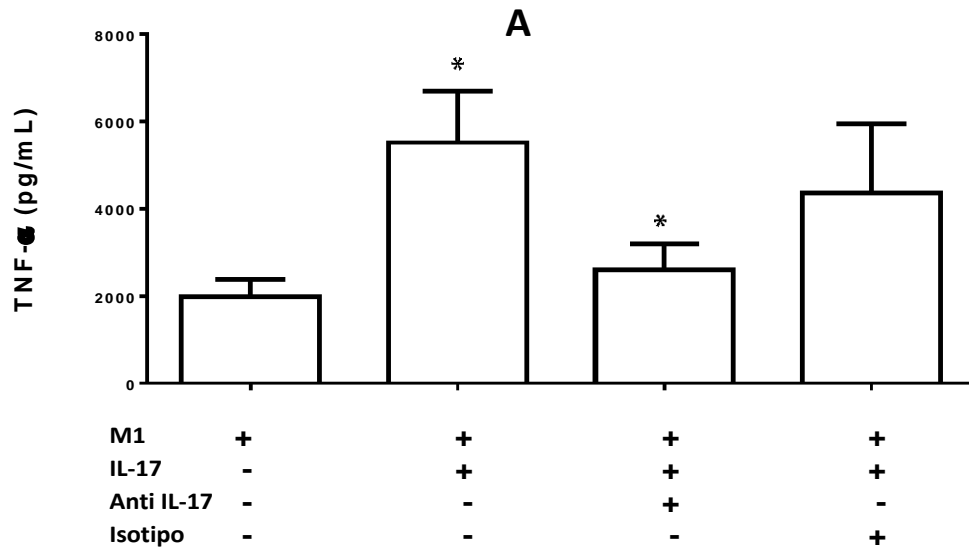
Los macrófagos M2a activados se trataron en las siguientes condiciones: en presencia de IL-17, en presencia de interleucina 17 y anticuerpo anti interleucina 17, así como con IL-17 y anticuerpo anti IgG de cabra como control de isotipo. Posteriormente se caracterizaron por citometría de flujo para la expresión de los marcadores A) CD36, B) CD163 y C) CD2016. Los niveles de expresión están expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF). Los datos obtenidos se realizaron por duplicado con  $n=7$ ,  $p<0.05$

## **Papel de la IL-17 en la producción de citocinas en macrófagos M1 activados.**

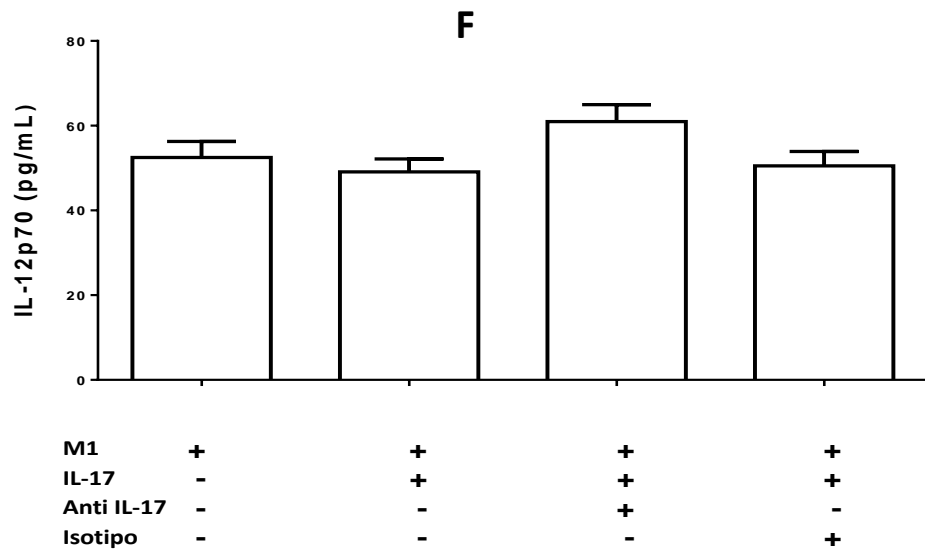
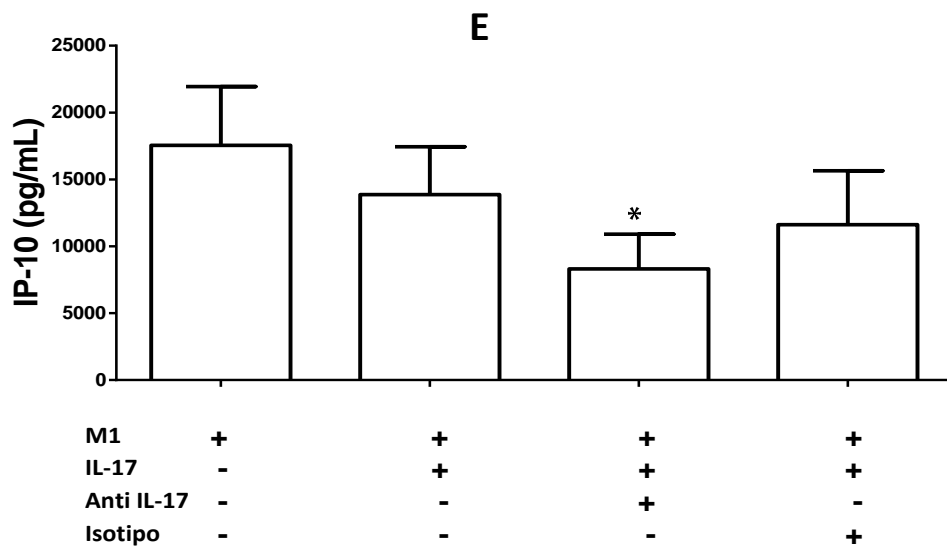
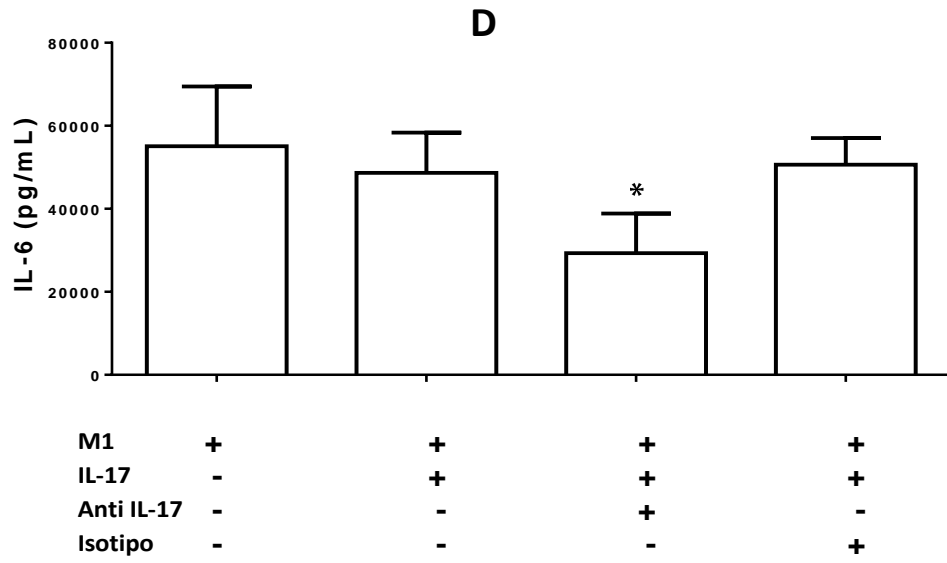
Al estimular macrófagos M1 activados por 24 horas en presencia de la IL-17 se incrementó la síntesis de TNF- $\alpha$  en 2.8 veces más con respecto a los macrófagos M1 activados en ausencia de IL-17. Por otro lado, el bloqueo de la IL-17 provocó una disminución significativa de 2.1 veces en la concentración de TNF- $\alpha$ . (*Figura 9A*). Además, la IL-17 aumentó la secreción de IL-12p40 (*Figura 9B*) y la de IL-23 (*Figura 9C*) de manera no significativa, sin embargo no afectó la secreción de IL-12p70 e IL-1 $\beta$  (*Figura 9F y G*) en comparación con macrófagos sin IL-17. El bloqueo de IL-17 no influyó en la inhibición de la secreción de IL-12p40 e IL-23, IL-12p70 e IL-1 $\beta$  (*Figura 9B, C, F y G*); sin embargo, disminuyó la síntesis de IL-6 en 1.9 veces e IP-10 en 2.1 veces con respecto a los macrófagos M1 activados (*Figura 9D y E*). Estos resultados sugieren que la IL-17 contribuye directamente en la secreción de TNF- $\alpha$  y parcialmente en la de IL-6 e IP-10 en macrófagos M1 activados y no contribuye directamente en la secreción de IL-1 $\beta$  IL-12p40, IL-12p70 e IL-23.

Citocinas particulares de macrófagos M2a en macrófagos M1.

En los macrófagos M1 activados en presencia de IL-17 disminuyó la concentración de IL-10 en 1.3 veces (*Figura 10A*); en el mismo sentido, inhibió la secreción de TARC 2.5 veces (*Figura 10B*) con respecto a los macrófagos M1 activados sin IL-17; mientras tanto, la IL-17 no afectó la secreción de IL-1RA (*Figura 10C*). Por otro lado, el bloqueo de la IL-17 aumentó la concentración de IL-10 en 1.4 veces (*Figura 10A*) y la de TARC en 1.6 veces (*Figura 10B*), sin embargo no afectó la secreción de IL-1RA (*Figura 10C*) con respecto a los macrófagos M1 activados estimulados con IL-17. Estos resultados sugieren que la IL-17 favorece en aumento en el efecto inflamatorio en macrófagos M1 activados a través de inhibir la secreción de citocinas asociadas a macrófagos M2, las cuales incrementan sus niveles de secreción al bloquear la IL-17.







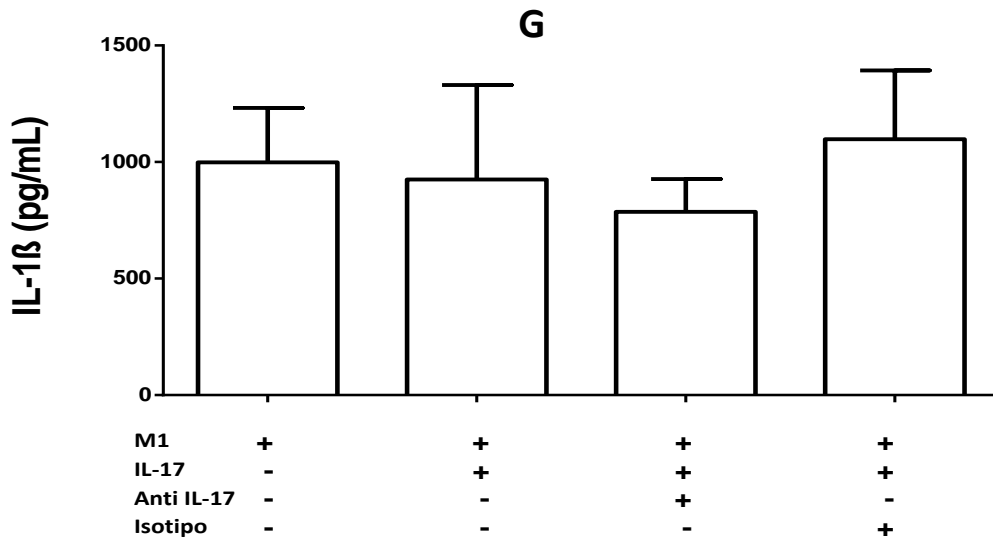
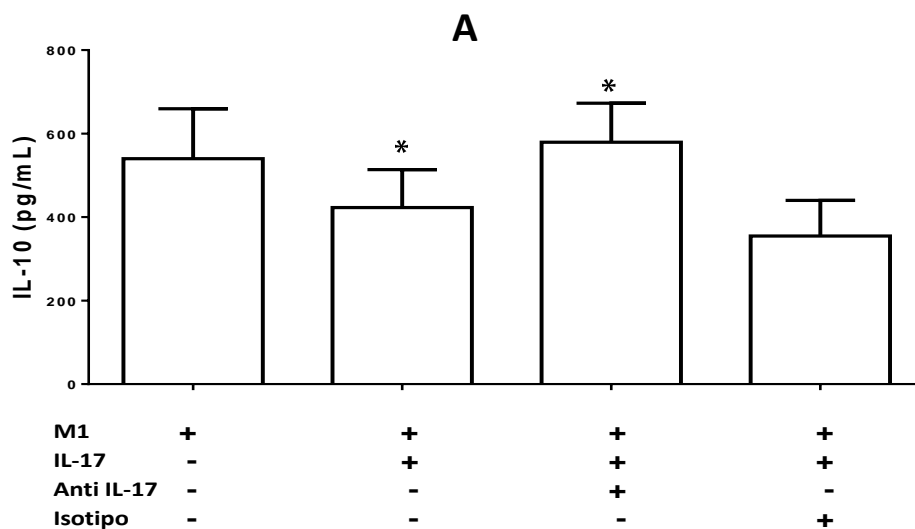


Figura 9. Papel de la IL-17 en la producción de citocinas asociadas a los macrófagos M1.

Los macrófagos M1 activados se trataron en las siguientes condiciones: en presencia de IL-17, anticuerpo anti-interleucina-17, anticuerpo anti-IgG de cabra como control de isotipo y en ausencia de IL-17. De los sobrenadantes de los cultivos se determinó la concentración de las citocinas por citometría de flujo. A) TNF- $\alpha$ , B) IL-12p 40, C) IL-23 D) IL-6, E) IP-10 F) IL-12p70 G) IL-1 $\beta$ . La concentración de cada citocina está expresada en pg/mL. Los datos obtenidos se realizaron por duplicado con n=7, p<0.05



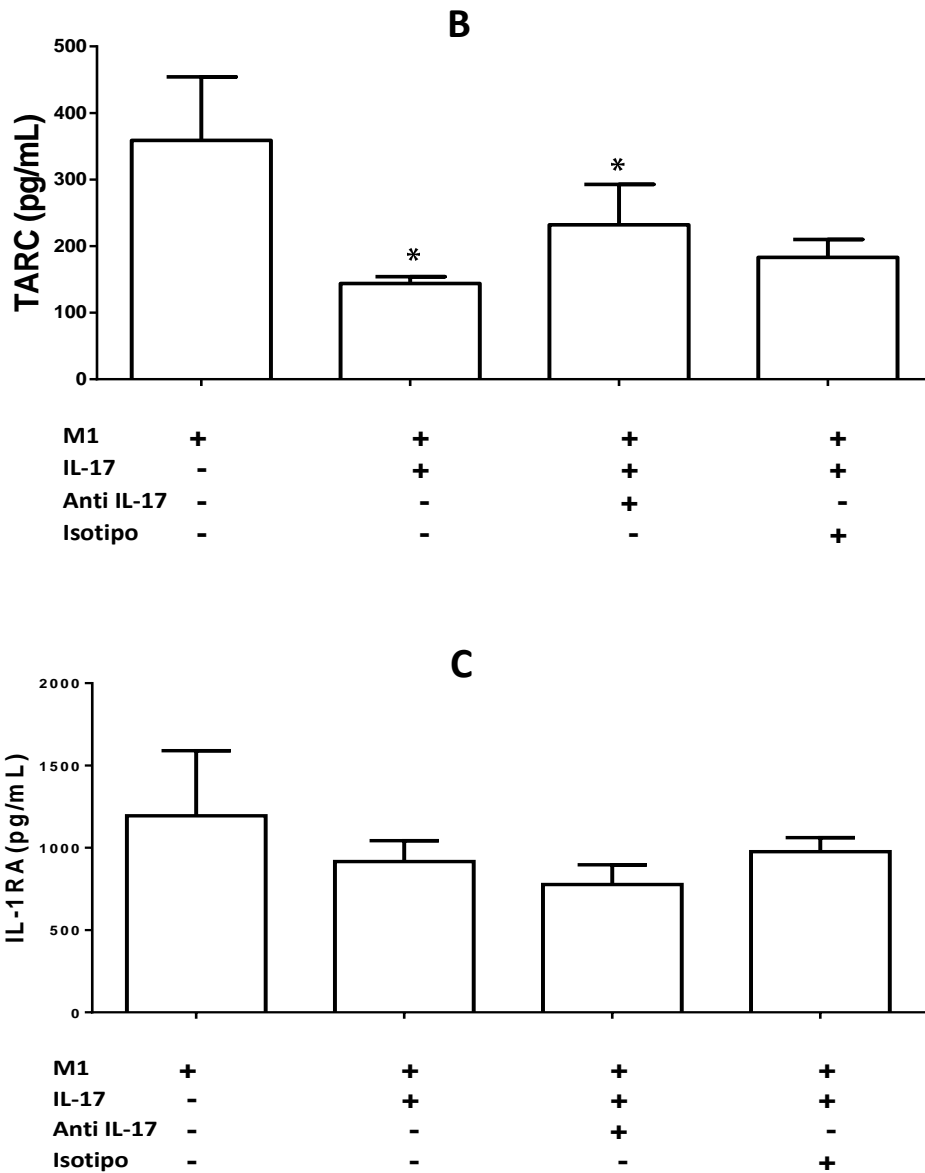


Figura 10. Papel de la IL-17 en la producción de citocinas asociadas a los macrófagos M2a.

Los macrófagos M1 activados se incubaron con de IL-17, anticuerpo anti-interleucina-17, anticuerpo anti IgG de cabra como control de isotipo y en ausencia de IL-17 durante 24 horas. De los sobrenadantes obtenidos se determinó la concentración de: A) IL-10, B) TARC, C) IL-1RA. La concentración de cada citocina está expresada en pg/mL. Los datos obtenidos se realizaron por duplicado con n=7, p<0.05

## **Efecto de la IL-17 en la producción de citocinas en macrófagos M2a.**

Citocinas particulares de macrófagos M2a.

Por otro lado, analizamos si la IL-17 era capaz de afectar la secreción de citocinas en macrófagos M2a activados. La presencia de IL-17 en macrófagos M2a activados provocó una disminución en la concentración de IL-10 en 1.5 veces (*Figura 11A*) y de TARC en 1.5 veces (*Figura 11B*) en comparación con los macrófagos M2a activados. Mientras tanto, el estímulo de IL-17 no afectó la secreción de IL-1RA (*Figura 11C*). El bloqueo de la IL-17 en macrófagos M2a activados provocó un aumento significativo en la concentración de IL-10 2 veces más (*Figura 11A*) y en TARC en 1.3 veces más (*Figura 11B*), sin embargo no afectó la secreción de IL-1RA (*Figura 11C*) con respecto a los macrófagos M2a estimulados con IL-17.

Citocinas particulares de macrófagos M1 en M2a.

En los macrófagos activados hacia un perfil M2a y en presencia de IL-17 se indujo un incremento no significativo en la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-6, IL-12p70 e IL-1 $\beta$  (*Figura 12A, C, D, F y G*) y un aumento no significativo de IL-12p40 e IP-10 (*Figura 12B y E*) con respecto a los macrófagos M2a activados. El bloqueo de la IL-17 provocó una ligera disminución de TNF- $\alpha$ , IL-23, IL-6, IL-12p70, IP-10 e IL-1 $\beta$  (*Figura 12A, C-G*) y un aumento de IL-12p40 (*Figura 12B*), sin embargo no es significativo en comparación con macrófagos M2a activados en presencia de IL-17. Los resultados sugieren que la IL-17 en macrófagos M2a activados induce una disminución de citocinas características de macrófagos M2a como IL-10 y TARC, las cuales incrementan sus niveles al bloquear la IL-17.

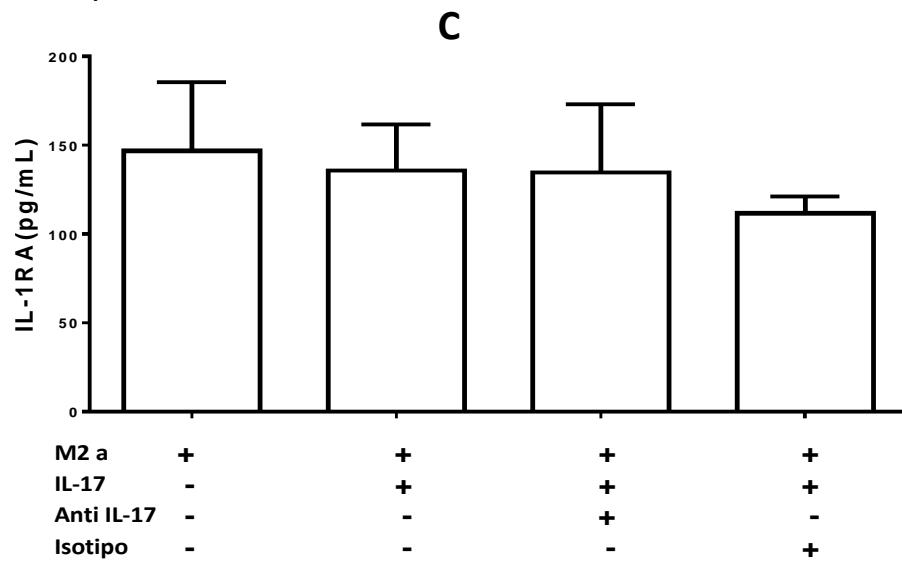
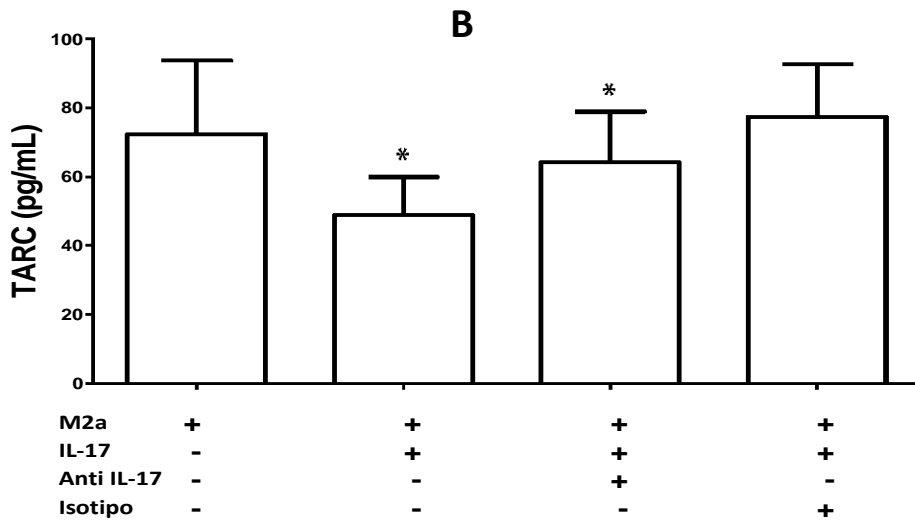
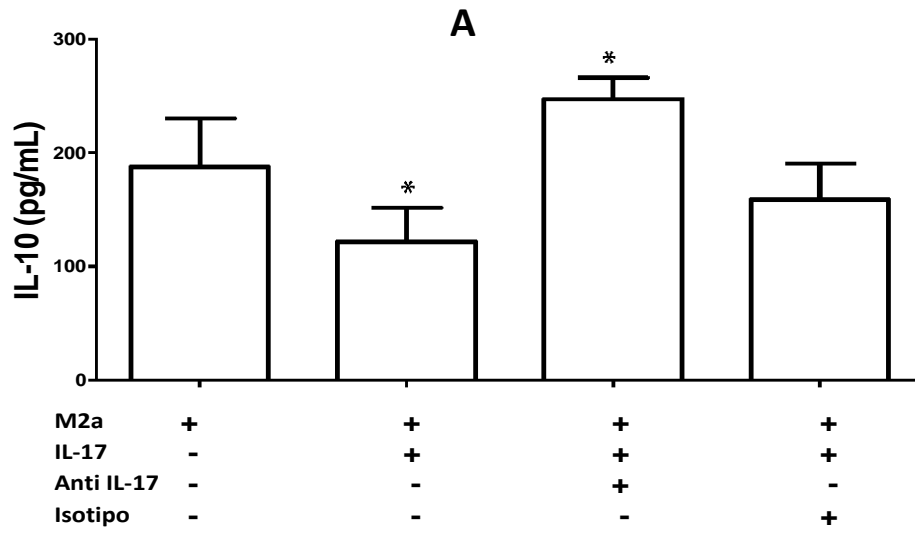
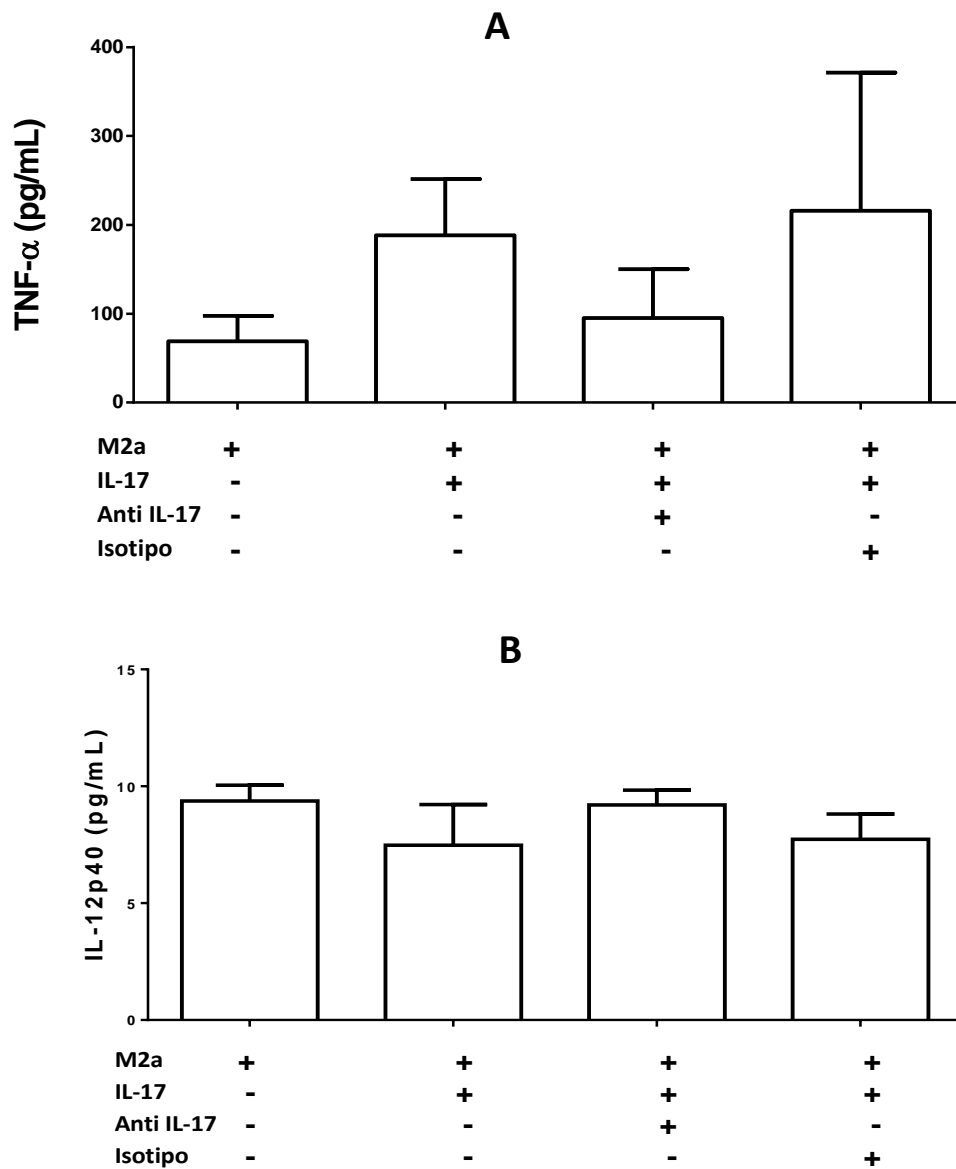
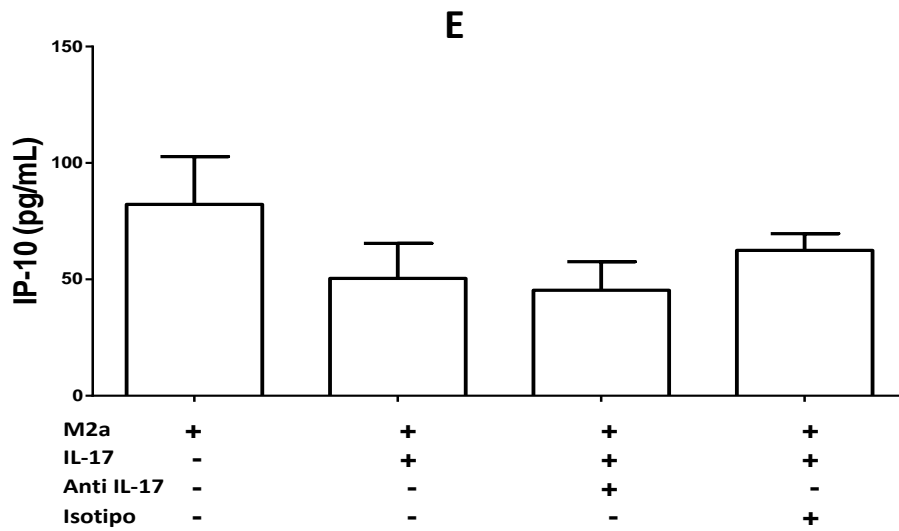
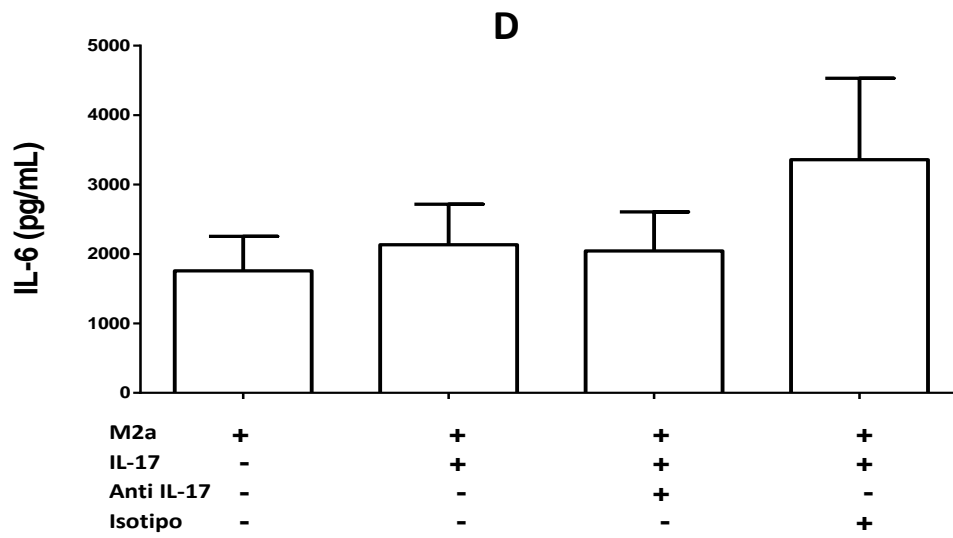
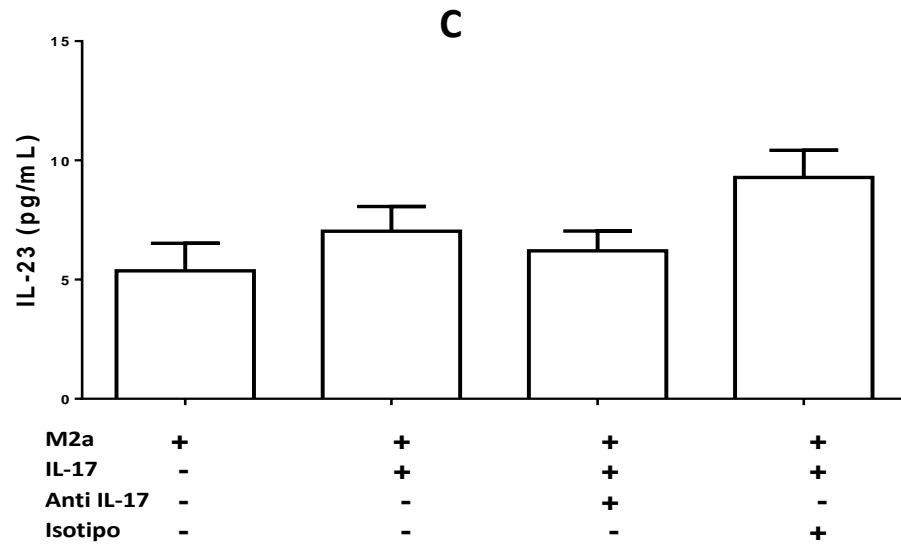


Figura 11. Producción de citocinas en macrófagos M2a en respuesta a IL-17.

Los macrófagos M2a activados fueron incubados en presencia de IL-17, con interleucina 17 y anticuerpo anti-interleucina 17, con IL-17 y anticuerpo anti IgG de cabra como control de isotipo, así como en ausencia de IL-17. Posteriormente a partir de los sobrenadantes se determinó la concentración de: A) IL-10, B) TARC C) IL-1RA por citometría de flujo. La concentración de cada citocina está expresada en pg/mL. Los datos obtenidos se realizaron por duplicado con n=7, p<0.05





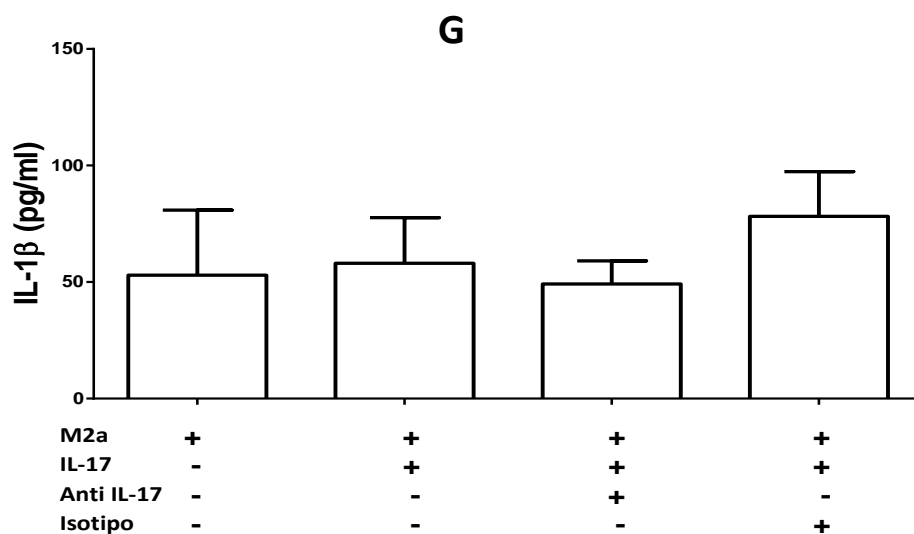
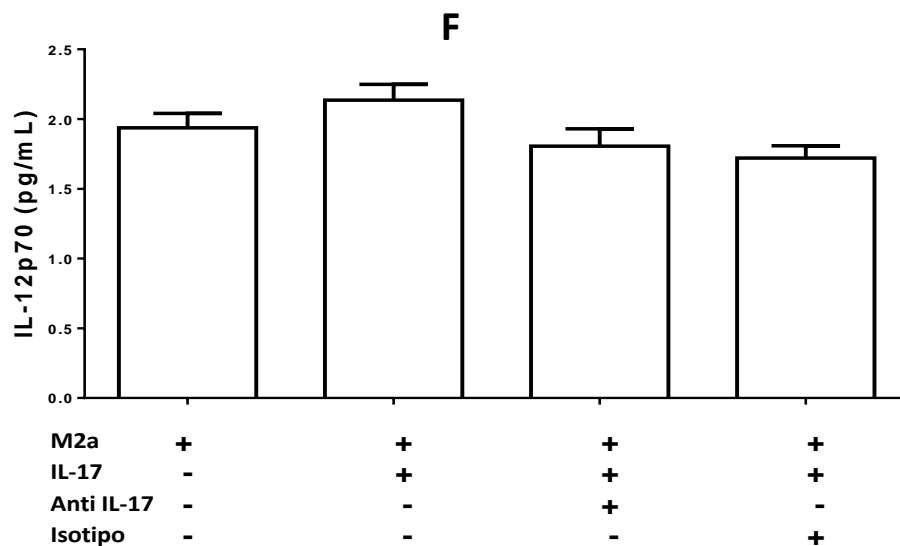


Figura 12. Producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos M2a en respuesta a IL-17.

Los macrófagos M2a activados fueron incubados en presencia de IL-17, con interleucina 17 y anticuerpo anti-interleucina 17, con IL-17 y anticuerpo anti IgG de cabra como control de isotipo, así como en ausencia de IL-17. Posteriormente a partir de los sobrenadantes se determinó la concentración de: D) TNF- $\alpha$ , B) IL-12p40, C) IL-23, D) IL-6, E) IP-10 F) IL-12p70 G) IL-1 $\beta$ . La concentración de cada citocina está expresada en pg/mL. Los datos obtenidos se realizaron por duplicado con n=7, p<0.05



## Discusión.

Existe evidencia creciente de la actividad biológica de la IL-17 en el sistema inmunológico. La IL-17 tiene una función crítica en la respuesta de defensa del huésped contra varios patógenos, pero también se ha hecho notoria por su papel en la patogénesis de muchos trastornos inflamatorios y autoinmunes, lo que hace que esta citoquina se clasifique como una citocina pro-inflamatoria (Iwakura et al., 2011). En este contexto, la IL-17 contribuye a la secreción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos (Jovanovic et al., 1998), los cuales son cruciales en la defensa del huésped y en la enfermedad (Mosser & Edwards, 2008).

En el modelo de estudio determinamos *in vitro* el efecto de la IL-17 en macrófagos M1 y M2a activados. Los resultados obtenidos mostraron que los macrófagos M1 derivados de monocitos humanos presentan una mayor expresión de CD80 y CD86, marcadores característicos de este perfil, y una menor expresión de CD163 y CD206, marcadores asociados a macrófagos M2a, con respecto a los macrófagos M2a.

Mientras tanto, la IL-17 aumentó significativamente los niveles de CD80 en macrófagos M1 activados en comparación con macrófagos M1 activados en ausencia de IL-17; sin embargo, la IL-17 no aumentó la expresión de CD86 y HLA-DR en los macrófagos M1. Al bloquear la IL-17 en cultivos de macrófagos M1 activados, disminuyó la expresión de CD80 a niveles similares a los expresados en macrófagos M1 activados, así como una disminución no significativa en los niveles de HLA DR y CD86 con respecto a los macrófagos M1; lo que demuestra que la IL-17 participa en el incremento de los niveles de expresión de CD80 en macrófagos M1 activados. En este sentido, previamente se demostró que la IL-17 induce una expresión significativa en el incremento de CD80 en monocitos y macrófagos en tejido (Sánchez-Martínez et al., 2017). Por otro lado, al evaluar el efecto de la IL-17 en macrófagos M2a, determinamos que la IL-17 no afecta el fenotipo de macrófagos M2a.

Los resultados obtenidos sugieren que la IL-17 contribuye en la expresión de moléculas co-estimuladoras de la familia B7 en macrófagos M1 activados.

Los macrófagos son importantes de la respuesta inflamatoria en la defensa del huésped en la infección y en la enfermedad, dependiendo de los estímulos con los que se encuentren los macrófagos, estas células pueden potenciar su actividad o contribuir a distintos tipos de macrófagos (Mantovani et al., 2013; Mosser & Edwards, 2008). Por lo que se decidió, determinar el efecto de la IL-17 en la secreción de citocinas en macrófagos M1 y M2a.

Los resultados obtenidos demuestran que el estímulo de IL-17 en macrófagos M1 activados, es capaz de potenciar el incremento de TNF- $\alpha$  en comparación con los macrófagos M1 activados en ausencia de IL-17, debido a que cuando se bloqueó la IL-17, se encontró una respuesta inhibitoria en la secreción de esta citocina y no se afectaron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-12p70 e IL-23 aunque el bloqueo de la IL-17 disminuyó los niveles de IL-6 e IP-10. Estos resultados son apoyados en parte por estudios previos en donde se ha demostrado el efecto de la IL-17 en la secreción de TNF- $\alpha$  en macrófagos maduros humanos (Jovanovic et al., 1998); además se ha demostrado, que macrófagos diferenciados con IL-17 en presencia de DAMPs para TLR4 secretan citocinas inflamatorias (Sánchez-Martínez et al., 2017). Otras evidencias apoyan el papel de los macrófagos en enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis, los cuales contribuyen en la producción de TNF- $\alpha$  (Chávez-Sánchez, 2014; Marble et al., 2007). Más aún, modelos animales deficientes de IL-17 disminuyen la respuesta inflamatoria en placas aterosclerosas (Erbel et al., 2009), sugiriendo un papel esencial de la IL-17 en la activación de macrófagos.

Por otro lado, al evaluar citocinas asociadas a M2a en macrófagos M1, determinamos bajos niveles de estas citocinas. La IL-17 disminuyó los niveles de IL-10 y TARC, sin embargo no afectó los niveles de IL-1RA. Estos resultados sugieren que la IL-17 disminuye la secreción de citocinas asociadas a macrófagos M2a.

Al evaluar el efecto de la IL-17 en macrófagos M2a, determinamos que la IL-17 inhibe la secreción de IL-10 y TARC, debido a que el bloqueo de la IL-17 reestablece los niveles de ambas citocinas como lo encontrado en macrófagos M2 sin IL-17. Los resultados sugieren que la IL-17 contribuye como una citocina que regula

negativamente la producción de IL-10 y TARC en macrófagos. Evidencias previas han demostrado que la IL-10 disminuye la producción de IL-17 en macrófagos, sugiriendo que la IL-10 actúa negativamente en la expresión de IL-17 (Gu et al., 2008); otras evidencias *in vivo* e *in vitro* que refuerzan los resultados obtenidos, ya que demuestran que la IL-17 reduce la producción de la quimiocina TARC en células dendríticas, la cual es esencial en las respuestas Th2 (Schnyder-Candrian et al., 2006).

Adicionalmente, los resultados obtenidos demuestran que los macrófagos M2a en presencia de IL-17, secretan niveles mayores de citocinas inflamatorias que los macrófagos M2a en ausencia de IL-17. Al respecto, se ha reportado que la IL-17 *in vivo* e *in vitro* en macrófagos induce un cambio de polarización hacia el fenotipo de macrófagos M1 (Onishi & Gaffen, 2010; Zhu et al., 2016), lo que implicaría un efecto inflamatorio de la IL-17 en los macrófagos.

## **Conclusiones.**

La IL-17 en macrófagos M1 activados contribuye directamente en incrementar los niveles de CD80 y TNF- $\alpha$ ; además, disminuye los niveles de IL-10 y TARC. Por otro lado, la IL-17 no afecta el fenotipo de macrófagos M2a, pero disminuye los niveles de IL-10 y TARC, además de aumentar ligeramente los niveles de citocinas inflamatorias en comparación con los macrófagos M2a en ausencia de IL-17. Estos resultados sugieren que la IL-17 potencia la respuesta inflamatoria en macrófagos M1 e induce la regulación negativa de IL-10 y TARC en macrófagos M2a además de inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias, lo que podría favorecer en la defensa del huésped o contribuir en la patogénesis de enfermedades inflamatorias.

## Referencias.

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Barcelona, España: Editorial Elsevier.

Amatya N., Garg A. V., Gaffen S. L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends in immunology*, 38(5), 310-322.

Chávez-Galán L., Olleros M. L., Vesin D., Garcia I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Frontiers in immunology*, 6, 263. doi:10.3389/fimmu.2015.00263

Chávez-Sánchez L., Espinosa-Luna J. E., Chávez-Rueda K., Legorreta-Haquet M. V., Montoya-Díaz E., Blanco-Favela F. (2014), Innate Immune System Cells in Atherosclerosis, Elsevier, *Archives of Medical Research* 45;1-14

Clemente T. M., Mulye M., Justis A. V., Nallandhighal S., Tran T. M., Gilk S. D. (2018), *Coxiella burnetii* Blocks Intracellular Interleukin-17 Signaling in Macrophages, *Infection and Immunity*, 21;86(10). pii: e00532-18. doi: 10.1128/IAI.00532-18.

Cua D. J., Tato C. M. (2010), Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system, *Nature Reviews Immunology*, 10(7):479-89. doi: 10.1038/nri2800.

Eldin C., Mélenotte C., Mediannikov O., Ghigo E., Million M., Edouard S., Mege JL., Maurin M., Raoult D. (2017), From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change, *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1):115-190.

Erbel C., Chen L., Bea F., Wangler S., Celik S., Lasitschka F., Wang Y., Böckler D., Katus H.A., Dengler T. J. (2009), Inhibition of IL-17A Attenuates Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Deficient Mice, *The Journal of Immunology*, 15;183(12):8167-75. doi: 10.4049/jimmunol.0901126.

Erbel C., Akhavanpoor M., Okuyucu D., Wangler S., Dietz A., Zhao L., Stellos K., Little K. M., Lasitschka F., Doesch A., et al. (2014), IL-17A Influences Essential Functions of the Monocyte/Macrophage Lineage and Is Involved in Advanced Murine and Human

Atherosclerosis, *The Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 193(9), 4344–4355.  
doi:10.4049/jimmunol.1400181

Gerhardt T., Ley K. (2015), Monocyte trafficking across the vessel wall, *Cardiovascular research*, 107(3), 321-30.

Gordon S., Plüddemann A. (2017), Tissue macrophages: heterogeneity and functions, *BMC Biology*, 15(1):53. doi: 10.1186/s12915-017-0392-4.

Gu C., Wu L., Li X. (2013), IL-17 family: cytokines, receptors and signaling, *Cytokine*, 64(2), 477-85.

Gu Y., Yang J., Ouyang X., Liu W., Li H., Yang J., Bromberg J., Chen SH., Mayer L., Unkeless J. C., et al. (2008), Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells, *European Journal of Immunology*, 38(7):1807-13. doi: 10.1002/eji.200838331.

Italiani P., Boraschi D. (2014), From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation, *Frontiers in Immunology*, 17;5:514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.

Iwakura Y., Ishigame H., Saijo S., Nakae S. (2011), Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members, *Immunity*, 25;34(2):149-62. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.012.

Jovanovic D. V., Di Battista J. A., Martel-Pelletier J., Jolicoeur F. C., He J., Zhang M., Mineau F., Pelletier JP. (1998), IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages, *The Journal of Immunology*, 160:3513-3521.

Kavurma M. M., Rayner K. J., Karunakaran D. (2017), The Walking Dead: Macrophage inflammation and death in atherosclerosis, *Current opinion in lipidology*, 28(2), 91–98. doi:10.1097/MOL.0000000000000394

Kirkham B. W., Kavanaugh A., Reich K. (2013), Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis, *Immunology*, 141(2):133-42. doi: 10.1111/imm.12142.

Koltsova E. K., Garcia Z., Chodaczek G., Landau M., McArdle S., Scott S. R., von Vietinghoff S., Galkina E., Miller Y. I., Acton S. T., et al. (2012), Dynamic T cell–APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis, *The Journal of clinical investigation*, 122(9), 3114–3126. doi:10.1172/JCI61758

Ley K., Laudanna C., Cybulsky M. I., Nourshargh S. (2007), Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nature Reviews*, 7(9):678-89.

Li B., Li W., Li X., Zhou H. (2017), Inflammation: A Novel Therapeutic Target/Direction in Atherosclerosis, *Current Pharmaceutical Design*, 7;23(8):1216-1227. doi: 10.2174/1381612822666161230142931.

Liuzzo G., Trotta F., Pedicino D. (2013), Interleukin-17 in atherosclerosis and cardiovascular disease: the good, the bad, and the unknown, *European Heart Journal*., 34(8):556-9. doi: 10.1093/eurheartj/ehs399.

Mantovani A., Biswas S. K., Galdiero M. R., Sica A., Locati M. (2013), Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling, *The Journal of Pathology*, 229(2):176-85. doi: 10.1002/path.4133.

Marble D.J., Gordon K. B., Nickoloff B. J. (2007), Targeting TNF $\alpha$  Rapidly Reduces Density of Dendritic Cells and Macrophages in Psoriatic Plaques with Restoration of Epidermal Keratinocyte Differentiation, *Journal of Dermatological Science*, 48(2): 87–101. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.06.006

Martínez F. O., Gordon S. (2014), The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000prime reports*, 6, 13. doi:10.12703/P6-13

Medzhitov R. (2008), Origin and physiological roles of inflammation, *Nature*, 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.

Miossec P., Kolls J. K. (2012), Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation, *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10):763-76. doi: 10.1038/nrd3794.

Monin L., Gaffen S. L. (2018), IL-17 family cytokines: signaling mechanisms, biological activities and therapeutic implications, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(4), a028522. doi:10.1101/cshperspect.a028522

Mora-Ruíz M. D., Blanco-Favela F., Chávez Rueda A. K., Legorreta-Haquet M. V., Chávez-Sánchez L. (2019), Role of interleukin-17 in acute myocardial infarction, *Molecular Immunology*, 107:71-78. doi: 10.1016/j.molimm.2019.01.008.

Mosser D. M., Edwards J. P. (2008), Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nature Reviews Immunology*, 8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448.

Murray P. J. (2017), Macrophage Polarization, *Annual Review of Physiology*, 10;79:541-566. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.

Onishi R. M., Gaffen S. L. (2010), Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease, *Immunology*, 129(3):311-21. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03240.x.

Sánchez-Martínez M. P., Blanco-Favela F., Mora-Ruiz M. D., Chávez-Rueda A. K., Bernabe-García M., Chávez-Sánchez L. (2017). IL-17-differentiated macrophages secrete pro-inflammatory cytokines in response to oxidized low-density lipoprotein. *Lipids in health and disease*, 16(1), 196. doi:10.1186/s12944-017-0588-1

Schnyder-Candrian S., Togbe D., Coullin I., Mercier I., Frank B., Quesniaux V., Fossiez F., Ryffel B., Schnyder B. (2006), Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma, *Journal of Experimental Medicine*, 27; 203(12): 2715–2725. doi: 10.1084/jem.20061401

Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaeili SA., Mardani F., Seifi B, Mohammadi A., Afshari J. T., Sahebkar A. (2018), Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease, *Journal of Cellular Physiology*, 233(9):6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429.

Song X., Qian Y. (2013), The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling, *Cytokine*, 62(2):175-82. doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.014.

Veldhoen M. (2017), Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity, *Nature Immunology*, 18(6):612-621. doi: 10.1038/ni.3742.

Wang LX., Zhang SX., Wu HJ., Rong XL., Guo J. (2018), M2b macrophage polarization and its roles in diseases, *Journal of Leukocyte Biology*, 1-14.

Xu S., Cao X. (2010), Interleukin-17 and its expanding biological functions, *Cellular molecular immunology*, 7(3), 164-74.

Ye P., Rodriguez F. H., Kanaly S., Stocking K. L., Schurr J., Schwarzenberger P., Oliver P., Weitao H., Zhang P., Zhang J., et al. (2001), Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense, *The Journal of Experimental Medicine*, 20;194(4):519-27.

Zhou D., Huang C., Lin Z., Zhan S., Kong L., Fang C., Li J. (2014), Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways, *Cellular Signalling*, 26(2):192-7. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.

Zhu Y., Tan W., Demetriades A. M., Cai Y., Gao Y., Sui A., Lu Q., Shen X., Jiang C., Xie B. (2016), Interleukin-17A neutralization alleviated ocular neovascularization by promoting M2 and mitigating M1 macrophage polarization, *Immunology*, 147(4):414-28. doi: 10.1111/imm.12571.