

TESI DOCTORAL

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR *SCAVENGER* CD36 EN ELS LEUCÒCITS: CONSEQÜÈNCIES FUNCIONALS EN LA INFLAMACIÓ

AUTOR

Carlos Zamora Atenza

DIRECTORA

Sílvia Vidal Alcorisa

Programa de Doctorat en Immunologia

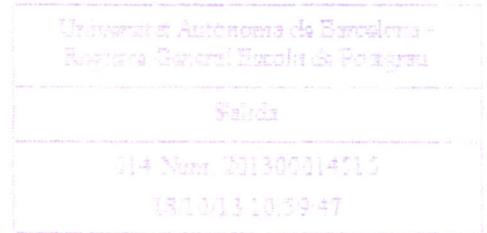
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Servei d'Immunologia de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau

Universitat Autònoma de Barcelona, 2014



Universitat Autònoma de Barcelona
Escola de Postgrau



Exp. ED

Sr. Carlos Zamora Atenza
Fontanet, 10
08208 Sabadell

Vista la instància presentada per en/na Carlos Zamora Atenza de sol·licitud de presentació de tesi doctoral com a compendi de publicacions,

De conformitat amb el que disposa la Normativa acadèmica de la UAB aplicable als estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol (text refós aprovat per l'Acord de Consell de Govern de 2 de març de 2011),

RESOLC

Acceptar la presentació de la tesi doctoral de Carlos Zamora Atenza com a compendi de publicacions amb els articles següents:

- Zamora, C.; Cantó, E. [et al.] "Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation". A: *Journal of Leukocyte Biology* (2013).
- Zamora, C.; Cantó, E. [et al.] "Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals". A: *Cytokine* (2012: 60: 257-265).

La Comissió de Doctorat,
Per delegació

UAB
Universitat Autònoma de Barcelona
Maria Pilar Dellunde i Clavé
Vicerectora d'Investigació

Pilar DELLUNDE CLAVÉ
Vicerectora d'Investigació

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 16/10/2013

Contra aquesta resolució, que no esgota la via administrativa, les persones interessades poden interposar recurs d'alçada davant la Rectoria Magnífica de la UAB, en el termini d'un mes, a comptar des del dia següent a la recepció d'aquesta notificació o, si s'escau, des del dia següent de la seva publicació, de conformitat amb el que preveu l'article 115 de la Llei 30/1992, de 26 de novembre, de Règim Jurídic de les Administracions Públiques i del Procediment Administratiu Comú, modificada per la Llei 4/1999, de 13 de gener, i l'article 76 de la Llei 26/2010, de 3 d'agost, de Règim Jurídic i de Procediment de les Administracions Públiques de Catalunya de la Generalitat de Catalunya.

A la meva família

AGRAÏMENTS

A la Silvia Vidal, per ensenyar-me tot el que he après en ciència, que mai existeix un resultat negatiu, per motivar-me, per fer-me sentir valorat, per escoltar-me en els moments difícils i estar sempre disposada a ajudar-me i aconsellar-me. Per confiar amb mi des del primer moment i per fer-me sentir que més que una jefa, tinc una amiga amb qui parlar i confiar.

A la Bet, més que una companya de treball, una amiga. Per ensenyar-me la realitat de la ciència, a ser rigorós amb el meu treball i a interpretar a fons els resultats. Per escoltar-me tant en lo laboral com en lo personal i tenir sempre un moment per mi. Per els moments divertits que hem tingut tots plegats. Gràcies.

Al Juan, un gran amic en el laboratori. Pels llargs moments de tertúlies sobre ciència, pels moments divertits que hem tingut i per saber alegrar-me en els dies difícils.

A la Consol i Eder, pels grans moments que hem passat, els moments tan divertits que hem tingut i per estar sempre disposats a col·laborar i ajudar.

A la Cristina i M^a Angels, per la seva disposició a col·laborar en tot moment.

Al Cándido, Germà, Maite i tots els membres del departament d'immunologia, per estar sempre disposats a escoltar-me i aconsellar-me.

Als Cèsars, per col·laborar en la recollida de mostres de pacients i per estar sempre disposats a donar idees

Al Xavi, un gran amic. Per estar des del principi d'aquesta aventura amb mi, des de la carrera. Per estar sempre en els moments difícils i en els bons, per saber què dir-me sempre en tot moment. Que siguin molts anys més així. Gràcies.

A l'Eduard, Miquel, Gisela, Fina i tots els membres del grup de Neuromuscular, pels moments divertits que hem compartit al menjador i per tenir un moment per escoltar-me i ajudar-me

Als meus amics, per les alegries i bons moments que hem passat.

Als meus germans Dani i M^a Lluïsa, per motivar-me i donar-me suport en tot moment.

Als meus pares, per donar-me suport des del primer moment de la meua vida i ensenyar-me que amb esforç i voluntat, un pot aconseguir els objectius que es marqui.

I en especial, a Gloria i Mario, per estar amb mi des del principi d'aquesta aventura, per fer-me feliç, per animar-me en els moments més difícils de la meua vida, faltant-me paraules per agrair-los tot el que fan per mi. Sense ells tot això no seria possible.

ABREVIATURES

Anti-CCP	Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies
AR	Artritis reumatoide
AP-1	<i>Activation protein-1</i>
CD	Cluster de diferenciació
CFSE	5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidylester
CMH	Complexe major d'histocompatibilitat
CMN	Cèl·lules mononuclears
CRP	<i>C-reactive protein</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DAS28-CRP	<i>Disease activity score-C reactive protein</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ESR	<i>Erythrocyte sedimentation rate</i>
FR	Factor reumatoide
FSL1	Pam2CGDPKHPKSF
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HDL	Lipoproteïna de elevada densitat
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferó
IL	Interleuquina
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinases</i>
IRF	<i>Interferon regulating factor</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
iGMFI	<i>Integrated geometric fluorescence mean</i>
kDa	Quilodaltons (Pes molecular proteïnes)
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
LPS	Lipopolisacàrid
LRR	<i>Leucin rich region</i>
Mal	<i>MyD88 adaptor-like</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>

NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	<i>Cèl·lules Natural Killer</i>
RA	<i>Rheumatoid arthritis</i>
RF	<i>Rheumatoid factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SH2	Domini SH2: homologia Src2
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
OxLDL	Lipoproteïna de baixa densitat oxidada
OxHDL	Lipoproteïna de elevada densitat oxidada
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
Pam₃CSK₄	Pam3CysSerLys4
PBX1	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
PCR	Proteïna C reactiva
PKC	<i>Protein kinase C</i>
Plt	Plaqueta
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
TCR	Receptor de la cèl·lula T
TIR	<i>Toll/IL1 receptor</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis alpha</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>Trif-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-related adaptor protein inducing interferon</i>
TSP	Trombospondina
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VSG	Velocitat de sedimentació glomerular

ÍNDIX

1. RESUM/SUMMARY.....	1
1.1. RESUM.....	3
1.2. SUMMARY.....	5
2. INTRODUCCIÓ.....	9
2.1. INFLAMACIÓ	11
2.2. RECEPTORS DE MEMBRANA DURANT LA INFLAMACIÓ	12
2.2.1. <i>TOLL-LIKE RECEPTORS</i>	12
2.2.1.1. Estructura dels TLRs.....	13
2.2.1.2. Localització i lligands dels TLRs.....	15
2.2.1.3. Senyalització dels TLRs.....	16
2.2.1.4. Funcions dels TLRs durant la inflamació.....	19
2.2.2. RECEPTORS <i>SCAVENGER</i>	21
2.2.2.1. Classes de receptors <i>scavenger</i>	22
2.2.2.2. Receptor <i>scavenger</i> CD36.....	25
2.2.2.3. Estructura i senyalització del CD36.....	25
2.2.2.4. Funcions del CD36 durant la inflamació.....	27
2.3. ELS RECEPTORS ALS COMPONENTS CEL·LULARS DE LA INFLAMACIÓ.....	31
2.3.1. MONÒCITS.....	31
2.3.2. LIMFÒCITS.....	34
2.3.3. NEUTRÒFILS.....	37
2.3.4. PLAQUETES.....	39

2.4. CITOQUINES QUE S'EXPRESSEN PER L'ACTIVACIÓ DE RECEPTORS DE RESPOSTA INNATA DURANT LA INFLAMACIÓ.....	40
2.4.1. TNF α	40
2.4.2. IL-10.....	42
2.4.3. IL-6.....	43
2.4.4. IL-17.....	45
2.4.5. IFN- γ	47
3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS.....	49
4. PUBLICACIONS.....	53
4.1. ARTICLE I: Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals.....	55
4.2. ARTICLE II: Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in Inflammation.....	71
5. SÍNTESI DE RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	87
5.1. ARTICLE I.....	89
5.1.1. Síntesi de resultats.....	89
5.1.2. Discussió i rellevància.....	92
5.2. ARTICLE II.....	93
5.2.1. Síntesi de resultats.....	93
5.2.2. Discussió i rellevància.....	97
6. CONCLUSIONS.....	99
7. BIBLIOGRAFIA.....	103

1. RESUM/SUMMARY

1. 1. RESUM

La inflamació és un conjunt de processos biològics que tenen com a finalitat comú protegir a l'organisme dels patògens i dany. Durant el procés inflamatori, intervien diferents components cel·lulars a través de diferents receptors de membrana i citoquines proinflamatòries i antiinflamatòries.

Un dels receptors involucrats en aquest procés inflamatori és el receptor *scavenger* CD36. Aquest receptor s'expressa en diferents tipus cel·lulars com monòcits i plaquetes. El CD36 és una molècula capaç de reconèixer i captar lipoproteïnes modificades. Durant la inflamació, el CD36 als monòcits intervé en el reconeixement de patògens, actuant com a coreceptor dels *Toll-like receptors* (TLRs) perquè es doni una eficient resposta inflamatòria. A més, intervé en la fagocitosi de neutròfils apoptòtics durant els processos finals de la inflamació. Es desconeix si els TLRs modulen el CD36 en els monòcits, i si és així, quines conseqüències funcionals comportarà aquesta modulació. Per altra banda, l'expressió de CD36 en limfòcits és intrigant per la seva funció *scavenger*, i no es coneix si l'expressió pot ser extrínseca a ells i quines funcions podria tenir la subpoblació de limfòcits T que l'expressa.

Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals.

Carlos Zamora, Elisabet Cantó, Juan C. Nieto, M. Angels Ortiz, Cándido Juárez, Sílvia Vidal. *Cytokine* 2012 Oct; 60(1): 257-65.

El reconeixement de lligands via TLR activa la secreció de citoquines pro- i antiinflamatòries i modula l'expressió de molècules involucrades en la fagocitosi i

activitat microbiana. Està demostrat que el CD36 pot actuar com a coreceptor del TLR2. No obstant això, no es coneix si els lligands de TLR poden modular l'expressió de CD36 a la superfície dels monòcits. Per això, vam estimular cèl·lules mononuclears (CMNs) amb lligands de TLR2 (Pam₃CSk₄ i FSL1) i TLR4 (Lipopolisacàrid, LPS), i es va analitzar l'expressió de CD36 per citometria de flux en les diferents subpoblacions de monòcits, caracteritzades pels marcadors CD14 i CD16. Els lligands de TLR2 i TLR4 van disminuir l'expressió de CD36 en totes les subpoblacions de monòcits, produint-se una internalització cap a l'interior de la cèl·lula. Tot i que els lligands de TLR indueixen l'expressió del factor de necrosis tumoral (TNF α , de l'anglès *Tumor necrosis alpha*), IL10 i IL6, només els cultius amb TNF α van ser capaços de disminuir el CD36. En canvi, la neutralització amb anticossos contra TNF α en els cultius amb lligands de TLR2 però no de TLR4, només va frenar parcialment la disminució de CD36. La pèrdua de CD36 en els monòcits a causa dels senyals TLR va fer disminuir la capacitat de fagocitar neutròfils apoptòtics.

Així, la modulació del receptor *scavenger* CD36 per senyals de TLR en els monòcits té conseqüències funcionals. Caracteritzar aquesta regulació podria ajudar a entendre la resposta innata en les patologies inflamatòries i desenvolupar teràpies específiques per modular aquest mecanisme.

Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation.

Carlos Zamora, Elisabet Cantó, Juan C. Nieto, M. Angels Ortiz, Cesar Diaz-Torné, Cesar Diaz-Lopez, Josep M. Llobet, Candido Juarez, Sílvia Vidal. *Journal of Leukocyte Biology* 2013 Sep; 94(3): 521-9.

1. RESUM/SUMMARY

L'expressió del receptor *scavenger* CD36 en limfòcits és controvertida i intrigant. Nosaltres vam observar una subpoblació minoritària de limfòcits T que expressava aquest marcador en la superfície cel·lular. Vam investigar la font del CD36 en els limfòcits i quina capacitat de proliferació i producció de citoquines presentaven els limfòcits T que eren CD36+. L'anàlisi per citometria de flux i microscòpia de fluorescència va mostrar que el CD36 de les plaquetes unides als limfòcits era la responsable de la detecció d'expressió de CD36 en els limfòcits. Així, el CD36 va ser utilitzat per caracteritzar la subpoblació de limfòcits amb plaquetes unides. Després de l'activació dependent de TCR, els limfòcits T amb plaquetes unides (CD36+) presentaven menor proliferació i producció de IL-17 i IFN γ que els limfòcits T CD4+ que no portaven plaquetes. Després vam estudiar la presència de limfòcits T CD4+ CD36+ en pacients amb artritis reumatoide (AR), observant que el percentatge d'aquesta població era superior en els pacients d'AR comparat amb els donants sans. Els pacients d'AR amb elevats títols d'anticossos contra pèptids citrul·linats (anti-CCP), factor reumatoide (FR), elevats nivells de IL-17 i IFN γ en plasmà i elevat risc cardiovascular eren aquells que presentaven menor percentatge de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides.

Així, els resultats suggereixen que la unió de la plaqueta als limfòcits modifica la funcionalitat d'aquests. Podria ser un mecanisme regulador en la patologia de AR que conferiria un fenotip menys sever.

1.2. SUMMARY

Inflammation is a biological process that aims to protect the body from the harmful effects of pathogens and cellular damage. During inflammatory process, different cells

are involved, such as monocytes and lymphocytes, through different membrane receptors and pro- and antiinflammatory cytokines.

One receptor involved in inflammation is the scavenger receptor CD36. This receptor is expressed on different cells, such as monocytes and platelets. However, CD36 expression on T lymphocytes is a current controversy in the literature. CD36 is a molecule that recognize and bind modified lipoproteins. During inflammation, CD36 is involved in pathogen recognition, acting as TLR coreceptor. Moreover, CD36 is involved in the phagocytosis of apoptotic neutrophils during final steps of inflammation.

It is unknown whether TLR can modify CD36 expression on monocytes and which are its functional consequences. On T lymphocytes, CD36 expression is intriguing because of its scavenger function, and it is unknown whether CD36 expression could be extrinsic to T lymphocytes and how this T lymphocyte CD36⁺ subpopulation functions.

Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals.

Carlos Zamora, Elisabet Cantó, Juan C. Nieto, M. Angels Ortiz, Cándido Juárez, Sílvia Vidal. *Cytokine* 2012 Oct; 60(1): 257-65

TLR recognition activates the secretion of pro- and antiinflammatory cytokines and it also modulates the expression of crucial molecules involved in phagocytosis and antimicrobial activity. CD36 can act as a TLR2 coreceptor, however it remains unknown whether TLR can modulate the expression of this scavenger receptor. In order to analyze this possibility, we stimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with TLR2 (Pam₃CSK₄ and FSL1) and TLR4 ligands (lipopolysaccharide,

LPS), and then analyzed by flow cytometry the CD36 expression on the different monocyte subpopulations (characterized by CD14 and CD16 markers). TLR2 and TLR4 ligands downregulated CD36 on the surface of monocyte subpopulations, guiding the protein to intracellular compartments. Even though TLR-activation induced TNF α , IL-10 and IL-6 production, only recombinant TNF α was able to downregulate CD36. Additionally, neutralizing anti-TNF α antibodies showed that TLR2 but not TLR4-induced downregulation was partially abrogated. CD36 downregulation caused by TLR signals reduced the capability of monocytes to phagocyte apoptotic neutrophils.

Then, modulation of scavenger receptor CD36 expression by TLR targeting on monocytes has relevant functional consequences. Characterization this complex regulation may help us to understand the innate response induced by TLR ligands and to develop specific therapeutic drugs for the modulation of this mechanism.

Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation.

Carlos Zamora, Elisabet Cantó, Juan C. Nieto, M.Angels Ortiz, Cesar Diaz-Torné, Cesar Diaz-Lopez, Josep M. Llobet, Candido Juarez, Sílvia Vidal. *Journal of Leukocyte Biology* 2013 Sep; 94(3): 521-9

Expression of the scavenger receptor CD36 on lymphocytes has been intriguing. We observed that a minor subpopulation of lymphocytes expressed CD36 on the cell surface. We next investigated the source of CD36 and also the capability of proliferation and cytokine production of T CD36⁺ lymphocytes. Flow cytometry analysis and immunofluorescence microscopy showed that CD36⁺ platelets bind to T lymphocytes. Bound platelets but not lymphocyte surfaces were responsible for CD36 detection on lymphocytes. CD36 was then used as a tool to select and characterize lymphocytes with

bound platelets. Activation-induced proliferation and IL-17 and IFN γ production was lower in CD4⁺ T lymphocytes with bound platelets than in lymphocytes without bound platelets. We then studied the presence of CD4⁺ CD36⁺ T lymphocytes in rheumatoid arthritis (RA) patients, observing that the percentage of CD4⁺ lymphocytes with bound platelets was higher on RA patients than in healthy donors. RA patients with higher titers of anti-CCP, rheumatoid factor (RF) levels, high levels of IL-17 and IFN γ in plasma and higher cardiovascular risk index presented the lowest percentage of CD4⁺ lymphocytes with bound platelets.

These results suggest that platelet-binding modifies lymphocyte function. Our findings suggest that this binding could be a regulatory mechanism in RA pathology that confers a less severe phenotype.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. INFLAMACIÓ

La inflamació és un conjunt de processos biològics que tenen com a finalitat comú protegir a l'organisme dels patògens i dany. Aquesta resposta inflamatòria pot ser deguda a factors externs, com lesions produïdes amb agents mecànics, físics, químics i biològics, o bé pot ser deguda a factors endògens, com la necrosis tissular, que produeixen senyals de perill per l'organisme. La inflamació es caracteritza per quatre símptomes cardinals descrits per Celsus:

- Vermellor → Degut a un augment del nombre d'eritròcits circulants per la zona a causa de l'augment del flux sanguini en la zona afectada.
- Tumoració → És el resultat d'un increment de fluids i infiltració cel·lular pels vasos sanguinis dilatats i permeables que envolten el teixit afectat.
- Calor → Sensació causada per un augment del flux sanguini en la zona
- Dolor → Causat per efecte directe dels mediadors i extensió dels nervis sensorials degut a l'edema

Més tard, Galeno va introduir un altre símptoma de la inflamació, la pèrdua de funció. Aquest símptoma es caracteritza per una pèrdua de mobilitat en l'extremitat afectada a causa de l'edema i el dolor o pel reemplaçament de cèl·lules funcionals per teixit cicatritzat.

L'objectiu principal de la inflamació i la resposta generada és protegir i fer front als estímuls nocius per l'organisme, reparant posteriorment el teixit danyat per tal de restaurar l'homeòstasi de l'òrgan afectat.

Si és dona una resposta inflamatòria eficient i l'organisme és capaç d'eliminar els estímuls nocius que han causat la inflamació, es durà a terme una resposta inflamatòria aguda, retornant ràpidament els teixits a les condicions d'homeòstasi normals. Aquesta es caracteritza per vasodilatació, canvis en l'estructura de la microvasculatura associats a un increment de la permeabilitat i migració de leucòcits al focus del lloc afectat, on s'acumulen i s'activen. Aquesta inflamació té com a objectiu destruir l'agent causant i a la mateixa vegada induir la recuperació del teixit danyat per regeneració i cicatrització ¹. Si pel contrari les condicions anormals es prolonguen, bé perquè l'organisme no és capaç d'eliminar l'estímul nociu o perquè la inflamació aguda no es resol correctament degut a alteracions del sistema immunològic, això donarà lloc a una inflamació crònica, caracteritzada per un dany tissular prolongat i processos de reparació alterats ².

Els estímuls nocius per l'organisme són reconeguts per diferents receptors situats a les membranes de les cèl·lules del sistema immunitari, activant-les i induint diferents proteïnes que induiran la resposta inflamatòria.

2.2. RECEPTORS DE MEMBRANA DURANT LA INFLAMACIÓ

2.2.1. TOLL-LIKE RECEPTORS

Els TLRs són proteïnes de transmembrana tipus I que pertanyen al grup dels receptors que reconeixen patrons (PRRs, de l'anglès *Pattern Recognition receptors*). Aquests receptors reconeixen estructures moleculars patogèniques (PAMPs, de l'anglès *Pathogen-associated molecular patterns*) que estan altament conservades en l'evolució i en la majoria dels patògens. A més, són capaços de reconèixer molècules amb patrons moleculars associats a dany cel·lular (DAMPs, de l'anglès *Damage-*

associated molecular pattern). Els TLRs estan expressats en diversos tipus de cèl·lules immunològiques, sobretot en cèl·lules del sistema immune innat com els monòcits/macròfags i les cèl·lules dendrítiques, i també estan expressats en cèl·lules del sistema immune adaptatiu com els limfòcits B i algunes subpoblacions de limfòcits T. Fins i tot hi ha TLRs en cèl·lules no immunològiques, com els fibroblasts i les cèl·lules epitelials.

El reconeixement de patògens pels TLRs comporten una cascada de senyalització cel·lular que indueix l'expressió de múltiples gens involucrats en la resposta a microorganismes. Aquest reconeixement desencadenarà diferents processos que desembocaran en inflamació ³.

2.2.1.1. Estructura dels TLRs

Els TLRs estan formats per dos dominis ⁴:

1. Domini extracel·lular, que consta de motius rics en leucines (LRR, de l'anglès *Leucine rich regions*) per on reconeixen els PAMPs.
2. Domini intracel·lular, que consta d'un domini citoplasmàtic anomenat domini homòleg al toll/interleuquina 1 (TIR), homòleg al receptor de la IL-1, que s'encarrega d'unir diferents adaptadors amb dominis TIR i de la senyalització.

El domini extracel·lular està format per 19-25 tàndems de motius LRR, que contenen 20-30 seqüències d'aminoàcids cadascun amb el motiu LxxLxLxxN com a seqüències conservades. Les cadenes laterals de les leucines conservades apunten cap a l'interior de la proteïna i estan implicades en la formació del nucli hidrofòbic. Les asparagines

conservades són importants en el manteniment global de la forma de la proteïna degut a què formen una xarxa d'enllaços d'hidrogen continuo amb els carbonils d'oxigen dels mòduls de LRR veïns. Els residus variables "x" en els motius estan exposats a l'exterior de la membrana, i alguns d'ells juguen un paper important en el reconeixement dels lligands de TLRs. Així, el paper dels residus en els motius LRR estan clarament definits, on els residus conservats tenen funció estructural, i els motius variables tenen funció d'interacció amb els lligands ⁵⁻⁶. L'estructura dels motius LRR dels TLRs és de ferradura, hi ha diferència amb d'altres PRRs on la part còncava de l'estructura de LRR conté la fulla β central, i la part convexa consisteix en bucles paral·lels i hèlix curtes 3_{10} , la part convexa dels TLRs pot tenir hèlixs α i bucles irregulars que li confereixen una superfície irregular més adequada per la interacció amb lligands no proteïcs ⁷⁻⁸. Inesperadament, les estructures d'alguns TLRs (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 i TLR10) mostren transicions que divideixen el domini extracel·lular en tres subdominis: N-terminal, central i C-terminal ^{7, 9-10}. Les transicions estructurals que es troben en aquests TLRs són causades per seqüències irregulars de LRR en els dominis centrals, que no contenen l'asparagina i que tenen un paper important en l'estabilització de l'estructura en ferradura. Els lligands del TLR1, 2 i 6 coincideixen en les transicions estructurals entre el domini C-terminal i central ⁹⁻¹⁰. El lloc d'unió dels lligands de TLR4 es troben entre el domini N-terminal i central¹⁰. Per raigs X es va veure que el TLR3 pertany al grup de TLR amb un sol domini, ja que el domini LRR és uniforme amb angles de fulla β i una xarxa d'asparagina¹¹⁻¹². Tot i que encara no s'ha confirmat, sembla per anàlisi de seqüències, que els TLR5, 7, 8 i 9 presenten també una xarxa d'asparagines continues i per tant també pertanyen a la subfamília de TLRs amb un domini LRR ^{8, 13}. Així, els TLRs amb tres dominis interactuen amb molècules que contenen lípids com LPS i

lipoproteïnes. En canvi, els TLRs amb un domini interactuen amb lligands hidrofílics, com els àcids nucleics, via residus exposats a la superfície.

El domini intracel·lular està format per un domini TIR. Fins a la data, s'han descrit 5 dominis TIR en molècules de mamífers: TLR1, TLR2, TLR10, MyD88 i IL-1rap. L'estructura de tots ells presenta una cadena de 5 fulles β envoltada per 5 fulles α en tres capes. En l'actualitat, es coneix l'estructura dels dominis TIR, però no l'estructura multimèrica que formen els dominis TIR dels TLR amb les molècules adaptadores. Els dominis TIR presenten dues regions en forma de bucle (BB i DD). Per estudis teòrics i de mutagènesis s'ha observat que aquests dos bucles són importants per la senyalització dels TLR, tot i que es desconeix la funció exacte que duen a terme ¹⁴⁻¹⁸.

2.2.1.2. Localització i lligans de TLRs

Fins a l'actualitat, s'han descrit 10 subtipus de TLRs en humans. Degut a les diferències que presenten en els dominis extracel·lulars, cada un d'ells té la capacitat de reconèixer de forma específica diferents lligands. Alguns TLRs es poden localitzar a la membrana extracel·lular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10) o altres es localitzen intracel·lularment a la membrana dels endosomes (TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9) ¹⁹. Els TLRs localitzats extracel·lularment tenen com a lligands principals, però no exclusius, a components bacterians. Els TLRs intracel·lulars tenen com a lligands principals a àcids nucleics, requerint així una internalització prèvia dels lligands als endosomes ²⁰.

En la taula 1 es mostren els principals lligands per cada TLR associats a PAMPs.

Taula 1. Principals lligands de TLR associats a PAMPs

TLR	Lligands
TLR1	triacil lipopèptids
TLR2	àcid lipoteicoic (LTA), lipoproteïnes, lipopèptids, zymosan
TLR3	dsRNA viral
TLR4	lipopolisacàrid (LPS)
TLR5	flagelina
TLR6	diacil lipopèptids
TLR7	ssRNA viral
TLR8	ssRNA viral
TLR9	CpG DNA
TLR10	no conegut

2.2.1.3. Senyalització dels TLRs

El reconeixement dels lligands pels TLRs produeix una dimerització d'aquests receptors. La majoria dels TLRs formen homodímers entre ells, tot i que hi ha TLRs com el TLR2 i el TLR4 que poden formar heterodímers amb altres TLRs ²¹⁻²³. La dimerització dels TLRs desencadena l'activació de les vies de senyalització a partir dels dominis TIR intracel·lulars. Aquests reclutaran diferents adaptadors amb dominis TIR. L'especificitat dels senyals dels TLRs dependrà de la molècula adaptadora que s'unirà als dominis TIR.

En la següent figura es mostra les diferents molècules adaptadores que presenten els TLRs i les seves principals vies de senyalització.

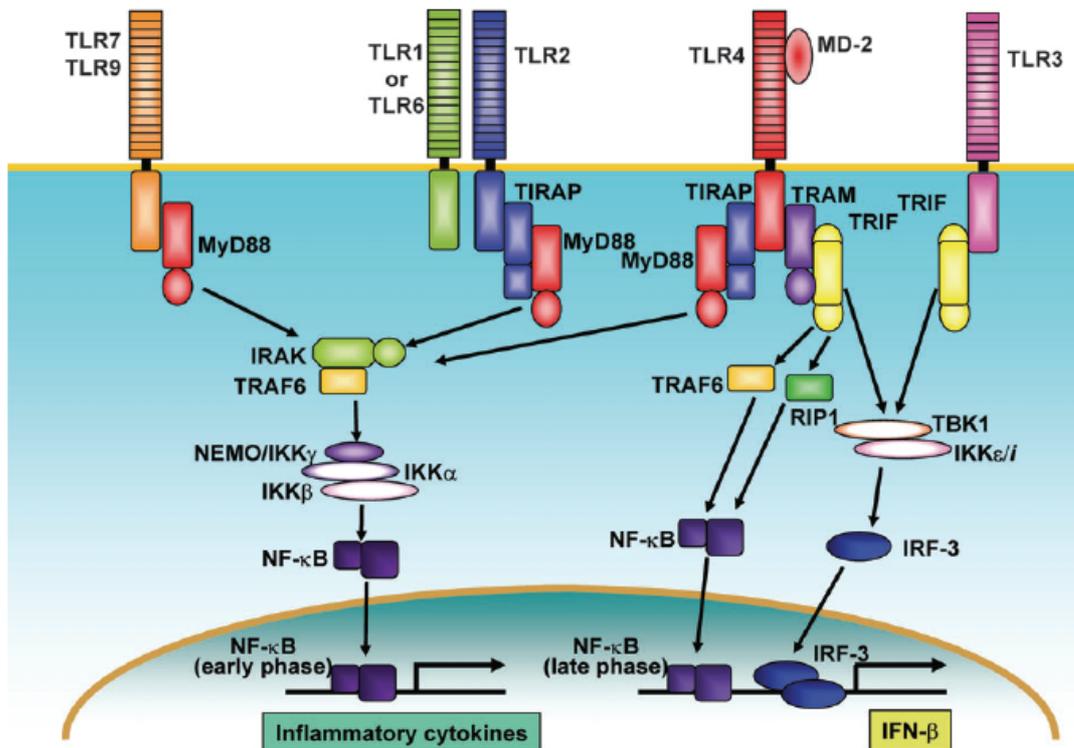


Figura 1. Adaptadors i vies implicades en la senyalització dels TLRs. L'activació dels TLRs comporta la unió de diferents adaptadors TIR a la cua citoplasmàtica dels TLRs que permeten l'activació de factors de transcripció per induir l'expressió gènica de citoquines entre altres gens ⁴.

Es coneixen diferents proteïnes adaptadores:

1. *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) → Va ser la primera molècula adaptadora dels TLR descrita. És una proteïna de 33 kDa amb dos dominis de senyalització: el N-terminal amb dominis TIR que permetrà la unió amb els TLRs, i el C-terminal amb dominis de mort, que permetrà la interacció amb altres molècules que continguin dominis de mort ²⁴⁻²⁵.

2. *MyD88 adaptor-like* (Mal)→ També conegut com a TIRAP. Aquesta molècula adaptadora és essencial per la senyalització del TLR2 i TLR4 ²⁶, ja que actua com a pont per la unió de MyD88 al dímer de TLR4 i TLR2 activat en la membrana plasmàtica ²⁷. Mal està format per dos dominis: N-terminal que conté dominis PIP2 requerits per l'anclatge a membrana ²⁸, i C-terminal, que és on conté els dominis TIR importants per la unió amb els TLRs i el MyD88 ²⁹.
3. *TIR-related adaptor protein inducing interferon* (TRIF)→ Aquesta molècula adaptadora és reclutada pels TLR3 i TLR4 activats, i és imprescindible per la formació d'interferons de tipus I ³⁰.
4. *Trif-related adaptor molecule* (TRAM)→ Aquesta molècula actua exclusivament a la via de senyalització TLR4, com adaptadora perquè el TRIF s'uneixi ³¹.

Hi ha dos tipus de vies de senyalització dels TLRs:

1. MyD88 dependent→ Després de l'activació, el MyD88 recluta *Interleukin-1 receptor-associated kinases-4* (IRAK-4) pels dominis mort de les dues molècules, i facilita la fosforilació de IRAK-1. La IRAK-1 fosforilada i activada s'associa amb la molècula *Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6), que activarà a la MAP3K *transforming growth factor-β-activated protein kinase 1* (TAK-1). La TAK-1 activada millora l'activitat del complex IκB quinasas (IKK), que induirà la fosforilació i la posterior degradació del IκB, deixant lliure i activant el factor de transcripció NF-κB, que es translocarà cap al nucli, on induirà la transcripció i expressió de citoquines inflamatòries. Aquesta via de senyalització és utilitzada pels TLR2, 4, 5, 7, 8, 9 i 10, tot i que el TLR2 i TLR4 necessiten la molècula adaptadora Mal ^{4,32}.

2. MyD88 independent → Aquesta via de senyalització és utilitzada pel TLR3 i TLR4 per induir interferons (IFN) de tipus I. És independent de la molècula MyD88 i utilitza la molècula adaptadora TRIF. Aquesta molècula unida als dominis TIR dels TLR activats és capaç d'activar el factor de transcripció NF- κ B de dues formes: TRIF pel domini C-terminal interacciona amb Rip i aquest amb RIP1. TRIF pel domini N-terminal pot unir-se a TRAF6. Tant el complex TRIF-RIP1 com el TRIF-TRAF6 convergeixen en el complex IKK per induir la màxima activació de NF- κ B. A més, el TRIF unit al TLR3 i TLR4 activats també pot activar els factors de regulació d'interferó 3 i 7 (IRFs). El domini N-terminal de TRIF s'associa amb IKKi/IKK ϵ i TANK-binding kinase 1 (TBK1), per fosforilar IRF3 i IRF7, i aquests es translocaran cap al nucli, on regulen l'expressió gènica^{4,32}.

2.2.1.4. Funcions dels TLRs durant la inflamació

El TLRs són proteïnes que s'expressen en diferents teixits i components cel·lulars de forma dinàmica durant els processos inflamatoris. Hi ha una ràpida modulació dels nivells dels mRNAs i proteïnes dels TLRs quan les cèl·lules es troben exposades a ambients estressants rics en espècies reactives d'oxigen, patògens com virus i bacteris i mediadors generats durant la inflamació, com citoquines proinflamàtores³³⁻³⁷.

Els TLRs són considerats com els inductors de la immunitat, ja que contínuament exploren l'ambient extracel·lular, informant a la cèl·lula d'infeccions i senyals de dany cel·lular. Així, faciliten la resposta cel·lular que culminarà en noves transcripcions gèniques per tal d'induir una resposta inflamatòria correcta per fer front a aquests agents patogènics.

2. INTRODUCCIÓ

Els macròfags i els monòcits són cèl·lules que expressen una gran varietat de TLRs, que els hi permet respondre a un ampli ventall de lligands de TLRs³⁸⁻⁴⁰. Amb l'activació d'aquests TLRs, s'estimularan una gran varietat de gens responsables de la producció i secreció de citocines inflamatòries com el TNF α , IL-1 β , IL-6 i IL-8, quimiocines com el CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8 i CXCL2/3, i factors de creixement que tindran una resposta autocrina i paracrina inflamatòria potent⁴¹⁻⁴⁴.

Tots aquests factors generats durant el primer reconeixement per part dels TLRs induiran una resposta inflamatòria aguda. Això permet, primer de tot, el reclutament i infiltració de neutròfils al lloc d'infecció. L'activació dels TLRs en els neutròfils serà clau per augmentar la degranulació cel·lular, l'adhesió i activitat anti-microbiana⁴⁵⁻⁴⁶. Més tard, entraran monòcits, limfòcits T i cèl·lules *Natural killer* (NKs) que contribuiran a la generació de la resposta inflamatòria i a la resolució del problema que ha causat la infecció.

Encara que els TLRs són típics de les cèl·lules del sistema immune, les cèl·lules epitelials de teixits com la pell⁴⁷⁻⁴⁸, aparell respiratori^{42, 49-50} i l'intestí⁵¹ també poden respondre a estímuls inflamatoris via TLRs, intervenint en la protecció contra els patògens. Si els patògens aconsegueixen passar aquesta primera barrera epitelial, les cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises també poden detectar patògens via TLRs⁵²⁻⁵⁴. Tot això fa que el paper dels TLRs en els teixits sigui altament complex. Perquè es doni una adequada resposta inflamatòria, cal una interacció directa o indirecta entre leucòcits i cèl·lules residents dels teixits, que permeti l'alliberació de quimiocines i citocines⁵².

Els TLRs també juguen un paper clau com a pont entre la immunitat innata i adaptativa. Aquests actuen modulant i/o induint la diferenciació de les cèl·lules T⁵⁵⁻⁵⁷ i activant les cèl·lules dendrítiques. Quan les cèl·lules dendrítiques reconeixen patògens, s'activa la

via de senyalització dels TLRs, diferenciant-se i augmentant l'expressió de les molècules del complex major d'histocompatibilitat tipus II (CMH-II), CD40, CD80 i CD86, que milloraran la capacitat de presentar antígens i activar cèl·lules T⁵⁸. Durant el reconeixement de patògens via TLRs també s'indueix la producció d'IFNs de tipus I, sent part de la primera línia de defensa que modula la immunitat adaptativa⁵⁹⁻⁶¹. Tot i que l'expressió de IFNs està associada a la presència i reconeixement de virus, també participa en el desenvolupament de la resposta adaptativa, induint la proliferació de cèl·lules T de memòria, el canvi d'isotip d'anticossos de cèl·lules B i la diferenciació a cèl·lules plasmàtiques. A més a més, els IFNs poden inhibir l'apoptosi de cèl·lules T i induir i activar les cèl·lules NKs⁶².

Una massiva producció de citoquines proinflamatòries produeix una activació cel·lular que comporta afectació tissular i finalment cronicitat, tal com s'ha observat en diferents malalties inflamatòries, com asma, malalties inflamatòries intestinals i artritis reumatoide entre d'altres⁶³. Tant en la desmesurada resposta inflamatòria com en la cronicitat, intervenen els TLRs, i en molts casos, aquests dos fenòmens són conseqüència d'una resposta excessiva via TLRs.

2.2.2. RECEPTORS *SCAVENGER*

Els receptors *scavenger* comprenen una gran família de glicoproteïnes de transmembrana que es troben expressats en monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules endotelials i altres tipus cel·lulars⁶⁴. Els receptors *scavenger* van ser descrits inicialment com a receptors capaços de reconèixer i captar lipoproteïnes modificades⁶⁵. Avui en dia es sap que són receptors amb múltiples lligands i que juguen un paper important en la immunitat innata durant la defensa de l'organisme enfront de patògens,

donat que actuen com a PRRs ⁶⁶, reconeixent PAMPs de bacteris gram negatius (LPS), bacteris gram positius (àcid lipoteicoic), DNA CpG bacterià, i lligands de fongs ⁶⁶⁻⁶⁷. La seva funció principal descrita és actuar com a receptors fagocítics no depenent d'opsonització de patògens. A més a més, poden captar lipoproteïnes modificades i intervenir en el procés final de la inflamació reconeixent cèl·lules apoptòtiques per ser fagocitades. Alguns receptors *scavenger* també poden actuar com a molècules coreceptors dels TLRs, en concret del TLR2, en la resposta inflamatòria per produir citokines ⁶⁸⁻⁶⁹.

2.2.2.1. Classes de receptors *scavenger*

Els receptors *scavenger* es divideixen en diferents classes depenent de la seva estructura (Figura 2):

1. Classe A → Va ser la primera classe de receptor *scavenger* descrita i caracteritzada. Són glicoproteïnes de transmembrana tipus II trimèriques amb diferents dominis: domini N-terminal intracel·lular, format per una cua citoplasmàtica, domini transmembrana, domini espaiador format per una espiral α -helicoidal, dominis col·lagen i un domini C-terminal ric en cisteïnes ⁶⁴. Hi ha diferents receptors *scavenger* dins d'aquest grup amb petites modificacions. Es troben expressats en macròfags, tot i que també s'han detectat en cèl·lules endotelials i teixit muscular llis. Els membres d'aquest grup tenen diferents lligands, com LDL oxidat (oxLDL), LDL acetilat, àcids polinucleics, proteïnes β -amiloid i components bacterians ⁷⁰⁻⁷².
2. Classe B → El primer receptor *scavenger* de classe B descrit va ser el CD36. Són glicoproteïnes de transmembrana tipus III que presenten dos dominis

transmembrana, un bucle extracel·lular amb múltiples glicosilacions i dues cues curtes intracel·lulars ⁶⁴. Els diferents membres del grup es troben expressats en monòcits, macròfags, plaquetes, endotelis, adipòcits, múscul llis i certs epitelis ⁷³. Aquests receptors reconeixen diferents lligands com col·lagen, àcids grassos, fosfolípids aniònics, trombospondina, cèl·lules apoptòtiques, LDL nativa, oxLDL, HDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat i bacteris gram positius ⁷⁴⁻⁷⁸.

3. Classe C → Aquest receptor *scavenger* es troba en *Drosophila melanogaster*. És una proteïna de membrana de tipus I, formada per 9 dominis: extracel·lular N-terminal, dos dominis de proteïnes control complementaries, un domini MAM, regió espaciadora, un domini B-like somatomedina, un domini ric en serina i treonina mucina-like i un altre domini espaciador ⁶⁴. Aquest receptor *scavenger* s'expressa en macròfags i hemòcits i té com a lligands LDL acetilats i bacteris probablement pels dominis complementaris ⁷⁹⁻⁸⁰.
4. Classe D → Els membres d'aquest grup (CD68 i LAMPs) són glicoproteïnes de membrana tipus I que estan associats als endosomes i lisosomes. El domini N-terminal extracel·lular és un domini mucina-like amb serines i treonines, és altament N-O-glicosilat durant la secreció i es connecta a un domini LAMP conservat a través d'un pont ric en prolines. Aquests receptors *scavenger* presenten una cua curta citoplasmàtica C-terminal que conté motius tirosina ⁶⁴. Es troben localitzats majoritàriament als endosomes. El CD68 s'expressa en macròfags, cèl·lules de Langerhans, cèl·lules dendrítiques i osteoclasts ⁸¹, mentre que els LAMPs estan extensament expressats en la majoria de tipus cel·lulars. Tot i que el CD68 es va postular originalment que era el major receptor de oxLDL ⁸², la seva funció segueix desconeguda.

5. Classe E → És una glicoproteïna de membrana tipus II amb una curta cua citoplasmàtica N-terminal, un domini transmembrana, un domini pont i un domini lectina de tipus CC-proximal ⁶⁴. Aquest receptor *scavenger* és troba expressat en cèl·lules endotelials, macròfags, cèl·lules musculars llises i plaquetes ⁸³. Presenta diferents lligands com oxLDL, HDL modificada per hipoclorit, cèl·lules apoptòtiques, i bacteris ⁸⁴⁻⁸⁹.
6. Classe F → És una proteïna formada per un llarg domini extracel·lular N-terminal que conté 10 repeticions riques en cisteïnes, 5 de les quals formen un domini similar a *Epidermal growth factor* (EGF). Està expressat en cèl·lules endotelials ⁶⁴. Té com a lligands oxLDL, LDL acetilat, àcid polinosínic, i proteïnes de la superfície bacteriana ⁹⁰⁻⁹⁴.
7. Classe G → És una proteïna de membrana tipus I que presenta un domini extracel·lular amb regió de quimiocines contigua a una regió mucina glicosilada ⁹⁵. Està expressat en endotelis, múscul llis i macròfags ⁶⁴. Aquest receptor *scavenger* es pot unir a fosfatidilserina, oxLDL i bacteris ⁹⁵⁻⁹⁷.

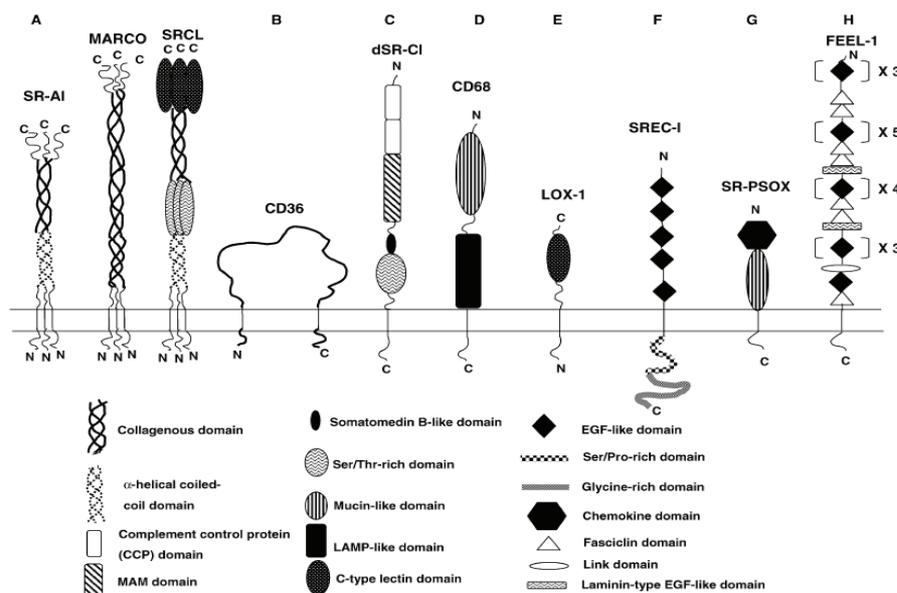


Figura 2. Esquema de les diferents classes de receptors *scavenger* en eucariotes ⁶⁴.

2.2.2.2 Receptor *scavenger* CD36

En un primer moment, el receptor *scavenger* CD36 va ser descrit com glicoproteïna IV, per ser la quarta banda major observada en un gel d'electroforesi SDS-poliacrilamida de membranes de les plaquetes⁹⁸. Més tard, es va observar que era l'antigen que reconeixia l'anticòs monoclonal OKM5, un marcador de monòcits i macròfags⁹⁹. El CD36 està involucrat en diferents processos fisiològics com angiogènesi, inflamació, metabolisme lipídic i de sucres i en la immunitat. Aquest receptor es troba expressat en diversos tipus cel·lulars, com endoteli microvascular, cèl·lules del múscul llis, monòcits, macròfags, microglia, precursors d'eritròcits, hepatòcits, adipòcits i plaquetes⁷³.

Aquest receptor *scavenger* presenta diferents lligands, com col·lagen, àcids grassos, fosfolípids aniònics, trombospondina, cèl·lules apoptòtiques, LDL nativa, oxLDL, HDL, lipoproteïnes de molt baixa densitat i bacteris gram positius⁷⁴⁻⁷⁸.

2.2.2.3. Estructura i senyalització del CD36

El CD36 és una glicoproteïna transmembrana tipus III de 88 kDa que pertany a la classe B dels receptors *scavenger*. Aquesta proteïna està formada per tres dominis¹⁰⁰:

1. Domini extracel·lular, format per un bucle extracel·lular amb múltiples N-glicosilacions que li permeten protegir-se de la degradació en ambients rics en proteïnases, com els lisosomes i àrees d'inflamació o teixits danyats⁷³. Presenta 6 cisteïnes conservades unides per ponts disulfur per donar estabilitat al bucle¹⁰¹. A més, conté un domini hidrofòbic que interacciona amb la membrana plasmàtica, una regió rica en prolines i diversos dominis funcionals que permeten la unió als múltiples lligands.

2. Dos dominis transmembrana, que flanquegen el domini extracel·lular
3. Un domini intracel·lular, format per dues cues citoplasmàtiques N-terminal i C-terminal que contenen un parell de residus cisteïnes que són lípids acetilats (palmitolació), que li permeten la unió amb la membrana plasmàtica interior ¹⁰². El domini C-terminal conté una tirosina i una cisteïna que és important per la senyal intracel·lular.

En la figura 3 es mostra l'estructura del CD36 i els llocs d'unió als diferents lligands.

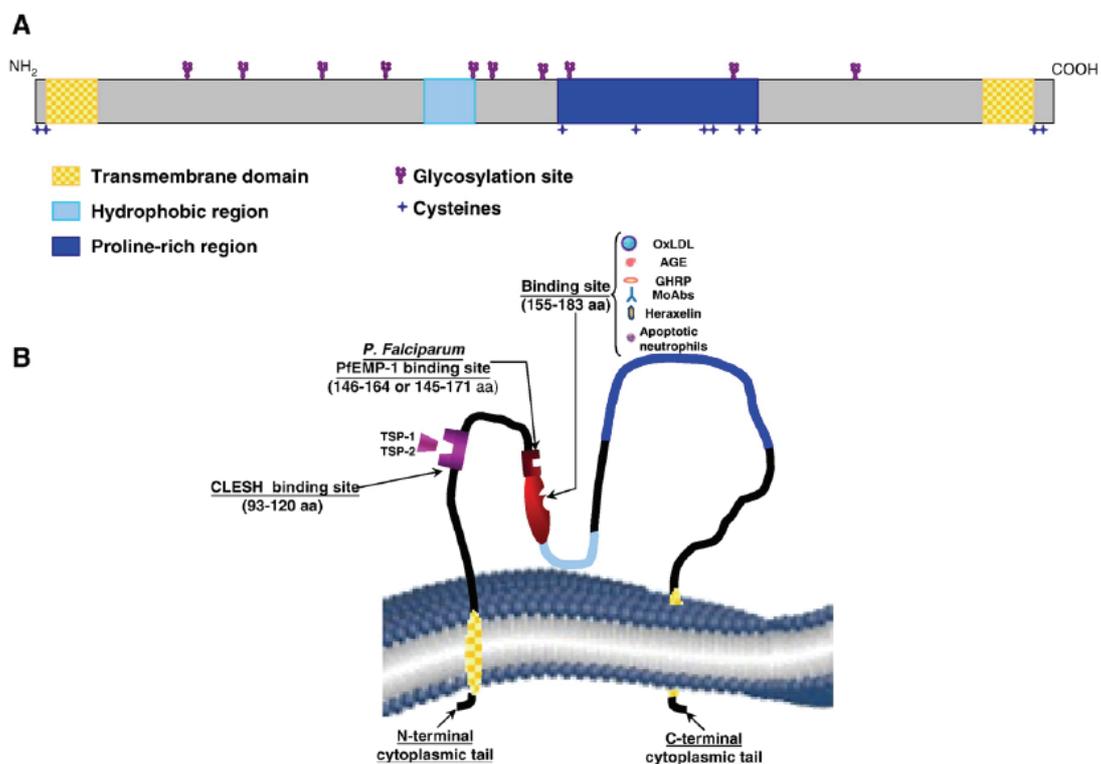


Figura 3. Representació esquemàtica de la proteïna CD36. (A) Estructura primària del CD36. (B) Representació del CD36 en la membrana cel·lular i dels seus principals lligands ¹⁰³.

El domini extracel·lular reconeix els lligands per diferents llocs d'unió. Un cop unit el CD36 als diferents lligands, la transducció de senyals és donada per activació de quinases de la família Src i per les MAPKs¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, induint l'expressió de diferents gens i funcions dependent dels tipus cel·lulars en el que el lligand de CD36 s'hagi unit.

2.2.2.4. Funcions del CD36 durant la inflamació

Durant la inflamació, el receptor *scavenger* CD36 presenta un doble paper. Alguns autors han demostrat que intervé en els processos inicials d'inducció d'inflamació, mentre que d'altres demostren que intervé en processos finals de la inflamació com a molècula antiinflamatòria. L'expressió del CD36 es modula per diferents citoquines, tant inflamatòries com antiinflamatòries. En presència de M-CSF, GM-CSF, IL-4, IL-13 i agonistes del factor PPAR γ (molècula antiinflamatòria), s'augmenta l'expressió del CD36 en monòcits i macròfags¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Per altra banda, en presència de TNF α i IFN γ , es redueix la seva expressió¹¹⁰⁻¹¹¹. Aquestes observacions suggereixen que el CD36 actuarà en processos inicials de la inflamació, després la seva expressió disminueix, i en els processos finals es torna a recuperar.

Com a molècula proinflamatòria, el CD36 intervé en diferents processos. El CD36 és un receptor que actua com a PRR, reconeixent bacteris gram positius com *Staphylococcus aureus* i paràsits com *Plasmodium falciparum*. En resposta al reconeixement d'aquests patògens via CD36, els monòcits secretaran mediadors com TNF α , IL-6 i IL-8 que induiran un procés inflamatori correcte per fer front a aquestes infeccions^{105, 112-114}. La importància d'aquest receptor per fer front a les infeccions s'ha demostrat en ratolins *knock-out* per CD36. Una manca d'expressió d'aquest receptor en els macròfags produeix una disminució de citoquines inflamatòries que porta a un augment i severitat

de les infeccions ^{68, 105} i paràsits ¹¹³. El CD36 no només és important com a PRR en resposta directa als lligands de patògens, actuant com a coreceptor de TLR2, també col·labora en el reconeixement de patògens per poder generar una resposta inflamatòria eficient ^{68, 105, 115}.

El CD36 també juga un paper important en la resposta inflamatòria estèril que és dona a l'aterosclerosi. En les plaques d'aterosclerosi, es troba oxLDL, lligand de CD36 en els macròfags. A través de la unió al CD36, s'induirà la formació de cèl·lules espumoses ^{104, 116-118} i la secreció de citoquines proinflamatòries (TNF α , IL-6, IFN γ i IL-1 β), ja que es produeix una activació del NF-kB via PKC ¹¹⁹⁻¹²⁰. A més, el CD36 contribueix al procés inflamatori, induint la secreció d'espècies reactives d'oxigen ¹²¹⁻¹²². Això explica perquè la disrupció de l'expressió del CD36 en ratolins comporta una millora en la inflamació i en el procés d'aterosclerosi ⁷³.

El CD36 també intervé en la inflamació estèril durant la isquèmia cerebral. Aquest receptor *scavenger* contribueix a la generació de radicals lliures i en la producció de citoquines inflamatòries que produeixen dany en el teixit ¹²¹. Aquests efectes es veuen disminuïts en ratolins *knock-out* de CD36 degut a una disminució de la producció de citoquines proinflamatòries durant la isquèmia, i a una reducció de l'activació de NF-kB ¹²³⁻¹²⁴.

Un altre paper del CD36 durant la inflamació és en la patologia de l'Alzheimer. Aquí, les cèl·lules de la micròglia reconeixen a través d'aquest receptor el pèptid β -amiloide, aquest és internalitzat i es genera una resposta proinflamatòria que contribueix a la inflamació i patogènesis d'aquests pacients ^{23, 125-127}.

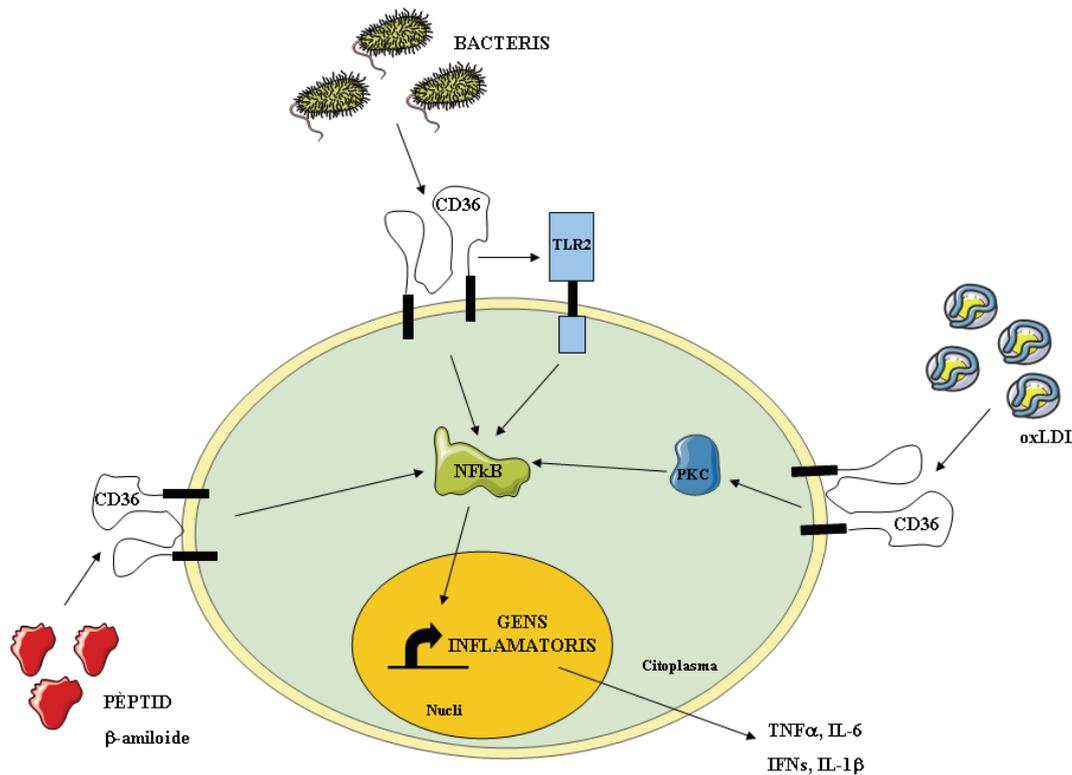


Figura 4. Paper del CD36 com a molècula proinflamatòria. Després del reconeixement de bacteris, pèptid β -amiloide i oxLDL pel CD36, s'actua el NF- κ B que induirà gens inflamatoris.

Com a molècula antiinflamatòria, el CD36 presenta diferents mecanismes. Un d'ells és intervenir en els processos finals de la inflamació, netejant els teixits de cèl·lules apoptòtiques i eliminant els teixits danyats de citocines inflamatòries, per tal de tornar-los a l'homeòstasi. Des de fa anys, està descrit que els monòcits i macròfags a través del CD36 són capaços de reconèixer la fosfatidilserina i Trombospondina-1 (TSP-1) expressades en cèl·lules apoptòtiques¹²⁸⁻¹²⁹. Després del reconeixement de les cèl·lules apoptòtiques pel CD36 en els macròfags, s'indueix l'expressió d' IL-10 i TGF- β i s'inhibeix la secreció de TNF α , IL-12, IL-1 β i IL-8. Tots aquests efectes es veuen revertits amb anticossos monoclonals que bloquegen CD36¹³⁰⁻¹³¹. Recentment, Chung i

els seus col·laboradors han demostrat que després de la unió de cèl·lules apoptòtiques pel CD36 dels macròfags s'activa P38 MAPK i consecutivament diferents factors de transcripció com PBX1 i Prep1, que induiran l'expressió de la citoquina IL-10¹³². El CD36 també pot actuar com a molècula endògena antiangiogènica. Després de la unió del TSP-1 al CD36 en les cèl·lules endotelials, s'activa fyn i P38 MAPK, que induiran l'apoptosi i inhibiran la migració i proliferació induïdes per factors de creixement proangiogènics¹³³⁻¹³⁴. Afavorir aquesta unió TSP-1-CD36 és important per inhibir el creixement de tumors i la inflamació que depengui de neovascularització.

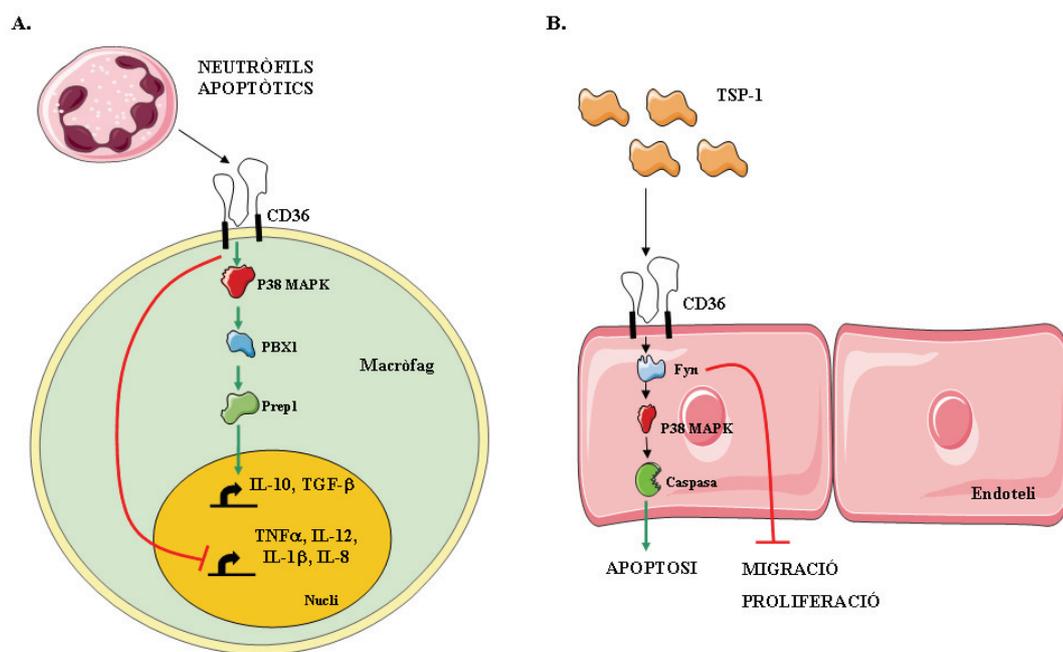


Figura 5. Paper del CD36 com a molècula antiinflamatòria. (A) Efecte de la unió de neutròfils apoptòtics al CD36 dels macròfags en la producció de citoquines inflammatòries i antiinflamatòries. (B) Efecte antiangiogènica de la unió de TSP-1 al CD36 de les cèl·lules endotelials.

2.3. ELS RECEPTORS ALS COMPONENTS CEL·LULARS DE LA INFLAMACIÓ

2.3.1. MONÒCITS

Els monòcits són cèl·lules del sistema immunològic innat. Aquestes cèl·lules fagocítiques són generades a la medul·la òssia a partir d'un progenitor mioide (CD34+) i posteriorment són alliberades al torrent sanguini ¹³⁵.

Constitueixen entre un 5-10 % dels leucòcits humans circulants. La morfologia dels monòcits madurs és diversa, tenen un diàmetre de 10-15 µm i estan formats per un nucli i un citoplasma granular que conté diferents components (lisosomes, vacuòles fagocítiques i filaments esquelètics). En condicions fisiològiques, al cap de 72h migren a la mucosa, on maduraran a macròfags. Després de setmanes en el teixit, els macròfags entren en apoptosi i són reemplaçats per nous monòcits reclutats de la sang ¹³⁶. Els monòcits són multifuncionals, presentant un paper important durant processos inflamatoris, intervenint en l'homeòstasi, defensa contra patògens i reparació tissular.

Els monòcits presenten diferents receptors a la superfície que intervenen en els processos inflamatoris. Aquests receptors els hi permet reconèixer senyals de perill per l'organisme i faran que els monòcits s'activin. Entre els receptors que tenen destaquen:

1. Els receptors TLRs → Els monòcits expressen una gran varietat de TLRs, tant intracel·lulars com extracel·lulars ²⁰. Aquestes cèl·lules són els majors responedors a lligands de TLRs, on a través d'aquests receptors testen els ambients i responen enfront de diferents senyals de perill per l'organisme, com els PAMPs i DAMPs. Un cop el monòcit és activat per senyals TLR, aquest secretarà diferents citocines inflamatòries com el TNF α , IL-1 β , IL-8, IL-6 i

altres factors com les quimiocines, que intervindran en la resposta inflammatòria⁴¹⁻
⁴⁴. L'estímul dels monòcits per senyals TLR no només indueix l'expressió de citoquines inflammatòries, sinó que també indueix l'expressió de citoquines antiinflammatòries com la IL-10¹³⁷. Altres molècules que es veuen augmentades després que els monòcits s'estimulin amb TLR són CD80, CD86 i el CMH-II, millorant així la capacitat de presentar antígens i coestimular a cèl·lules del sistema immune adaptatiu^{1, 138-139}. Durant l'estimulació dels monòcits amb senyals de TLR, es veu també un augment del receptor *scavenger* CD163, que facilitarà el reconeixement antigènic, la presentació d'antígens i la resposta adaptativa contra les infeccions¹⁴⁰. Encara es desconeix com els lligands de TLR afecten altres receptor *scavenger* com el CD36 i les conseqüències funcionals que comportarien aquests canvis a un monòcit.

2. Els receptors d'opsonina → Afavoreixen la fagocitosi dels microorganismes. Els microorganismes es recobreixen d'anticossos i components del sistema del complement que produiran senyals per iniciar la fagocitosi.
3. Els receptors *scavenger* → Els monòcits expressen una gran varietat de receptors *scavenger*, importants per la seva funció. Molts d'aquests receptors *scavenger*, com el MARCO, estan expressats als monòcits per tal de captar lípids oxidats entre d'altres, eliminant-los de l'organisme. L'expressió d'altres receptors *scavenger* com el CD36 és important en els monòcits. A través d'aquest, s'iniciaran molts processos inflamatoris i antiinflamatoris, importants durant els moments inicials i finals de la inflamació. A través de la unió del CD36 a patògens i a lípids oxidats que es troben augmentats durant diferents processos patològics com l'aterosclerosi, s'indueix l'expressió de diferents citoquines inflammatòries com el TNF α , IL-1 β , IL-8 i IL-6^{105, 112-114, 119-120} als monòcits. A

més, els monòcits que entren en els teixits durant els processos inflamatoris juntament amb els macròfags residents en els teixits, a través del CD36 i d'altres receptors, fagocitaran cèl·lules apoptòtiques, induint-se l'expressió d'IL-10 que és important pels processos finals de la inflamació i la restauració de l'homeòstasi ¹³⁰⁻¹³².

4. El receptor de manosa → És una lectina que s'uneix a la manosa i a la fucosa de les glucoproteïnes i glucolípidos que formen part de la paret cel·lular dels microorganismes.

Des de fa més de 20 anys s'ha vist que els monòcits de sang perifèrica no són una població homogènia. Hi ha diferents subpoblacions que difereixen en el seu fenotip i funció. Recentment la Comissió de la Unió Internacional de Societats d'Immunologia, va subdividir els monòcits en tres subpoblacions segons la intensitat d'expressió de receptor de LPS, CD14, i el receptor FCγIII, CD16 ¹⁴¹:

1. Els monòcits clàssics, definits pel fenotip CD14⁺⁺ CD16⁻, són aproximadament el 85% dels monòcits totals.
2. Monòcits intermedis, CD14⁺⁺ CD16⁺, són aproximadament un 5%.
3. Monòcits no-clàssics, CD14^{dim} CD16⁺, són aproximadament un 10%.

Totes tres subpoblacions de monòcits tenen la capacitat de secretar citokines proinflamàtories, com el TNFα, després de l'estimulació amb lligands de TLRs, tot i que els monòcits no clàssics CD14^{dim} CD16⁺ són els que tenen la capacitat de produir aquesta citocina en nivells més elevats en resposta a lligands de TLR7/8 ¹⁴²⁻¹⁴³. Recentment s'ha descrit que la subpoblació de monòcits intermedis tractats amb LPS és la major productora de TNFα, IL-1β i IL-6 ¹⁴⁴.

Els monòcits no clàssics CD14^{dim} CD16⁺ presenten nivells de producció d'IL-10 molt baixos o nuls, a diferència de la població de monòcits clàssics, que són els majors productors^{143, 145-146}. A més, recentment s'ha descrit que la subpoblació de monòcits no clàssics presenten diferent expressió de receptors *scavenger* com el CD36 i CD163, de receptors de quimiocines i d'altres receptors¹⁴⁵.

Així, aquestes 3 subpoblacions produeixen respostes diferents davant els antígens durant processos inflamatoris. Els resultats suggereixen que els monòcits juguen un doble paper durant la inflamació, sent els clàssics els que produeixen predominantment citokines antiinflamatòries mentre que els intermedis i no clàssics produeixen citokines inflamatòries.

2.3.2. LIMFÒCITS

Els limfòcits són cèl·lules del sistema immune adaptatiu i representen aproximadament el 30 % de les cèl·lules de sang perifèrica. Aquestes cèl·lules tenen un gran nucli esfèric i un citoplasma petit i van circulant per la sang, els teixits i els ganglis limfàtics. Un cop activats, són reclutats per desenvolupar les seves funcions efectores cap a les zones on s'està generant una resposta inflamatòria.

Hi ha diferents tipus de limfòcits:

1. Limfòcits T → Cèl·lules generades en el timus que reconeixen els antígens proteics a través de molècules majors d'histocompatibilitat
2. Limfòcits B → Cèl·lules generades en el moll de l'os, que s'encarreguen de la resposta humoral de l'organisme
3. Cèl·lules NKs → Són limfòcits grans granulars que participen en la resposta immune innata, presentant característiques citolítiques.

S'han descrit dos tipus de limfòcits T segons les cadenes polimòrfiques que formen el receptor de cèl·lules T (TCR, de l'anglès *T Cell Receptor*): limfòcits $\alpha\beta$ (90-95 % dels limfòcits perifèrics) i limfòcits $\gamma\delta$ (5-10 % dels limfòcits perifèrics). Els TCRs $\alpha\beta$ s'associen amb el CD3, molècula formada per dos heterodímers $CD3\gamma\epsilon$ y $CD3\delta\epsilon$ i per l'homodímer $\zeta\zeta$, que conté dominis ITAM per la transducció de senyals ¹⁴⁷⁻¹⁴⁸. Els limfòcits T $\gamma\delta$ són cèl·lules efectores que es troben enriquides en les membranes de les mucoses, reconeixent antígens no peptídics i reaccionant contra senyals generades per estrès cel·lular ¹⁴⁹.

Els limfòcits T $\alpha\beta$ es subdivideixen en cèl·lules T col·laboradores (Th, del anglès *T helper*) i cèl·lules T citotòxiques (Tc). Els limfòcits Th es caracteritzen per l'expressió de la molècula CD4, i el seu TCR reconeix el CMH-II de les cèl·lules presentadores d'antígens carregades amb l'antigen. Un cop reconeixen l'antigen, aquests limfòcits T CD4⁺ pateixen una expansió clonal en els òrgans limfoides. Són cèl·lules que no tenen activitat citotòxica i que tenen funció de coordinació i modulació del sistema immune mitjançant la producció de diferents citoquines. Dins d'aquests limfòcits T CD4⁺ es diferencien subpoblacions depenent les citoquines secretades: Th1, que produeixen IFN γ i TNF α , que induiran citotoxicitat del sistema immune; Th2, que produeixen IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13, promovent la immunitat humoral i resposta directa contra patògens extracel·lulars; Th17, productores d'IL-17, citoquina involucrada en processos autoimmunes i resposta contra fongs; i Treg, productores d' IL-10 i TGF- β i que són crucials pel manteniment de l'homeòstasi del sistema immune ¹⁵⁰. Els limfòcits Tc es caracteritzen per expressar la molècula CD8 en la seva superfície, i el seu TCR reconeix l'antigen presentat en CMH-I de les cèl·lules. La funció principal d'aquestes cèl·lules és citotòxica i citolítica, induint la mort cel·lular per permeabilització de les membranes

amb perforina i per inducció d'apoptosis via unió FAS-FASL o via granzima, que indueix activitat caspasa ¹⁵¹.

L'activació dels limfòcits T és dona per la unió simultània del TCR/CD3 i del CD4 o CD8 al complex CMH-antigen presents en la superfície de les cèl·lules presentadores d'antígens. Això indueix l'aproximació d'una tirosina quinasa (Ick) associada a les molècules CD4 i CD8 cap a CD3, on és fosforilen dos residus tirosina dels dominis ITAM de la cua citoplasmàtica de CD3, permetent la unió de ZAP-70 als dominis SH2. Un cop s'uneix ZAP-70, aquesta és fosforilada en dos residus tirosina iniciant la cascada de senyalització ¹⁵². ZAP-70 a través de diferents mecanismes activarà els factors de transcripció NF-AT, NF-κB i AP-1, que es translocaran cap al nucli, iniciant la corresponent transcripció gènica, que desemboca en una proliferació, diferenciació i acció de les cèl·lules efectores T ¹⁵². Els senyals d'activació iniciats pel TCR determinen l'especificitat de l'activació de les cèl·lules T, però fets iniciats per altres molècules de membrana, com els coreceptors CD4/CD8, o coestimuladores com CD2 o CD28, modulen el llindar de la senyalització intracel·lular requerida per iniciar una resposta immunològica. El model de las dos senyals per l'activació dels limfòcits T proposa que és necessària un senyal procedent del complex TCR/CD3 i un altre senyal generada per receptors coestimuladors perquè es doni un procés d'activació ¹⁵³. El CD28 és la principal molècula coestimuladora, colocalitzant-se amb el TCR a la regió de sinapsi immunològica. Els seus lligands són CD80 i CD86, i l'activació de CD28 produeix un augment de fosforilació de diferents proteïnes (IcK, Fyn, Itk) ¹⁵⁴. A més, bloqueja la sortida de NF-AT del nucli, augmentant per tant l'efecte d'aquest factor de transcripció ¹⁴⁷. El CD2 és una altra molècula coestimuladora. Després de la unió amb el lligand CD58, contribueix a l'estabilització de la interacció del limfòcit T amb les cèl·lules presentadores d'antígens ¹⁵⁵.

Recentment, s'ha observat que la funció dels limfòcits T durant la inflamació pot ser controlada directament a través de l'activació per TLRs. L'estimulació de limfòcits T CD4+ amb lligands de TLR2 indueix la proliferació, supervivència i la producció de IFN γ , IL-2, IL-10, IL-13 CXCL10, CCL5 i IL-17¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. En canvi, no s'han observat aquests canvis després de l'estimulació dels limfòcits T amb lligands de TLR4¹⁵⁶. Quan s'estimulen els limfòcits T CD4+ amb lligands de TLR3 i TLR9 s'observa un augment de la proliferació i supervivència i un augment de la secreció de CXCL10, CCL3, CCL4, CCL5, IL-17 i IL-21¹⁶⁰⁻¹⁶².

Els limfòcits expressen alguns receptors *scavenger*, com el CD5. La unió dels lligands de CD5 és important per regular la resposta dels limfòcits T. Recentment s'ha observat que el coestímul amb CD5 pot induir el desenvolupament de limfòcits Th17 per promoure l'expressió del receptor de la IL-23 i STAT3¹⁶³⁻¹⁶⁴. L'expressió d'altres receptors *scavenger* com el CD36 en els limfòcits presenta controvèrsia a la literatura. Vallejo i els seus col·laboradors van demostrar per Western blot que el CD36 no s'expressa en els limfòcits T¹⁶⁵. En canvi, altres autors mostren per citometria de flux que els limfòcits T, B i $\gamma\delta$ poden expressar aquest receptor *scavenger*¹⁶⁶⁻¹⁶⁷. La funció del CD36 en els limfòcits T i B no està aclarida, mentre que els resultats en els limfòcits $\gamma\delta$ suggereixen que intervindria com a coreceptor després d'un estímul amb lligands de TLR2 per desenvolupar la seva funcionalitat¹⁶⁷.

2.3.3. NEUTRÒFILS

Els neutròfils són cèl·lules fagocítiques del sistema immune innat que constitueixen entre un 65-75% dels leucòcits sanguinis, representant més d'un 90% dels granulòcits circulants. Els neutròfils deriven de la medul·la òssia, sent el lloc on es desenvolupen,

maduren i surten al torrent sanguini, on tindran una vida mitja de 8 a 20 hores. Aquestes cèl·lules migraran als focus d'inflamació en resposta a quimiocines generades com per exemple la IL-8, on duran a terme la fagocitosi de partícules estranyes¹⁶⁸. Morfològicament, es caracteritzen per presentar un nucli multilobular (entre 3 i 5 lòbuls) i presentar un tamany entre 10-20 µm. Aquestes cèl·lules tenen en el seu citoplasma diferents grànuls¹⁶⁹⁻¹⁷⁰:

1. Grànuls primaris, que contenen enzimes com mieloperoxidasa, muraminidasa i elastasa entre d'altres, que potenciaran la digestió i activitat microbicides dels macròfags.
2. Grànuls secundaris, que contenen lizozims, lactoferrina i colagenasa que regularan la inflamació.
3. Grànuls terciaris, caracteritzats per la presència de gelatinasa.

La funció dels neutròfils és essencial en la primera línia de defensa contra patògens, presentant efectes citotòxics. Quan els neutròfils s'activen, a més d'alliberar el contingut dels grànuls, són capaços de produir espècies reactives d'oxigen que tindran funcions microbicides¹⁷¹⁻¹⁷².

A través dels TLRs, els neutròfils reconeixen els PAMPs i DAMPs per respondre contra senyals de perill per l'organisme. Els neutròfils expressen una gran varietat de TLRs, tals com TLR2, TLR4, TLR8 i TLR9¹⁷³⁻¹⁷⁶. Un cop els neutròfils reconeixen PAMPs a través dels TLRs, s'activen diferents funcions, com la producció de citoquines, tals com la IL-6, IL-8 i TNF α , la producció d'espècies reactives d'oxigen, regulació de molècules d'adhesió i l'augment de la fagocitosi¹⁷⁷⁻¹⁷⁸. En resposta a la unió als TLRs dels DAMPs generats en les infeccions agudes i respostes inflamatòries

cròniques, els neutròfils generen espècies reactives d'oxigen, augmenten les molècules antiapoptòtiques, la producció de citoquines inflamatòries i metal·loproteïnases¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

2.3.4. PLAQUETES

Les plaquetes són cèl·lules petites de 2 µm anucleades molt abundants en sang, que deriven dels megacariòcits generats en la medul·la òssia. En el torrent sanguini d'un ésser humà adult hi ha aproximadament un bilió de plaquetes circulants, i el fet que la vida útil de les plaquetes és només 8-10 dies, cal produir 10^{11} noves plaquetes cada dia a la medul·la òssia a partir dels megacariòcits per tal de mantenir el recompte normal de les plaquetes ($150-400 \times 10^9$ plaquetes per litre de sang)¹⁸². Les plaquetes presenten un paper molt important en el manteniment de l'homeòstasi, on si hi ha un dany vascular, els receptors d'adhesió de les plaquetes reconeixen la matriu subendotelial exposada, activant la formació de trombus per prevenir la pèrdua de sang¹⁸³. A més, les plaquetes també promouen el creixement de nous vasos sanguinis en els llocs de dany, que ajudaran a preservar i mantenir la unió i integritat dels endotelis¹⁸⁴. Les plaquetes no només presenten un paper de manteniment de l'homeòstasi, sinó que presenten un paper en la immunitat i durant la inflamació.

Aquestes presenten a la seva superfície CMH-I¹⁸⁵⁻¹⁸⁶, proteïnes coestimuladores CD40 i CD40L¹⁸⁷⁻¹⁸⁸ i diversos TLRs¹⁸⁹⁻¹⁹² que tindran un paper important durant la inflamació. A més, durant l'activació en processos inflamatoris, les plaquetes expressen potents mediadors inflamatoris com IL-1¹⁹³⁻¹⁹⁴, CD40L soluble¹⁸⁸, serotonina i histamina¹⁹⁵. Les plaquetes poden unir-se als leucòcits, com monòcits i neutròfils en circulació, per facilitar la seva migració al teixit inflamat¹⁹⁶⁻¹⁹⁷. Les plaquetes poden unir-se al LPS dels bacteris gram negatius a través del TLR4 i així mostrar-les als

neutròfils, induint la seva activació¹⁹⁸. A més, després de l'estimulació de les plaquetes amb lligands de TLRs, aquestes produeixen diferents factors inflamatoris com el TNF α ¹⁸⁹.

Les plaquetes també presenten l'expressió de diferents receptors *scavenger*, com el CD36 i SR-BI. A través de la unió de fosfolípids oxidats en circulació al CD36 de les plaquetes, aquesta millorarà la seva reactivitat i presentarà un fenotip protrombòtic per la formació de col·lagen¹⁹⁹. En canvi, la unió de oxHDL al SR-BI en les plaquetes inhibeix l'activitat plaquetària²⁰⁰.

2.4. CITOQUINES QUE S'EXPRESSEN PER L'ACTIVACIÓ DELS RECEPTORS DE RESPOSTA INNATA DURANT LA INFLAMACIÓ

2.4.1. TNF α

El TNF α és un dels mediadors inflamatoris més importants que intervé en la inflamació local i sistèmica. Aquesta citoquina pertany al membre del grup de citoquines que activen la producció de proteïnes de fase aguda, tals com la proteïna C-reactiva, α -1-antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinogen i proteïna amiloide en els hepatòcits, a més de ser pirogènica. El TNF α és produït majoritàriament pels monòcits/macròfags activats, limfòcits T i NKs. En les cèl·lules diana, aquesta citoquina juga un paper en l'apoptosi, supervivència cel·lular, immunitat i inflamació²⁰¹⁻²⁰³. Inicialment, el TNF α és sintetitzat i expressat com a proteïna transmembrana, i la porció extracel·lular és alliberada en forma soluble quan és tallada per l'enzim metaloproteïnasa convertidor de TNF α ²⁰⁴. Les respostes generades que es coneixen del

TNF α es donen a través de la unió a un dels seus dos receptors, el TNFR1 o TNFR2, que presenten diferents funcions.

A través de la unió del TNF α al TNFR1, és dona l'activació de l'activitat proinflamatòria i inducció de l'apoptosi associada a dany tissular. La unió de TNF α al TNFR1 desencadena l'activació de caspases que induiran l'apoptosi i l'activació de NF-kB, i aquest induirà l'expressió de diferents gens inflamatoris. En canvi, per la unió del TNF α al TNFR2, s'activarà l'angiogènesis i la reparació de teixits ²⁰⁵.

Tot i que el receptor de TNF α està expressat en un ampli espectre de cèl·lules i teixits, molts dels efectes proinflamatoris es donen a l'endoteli vascular, modificant la interacció de leucòcits amb l'endoteli. En resposta al TNF α , les cèl·lules endotelials promouen la inflamació, presentant un patró anatòmic i espacial diferents ²⁰⁶⁻²⁰⁷. El TNF α promou que l'endoteli presenti diferents combinacions de molècules d'adhesions pels leucòcits, incloent E-selectina, P-selectina, ICAM-1 i VCAM-1 ²⁰⁸⁻²⁰⁹, que junt amb l'alliberament de quimiocines, incloent IL-8, MCP-1 i IP-10 ²¹⁰, portarà al reclutament de diferents subpoblacions de leucòcits que produiran inflamació en el teixit afectat per combatre els agents causants. El TNF α , a més, indueix l'expressió de ciclooxigenasa-2 que incrementarà la producció de vasodilatadors ²¹¹, causant rubor i calor a través de l'augment del flux a la zona afectada. El TNF α afecta la permeabilitat vascular de l'endoteli, incrementant el pas de fluids i macromolècules que crearan l'edema observat durant processos inflamatoris ²⁰⁵. El TNF α és capaç de disminuir l'expressió del CD36 en la superfície dels monòcits i els nivells de mRNA. Aquesta disminució del CD36 pel TNF α és deguda a una disminució del PPAR γ ¹¹⁰. El TNF α produeix en ratolins una disminució de fagocitosis de neutròfils apoptòtics pels macròfags, probablement per una disminució del CD36 entre altres receptors ²¹².

Un dels majors papers fisiològics del TNF α és intervenir en infeccions bacterianes, víriques i de paràsits²⁰⁵. Aquesta citoquina està principalment generada per monòcits i macròfags en resposta a lligands inflamatoris, tals com TLRs, tot i que també és generat a través de la unió de diferents lligands al receptor *scavenger* CD36.

Una producció excessiva de TNF α , però, és perjudicial per l'organisme, induint a processos inflamatoris crònics com la patologia d'AR. Aquesta patologia es caracteritza per una inflamació del teixit sinovial, portant a un dany progressiu, erosió del cartílag i os adjacent i discapacitat crònica. El TNF α intervé en aquests processos, induint l'acumulació de leucòcits als llocs inflamats, angiogènesi, augment de metaloproteinases i producció de citoquines inflamatòries com la IL-6 i la IL-1 β pels macròfags²¹³⁻²¹⁷. En aquesta producció excessiva de TNF α en l'AR, s'ha involucrat als TLRs. A través de lligands endògens generats durant els processos inflamatoris, s'activaran diversos TLRs que induiran la producció excessiva de TNF α entre d'altres citoquines que intervindran en la patologia de l'AR i malalties inflamatòries cròniques^{205, 218-221}.

2.4.2. IL-10

La IL-10 és una citoquina antiinflamatòria que juga un paper important en el manteniment de l'homeòstasi de l'organisme i durant processos inflamatoris i patogènics. Està produïda majoritàriament per monòcits i macròfags, tot i que també és produïda per limfòcits T CD4⁺ Th2, limfòcits T reguladors, limfòcits B, mastòcits i eosinòfils entre d'altres²²²⁻²²⁴. Aquesta citoquina és secretada a l'exterior de la cèl·lula, on durà a terme la seva funció a través de la unió al seu receptor, senyalitzant principalment a través de STAT3²²⁵⁻²²⁶. La IL-10 és capaç de regular el sistema

immunològic durant la inflamació: a) disminueix la producció de citokines inflamatòries com IFN- γ i TNF α produït per els limfòcits Th1²²⁷ i la seva proliferació directament per inhibició de la producció de IL-2²²⁷⁻²²⁸ b) disminueix l'activació i proliferació dels limfòcits T indirectament mitjançant la disminució de l'expressió de molècules coestimuladores com el ICAM I, CD80 i CD86 (l·ligands de CD28) i CMH-II en les cèl·lules presentadores d'antigen²²⁹⁻²³⁰ c) disminueix la síntesi de citokines proinflamatòries pels monòcits activats per TLRs, com la IL-1, IL-6 i TNF α . i quimiocines com la IL-8, inhibint així l'activació i el reclutament dels leucòcits al lloc d'inflamació que causant el dany tissular^{228, 231-232} d) disminueix la inducció d'òxid nítric pels macròfags, e) inhibeix la producció de radicals d'oxigen i metalloproteinases pels macròfags²³³⁻²³⁴. Això queda plenament demostrat en ratolins knockout de IL-10 o mitjançant el bloqueig per anticossos anti-IL-10. En aquests dos models murins es desenvolupa una malaltia inflamatòria intestinal espontània²³⁵⁻²³⁶. Així, no és estrany que els monòcits produeixin IL-10 durant els estímuls amb TLRs, ja que serveix com a molècula de fre durant la inflamació¹³⁷. La IL-10 també és generada a través de la unió dels l·ligands de CD36 a aquest receptor. Per exemple, la unió de oxLDL, neutròfils apoptòtics i TSP-1 al CD36 indueix la producció de IL-10, atenuant la resposta inflamatòria^{132, 237-238}. La IL-10 és per tant una citokina important durant la fase de resolució d'inflamació per tal de regular l'ambient inflamatori i tornar els teixits afectats a un estat homeostàtic.

2.4.3. IL-6

La IL-6 és una citokina que presenta un efecte dual, actuant en alguns nivells com a mecanisme de defensa per l'organisme, però durant processos inflamatoris crònics,

presenta un paper proinflamatori. Aquesta citoquina es sintetitzada per diferents tipus cel·lulars, però la major font són els monòcits i macròfags en els llocs d'inflamació. Aquesta citoquina és induïda després que els monòcits i els macròfags rebin senyals via TLRs o per citoquines induïdes durant l'activació per TLRs^{20, 239}. La IL-6 intervé en la reacció de fase aguda, estimulants als hepatòcits la producció de proteïnes de fase aguda²⁴⁰. Aquesta citoquina, un cop produïda, és secretada a l'exterior cel·lular, on durà a terme la seva funció a través del receptor de la IL-6, expressat en forma soluble i en la membrana de diversos tipus cel·lulars com els hepatòcits, monòcits, cèl·lules B i neutròfils i algunes subpoblacions de limfòcits T²⁴¹. A través de la unió de la IL-6 al seu receptor de membrana, o bé al receptor soluble i unió posterior a la cèl·lula, senyalitza a través de gp130, activant la transducció de senyals i activant la via STAT3 per induir els seus efectes²⁴²⁻²⁴³. La IL-6 presenta diferents mecanismes durant els processos inflamatoris aguts. Quan s'uneix a cèl·lules endotelials, produeix una activació que augmenta l'expressió de molècules d'adhesió com ICAM-1, VCAM-1, i l'alliberament de quimiocines com la IL-8 i MCP-1, que contribuiran al reclutament de neutròfils i monòcits als teixits inflamats²⁴⁴⁻²⁴⁵. A més, durant una resposta inflamatòria aguda, la IL-6 també actua com a molècula antiinflamatòria, suprimint els nivells de citoquines proinflamatòries sense comprometre els nivells de les antiinflamatòries²⁴⁵⁻²⁴⁶, i induint la producció de l'antagonista del receptor de la IL-1, que és un mediador antiinflamatori²⁴⁷. Si la resposta aguda no es resol correctament, la IL-6 també contribueix a la transició entre la inflamació aguda i crònica²⁴⁵. Un dels canvis més importants entre la inflamació aguda i crònica és el canvi de reclutament de neutròfils per monòcits en l'àrea afectada. Això es dona per un canvi en les quimiocines produïdes per les cèl·lules estromals, els macròfags inflamatoris i els neutròfils de l'àrea inflamada. Aquí intervé la IL-6, augmentant la producció de MCP-1 i disminuint la

producció d' IL-8 per finalment afavorir la transició d'infiltrats de neutròfils a monòcits ²⁴⁸⁻²⁴⁹. Un altre paper de la IL-6 en processos inflamatoris crònics és rescatar els limfòcits T de l'apoptosi i induir l'expressió de IL-17 per diferenciació de limfòcits Th17 ²⁵⁰⁻²⁵².

2.4.4. IL-17

La IL-17 és una citocina proinflamatòria que contribueix fisiològicament a la defensa de patògens, com bacteris i fongs, i en la patogènesi de diverses malalties inflamatòries. Tot i que és una citocina produïda per cèl·lules del sistema immune adaptatiu en resposta als seus receptors, l'estimulació de receptors del sistema immune innat també tenen un paper important per induir la producció d'aquesta citocina. Les cèl·lules que produeixen majoritàriament aquesta citocina són els limfòcits T CD4⁺ Th17 després de l'activació via TCR juntament amb la presència de diversos factors que es poden generar durant l'activació per TLRs com la IL-6, TGF- β i IL-23 ²⁵³⁻²⁵⁵. Recentment s'ha descrit que aquesta citocina també es produeix en els limfòcits T CD4⁺ després de l'estimulació amb lligands de TLR2 i dels receptor *scavenger* CD5 ^{159, 163-164}. A través de la unió al seu receptor, la IL-17 activarà el factor de transcripció NF- κ B en les cèl·lules diana, induint l'expressió de diversos gens ²⁵⁶⁻²⁵⁸. Les cèl·lules que tenen el receptor per la IL-17 són majoritàriament les cèl·lules epitelials, fibroblasts i cèl·lules mieloides, sent així els màxims responedors als efectes de la IL-17.

La IL-17 juga un paper clau en el desenvolupament de la immunitat de les mucoses contra patògens extracel·lulars com bacteris i fongs ²⁵⁹, estimulant la producció de factors antimicrobians i quimiocines en els epitelis i fibroblasts ²⁶⁰. A més, és important per combatre les cànides, tant a nivell sistèmic com a l'orofaringe ²⁶¹⁻²⁶².

La IL-17 té un paper important durant la inflamació. En cultius *in vitro*, s'ha vist que la IL-17 indueix la producció de molts mediadors inflamatoris. Predominantment, estimula la producció de citokines als fibroblasts i cèl·lules endotelials i epitelials involucrades en l'atracció de neutròfils al lloc d'infecció (IL-8, GRO α i GCP-2)²⁶³⁻²⁶⁵. A més, en els macròfags, indueix la producció de mediadors inflamatoris com IL-1 β , TNF α , IL-6 i metaloproteinases²⁶⁶⁻²⁶⁷.

Sembla que perquè la IL-17 indueixi els màxims efectes durant la inflamació aguda i crònica necessita la combinació amb altres citokines inflamatòries²⁶⁸, observant-se una sinergia entre IL-17 i TNF α o la IL-1 β , on la IL-17 augmenta l'efecte del TNF α per potenciar l'expressió del TNFR2.

La IL-17 intervé en diferents malalties inflamatòries cròniques, com per exemple en l'AR o en les malalties inflamatòries intestinals. En l'AR, la IL-17 és un predictor de funció microvascular²⁶⁹, a més de ser proaterogènic per promoure el reclutament de monòcits i macròfags en l'aorta²⁷⁰. En les articulacions, la IL-17 amplifica la inflamació per estimular la producció de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, GRO α i MIP-3 α responsable del reclutament de cèl·lules dendrítiques i limfòcits T^{254, 271-272} i inhibir la producció de matriu pels condrocits i osteoclasts, produint així una inflamació massiva en les articulacions que durà a una erosió òssia i dany al cartílag²⁷³. A les biòpsies de les malalties inflamatòries intestinals, s'ha vist per immunohistoquímica un augment de la població CD3 IL-17⁺²⁷⁴, on l'estímul de cèl·lules miofibroblàstiques subepitelials clòniques humanes amb IL-17 indueix l'expressió de IL-6, IL-8 i MCP-1, induint la migració de neutròfils i monòcits i la secreció de metaloproteinases que danyen el teixit²⁷⁵⁻²⁷⁶.

2.4.5. IFN γ

El IFN γ és una citoquina proinflamatòria que juga un paper important durant infeccions i processos inflamatoris, intervenint en l'atracció i creixement de leucòcits, maduració i diferenciació de molts tipus cel·lulars ²⁷⁷⁻²⁷⁹. Aquesta citoquina és produïda majoritàriament per limfòcits T CD4⁺ Th1, T CD8⁺ i NK per activació de receptors TCR i recentment descrit després de l'estimulació amb lligands de TLR2^{156-157, 280-282}, tot i que altres cèl·lules com les B, NKT i cèl·lules presentadores d'antigen també el poden secretar en menor quantitat ²⁸³⁻²⁸⁶. A través de la unió al receptor del IFN γ , s'activa la via JAK-STAT, i el STAT1 que induirà la transcripció de diferents gens relacionats amb la inflamació ²⁸⁷.

En la immunitat i inflamació, el IFN γ és capaç d'augmentar l'expressió de CMH-I, incrementant així el potencial dels limfòcits T citotòxics per reconèixer pèptids estranys i promoure la inducció de la immunitat ^{279, 288}. El IFN γ estimula el reemplaçament de diferents subunitats dels proteosomes constitutius per subunitats del immunoproteosoma, augmentant la quantitat, qualitat i repertori de pèptids que el CMH-I presentarà ²⁸⁹⁻²⁹⁰. El IFN γ també és capaç d'augmentar CMH-II en cèl·lules B, dendrítiques i monòcits i macròfags, promovent l'activació de limfòcits T CD4⁺ durant la inflamació ^{279, 291}. A més, el IFN γ generat per les Th1 activa la immunitat innata per activació de NK i macròfags, induint processos inflamatoris ²⁷⁹. Aquesta citoquina és capaç d'inhibir a les Th2 i augmentar el processament i presentació d'antígens i molècules de coestimulació en les cèl·lules presentadores d'antígens per diferenciar els limfòcits T CD4⁺ cap a Th1. El IFN γ indueix in vivo la secreció d' IL-12 en els macròfags i inhibeix la producció de IL-4 pels limfòcits T CD4⁺ Th2, produint una diferenciació cap a Th1 ²⁹²⁻²⁹³. Aquesta citoquina és capaç d'activar els efectes

microbicides als macròfags, augmentant la pinocitosi i els receptors que intervenen en la fagocitosi. A més, indueix la NADPH oxidasa, producció d'òxid nítric i espècies reactives d'oxigen que induiran inflamació ²⁹⁴.

Un altre paper del IFN γ és modular el tràfic de cèl·lules immunes en els llocs d'inflamació, a través d'induir l'augment d'expressió de molècules d'adhesió i quimiocines. El IFN γ i l'òxid nítric induït per IFN γ en els llocs d'inflamació provoca dilatació dels vasos i disminució del flux local de sang. A més, indueix l'augment de l'expressió de quimiocines com IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1alpha/beta, RANTES, i molècules d'adhesió com ICAM-I, VCAM-I, que faran tràfic de cèl·lules cap al lloc d'inflamació ²⁷⁹. El IFN γ intervé en la inducció de la cronicitat d'algunes patologies com l'AR, on els nivells de IFN γ en sèrum es correlaciona amb l'activació dels limfòcits T i monòcits ²⁹⁵. També intervé al dany cel·lular que es dona en les articulacions dels pacients ²⁹⁶ per l'activació de macròfags i sinoviòcits a produir citocines i mediadors inflamatoris, com TNF α , IL-1 i metaloproteases ^{217, 297-298}.

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

El CD36 és un receptor *scavenger* que està íntimament involucrat en els processos inicials i finals de la inflamació. Durant els processos inicials, el CD36 present a la superfície dels monòcits intervé reconeixent patògens i altres molècules, o bé actuant com a coreceptor del TLR2 per tal d'induir la producció de mediadors inflamatoris. Durant els processos finals de la inflamació, el CD36 en monòcits i macròfags intervé principalment en la fagocitosi de neutròfils apoptòtics per tal de retornar la resposta immune i teixits danyats a l'homeòstasi.

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat analitzar l'expressió del CD36 en diferents subpoblacions leucocitàries i el seu paper durant els processos inflamatoris.

Senyals via TLR2 i TLR4 són capaces d'augmentar els nivells d'alguns receptors *scavenger* com el CD163. Això suggereix que els senyals via TLR i receptors *scavenger* poden interaccionar. Tot i que es coneix que el CD36 i els TLRs cooperen en la inducció de la resposta inflamatòria, es desconeix si els senyals de TLR poden modificar l'expressió del CD36 en els monòcits.

Per tant i com a primer objectiu, ens proposem analitzar si els senyals via TLR2 i TLR4 poden regular l'expressió del receptor CD36 a la superfície dels monòcits, i quines són les conseqüències funcionals.

Aquests són els objectius específics:

1. Estudiar la cinètica d'expressió del CD36 en monòcits després de l'estimulació amb lligands de TLR2 i TLR4.

3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2. Analitzar les citokines induïdes pels lligands de TLR2 i TLR4 i comprovar la implicació d'aquestes citokines en l'expressió del CD36 en els monòcits.
3. Estudiar la localització del CD36 després del cultiu amb lligands de TLR4 en els monòcits.
4. Estudiar si el canvi d'expressió del CD36 comporta conseqüències en la fagocitosi de neutròfils apoptòtics.

El CD36 es troba expressat en monòcits i plaquetes. En la literatura, existeix controvèrsia sobre l'expressió del CD36 en una petita subpoblació de limfòcits. A més a més, és intrigant la presència del CD36 en la superfície d'un limfòcit T per la seva pròpia funció de receptor *scavenger*.

Com a segon objectiu, ens proposem confirmar la presència de CD36 en la superfície de limfòcits i estudiar la capacitat funcional d'aquests limfòcits T CD36+.

Aquests són els objectius específics:

1. Analitzar l'expressió del receptor CD36 en limfòcits T i estudiar si l'expressió del CD36 és intrínseca o extrínseca als limfòcits.
2. Estudiar el fenotip de la subpoblació de limfòcits T CD36+.
3. Estudiar la capacitat proliferativa de la subpoblació de limfòcits T CD36+.
4. Estudiar la producció de citokines intracel·lulars de la subpoblació de limfòcits T CD36+.
5. Analitzar el paper d'aquesta subpoblació T CD36+ en patologies inflamatòries autoimmunes com l'artritis reumatoide.

4. PUBLICACIONES

4.1. ARTICLE I:

Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals.

Carlos Zamora, Elisabet Cantó, Juan C. Nieto, M. Angels Ortiz, Candido Juarez, Silvia Vidal. *Cytokine* 2012 Oct; 60(1): 257-65. **Factor de impacte: 2.518. Tercer quartil.**



Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals

Carlos Zamora^a, Elisabet Cantó^a, Juan C. Nieto^a, M. Angels Ortiz^a, Candido Juarez^b, Sílvia Vidal^{a,*}

^aDep. Immunology of Institut Recerca Hospital S. Pau, Barcelona, Spain

^bDep. Immunology of Hospital S. Pau, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 February 2012

Received in revised form 11 June 2012

Accepted 12 June 2012

Available online 12 July 2012

Keywords:

Scavenger receptor

Phagocytosis

Monocytes

ABSTRACT

TLR recognition activates the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines and it also modulates the expression of crucial molecules involved in phagocytosis and antimicrobial activity. Scavenger receptors can act as TLR co-receptors or facilitate antigen loading. However, it remains unknown whether TLR can modulate the expression of these scavenger receptors. We stimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with TLR2 (Pam3CSK4 and FSL1) and TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS) and then analyzed CD36 expression on different monocyte subpopulations by flow cytometry. TLR2 and TLR4 ligands can downregulate CD36 on the surface of monocytes, guiding the protein to intracellular compartments. Even though TLR-activation induced TNF α , IL-10 and IL-6 production, only recombinant TNF α was able to downregulate CD36. Neutralizing anti-TNF α antibodies showed that the Pam3CSK4 and FSL1-induced downregulation was partially mediated by TNF α but not by IL-6 or IL-10. However, LPS-induced downregulation could have also been caused by direct TLR4 targeting and signaling, and/or mediated by other unknown factors. CD36 downregulation reduced the capability of monocytes to phagocytose apoptotic neutrophils. In conclusion, modulation of scavenger receptor expression by TLR targeting on monocytes has functional consequences. Characterization of this complex regulation may help us to understand this innate response and develop specific therapeutic drugs for each mechanism.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Toll-like receptors (TLRs) are type-I transmembrane proteins that have extracellular leucine-rich repeat motifs and an intracellular toll/interleukin-1 receptor domain. These receptors are crucial in the recognition of pathogens [1]. Through this recognition, TLRs orchestrate the innate immune system and modulate adaptive immune responses to microbial infections [2]. TLRs recognize pathogen-associated molecular patterns that are conserved among microbial species [3]. Most cell surface TLRs, including TLR4, TLR1/TLR2 and TLR6/TLR2, can recognize microbial membrane lipids. On the other hand, intracellular TLRs, such as TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9, recognize microbial nucleic acids [4,5]. TLR signaling contributes to host defense through several mechanisms. It can mediate innate response directly by triggering antimicrobial activity, regulating phagocytosis and differentiating monocyte into macrophage and dendritic cells [6–9]. Moreover, TLR signals induce activation of the nuclear factor- κ B in antigen-presenting cells. This activation

leads to secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF α , IL-10 and IL-6, induction of co-stimulatory molecules, B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86), upregulation of class II major histocompatibility complex molecules [1,10–13], and CD163 scavenger receptor. Upregulation of the CD163 scavenger receptor during TLR activation is due to the production of IL-10 and IL-6. It may facilitate antigen loading, and initiate antigen presentation and adaptive immune responses to the infectious agent [14].

Scavenger receptor CD36 is a transmembrane glycoprotein member of the class B scavenger receptor family. CD36 is found on macrophages, microglia, microvascular endothelium, cardiac and skeletal muscle, adipocytes and platelets [15]. CD36 recognizes a wide variety of ligands, including OxLDL [16,17], anionic phospholipids [18], apoptotic cells [19], thrombospondin [20], collagen [21] and *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes [22]. CD36 expression on monocytes is regulated by numerous cytokines [23]. IL-4 induces CD36 in macrophages via generation of 15-deoxy-PGJ₂, a PPAR- γ ligand [24]. Upregulation of CD36 by IL-4 could have an effect on physiological functions, such as the killing of microbial pathogens and scavenging for senescent cells [25]. On the other hand, downregulation of CD36 by TGF β correlates with inactivation of PPAR- γ . Downregulation of CD36 by TGF- β may be relevant in atherosclerotic foam cell formation mediated by this receptor [26].

Abbreviations: FSL1, Pam2CGDPKHPKSF; LPS, Lipopolysaccharide; OxLDL, Oxidized low-density lipoprotein; Pam3CSK4, Pam3CysSerLys4; PPAR- γ , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

* Corresponding author. Avda. Antoni M. Claret, 167, Barcelona 08025, Spain. Tel.: +34 935537544; fax: +34 935537598.

E-mail address: svidal@santpau.cat (S. Vidal).

Recent findings provide evidence of the essential role of type B scavenger receptors in the innate immune response to exogenous pathogens, in particular, to bacteria and their inflammatory compounds. CD36 is predominantly involved in phagocytosis and cytokine production in response to Gram-positive *Staphylococcus aureus* and its cell component lipoteichoic acid, and, to a lesser extent, to Gram-negative *Escherichia coli* and its cell wall component, lipopolysaccharide (LPS). It has been reported that TLR2/TLR6, but not TLR2/TLR1, requires CD36 as the coreceptor to sense diacylated lipoproteins [27]. By analogy with membrane protein CD14, it has been suggested that CD36 may function as an accessory protein to present these bacterial ligands to TLRs [27,28]. Moreover, CD36 is not only involved in bacteria phagocytosis, but also in apoptotic cell clearance [29–32].

All these data suggest that TLR exposure could be associated with changes in scavenger receptor expression. To analyze the effect of TLR ligands on CD36 expression, we studied how Pam3CSK4, FSL1 (TLR2 ligands) and LPS (TLR4 ligand) regulate, in vitro, CD36 expression on the different monocyte subsets. TLR-induced cytokines and their respective blocking antibodies were then used to determine whether the TLR effect is direct on the scavenger receptor expression. Finally, we investigated the functional consequences of TLR-induced CD36 regulation.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Whole blood from 15 healthy donors was collected in BD Vacutainer CPTs (sodium citrate anticoagulant with a FICOLL™ Hypaque™) (BD, Franklin Lakes, NJ). Tubes were then processed according to the manufacturer's instructions within one hour after collection. Informed consent was obtained and ethical approval for the study was granted by the Institutional Ethics Committee. After tube centrifugation, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were washed twice in PBS and resuspended with complete RPMI medium (supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Biowhitaker, Verviers, Belgium)).

2.2. Purification of monocytes

Monocytes were obtained from PBMC by negative immunomagnetic selection using the Human Monocyte Enrichment Kit (StemCell Technologies, Grenoble, France). The viability of recovered non-touched population was determined by Trypan Blue (>99%). The purity of monocytes was then evaluated by flow cytometry and was always >95%.

2.3. Peripheral blood mononuclear cell cultures

PBMC and purified monocytes (1×10^6 cells/ml) were cultured with 0.02 µg/ml ultrapure lipopolysaccharide (LPS), 0.1 µg/ml Pam3CSK4, 0.01 µg/ml FSL1 (Invivogen, San Diego, CA) and with medium for 24 h and 48 h in 5% CO₂ at 37 °C. PBMC were also cultured with IL-10 (40, 8, 1.6 and 0.32 ng/ml, Peprotech, London, UK), TNFα (250, 50, 10 and 2 ng/ml, BD Pharmingen, San Jose, CA), IFNγ (25, 5 and 1 ng/ml, BioLegend, San Diego, CA), IL-6 (100, 10 and 1 ng/ml, ImmunoTools, Friesoythe, Germany) and medium for 24 h and 48 h. In certain experiments, PBMC were cultured with 1 µg/ml cycloheximide (Sigma, S. Louis, Missouri) for 1 h in 5% CO₂ at 37 °C before incubation with ultrapure LPS, Pam3CSK4, FSL1 and medium at the previously indicated concentrations for 24 h.

To neutralize TNFα, IgG1 anti-TNFα antibodies (20, 10 and 2 µg/ml, BD Pharmingen) and the respective IgG1 controls were added to PBMC, 30 min before culturing with 0.02 µg/ml ultrapure LPS, 0.1 µg/ml Pam3CSK4, 0.01 µg/ml FSL1 or medium for 48 h.

2.4. Cytokine levels

Culture supernatants were tested for TNFα (BD Pharmingen), IL-10 (ImmunoTools), IL-6 (ImmunoTools) and IFNγ (BD Pharmingen) concentrations using specific ELISAs according to the manufacturer's instructions. All cytokines were quantified with standard curves provided by the corresponding ELISA kit. The limits of detection were: 30 pg/ml for TNFα and IL-10, 7.03 pg/ml for IL-6 and 76.6 pg/ml for IFNγ.

2.5. Flow cytometry analysis of CD36 expression

To analyze the CD36 surface expression on monocytes by flow cytometry, 3×10^5 PBMC were stained with anti-CD14-PEDy647 (ImmunoTools), anti-CD16-FITC (ImmunoTools) and anti-CD36-PE (BD Biosciences) or the corresponding isotype controls. Using cell side scatter (SSC) versus forward scatter (FSC) plus CD14 versus CD16, we analyzed CD36 expression on gated CD14dim CD16+, CD14 + CD16++ and CD14 + CD16+ monocytes (Beckman Coulter F500 cytometer). We calculated the percentages of positive cells (% cells) and mean fluorescence intensity (MFI) of each individual marker using EXPO™ 32 MiltiCOMP Software (Beckman coulter).

2.6. Confocal microscopy imaging

To analyze the fate of CD36 after LPS cultures by confocal microscopy, PBMC were incubated with anti-CD36-PE monoclonal antibody (BD Pharmingen) before adding the TLR4 ligand. After 24 h cultures, PBMC were collected, stained with anti-CD14-PEDy647 (ImmunoTools) and cytochrome c centrifugated. To assess antibody location, images were obtained with a LEICA TCS SP5 laser scanning confocal microscope. DPSS 561 laser with excitation wavelengths of 561 nm was used for PE label analysis, and HeNe 633 laser with excitation wavelengths of 633 nm was used for PE-Dy647 label analysis.

2.7. Apoptosis analysis of neutrophils

Neutrophils were collected from the pellet after Ficoll centrifugation (Ficoll-Hypaque gradient centrifugation). Red blood cells were removed by Quicklysis solution (Cytognos, Salamanca, Spain). Neutrophils (1×10^6 cells/ml) were left for 48 h in 5% CO₂ at 37 °C in complete medium. The rate of neutrophil apoptosis was analyzed by flow cytometry after double-staining with anti-CD66b-PE (ImmunoTools) and FITC-conjugated Annexin V (ImmunoTools).

2.8. Phagocytosis assays

After culturing PBMC (1×10^6 cells/ml) with ultrapure LPS, Pam3CSK4 and FSL1 for 48 h, PBMC were washed and resuspended with complete RPMI medium. PBMC were then co-cultured for 4 h with apoptotic neutrophils at 4:1 and 40:1 ratio previously stained with anti-CD66b-PE. After co-culture, cells were washed twice with PBS and stained with anti CD14-PEDy647. Monocytes that had engulfed apoptotic neutrophils were identified as CD14 + CD66b + cells by flow cytometry. To confirm the role of CD36 on the phagocytosis of apoptotic neutrophils, 48 h-medium cultured PBMC were washed and incubated with saturating concentrations of blocking anti-CD36 antibody (clone CB38, BD Pharmingen) for 20 min [33]. After the incubation, cells were

washed and co-cultured with 40:1 and 4:1 apoptotic neutrophils for 4 h. Then, cells were washed twice with PBS and stained with anti-CD14-PEDy647. Monocytes that had engulfed apoptotic neutrophils were identified as CD14 + CD66b + cells by flow cytometry.

2.9. Statistics

Statistical analyses were performed using t test, Wilcoxon and Spearman correlation. Data were presented as mean and \pm s.e.m. deviation. P values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. CD36 expression after culturing with TLR2 and TLR4 ligands

PBMC from 8 healthy donors were stimulated for 24 h and 48 h with Pam3CSK4, FSL1 (TLR2/TLR1 and TLR2/TLR6 ligands respectively) and LPS (TLR4 ligand). CD36 expression was then analyzed on CD14dimCD16⁺⁺, CD14 + CD16⁺⁺, and CD14 + CD16⁺ monocyte subpopulations (Figs. 1 and 2). This subdivision was recently approved by the Nomenclature Committee of the International Union of Immunological Societies (NC-IUIS) [34]. After culturing in medium for 48 h, CD36 expression on CD14 + CD16⁺⁺ and CD14 + CD16⁺ monocytes was comparable ($91.4 \pm 16.7\%$ and $85.5 \pm 24.9\%$, respectively). In contrast, CD36 expression on CD14dimCD16⁺⁺ cells cultured in medium was lower than the other two monocyte subpopulations ($65.1 \pm 19.9\%$; $p < 0.01$). CD36 reached the lowest expression on the three monocyte subpopulations after 48 h culture with TLR2 and TLR4 ligands. After culturing with LPS, CD36 expression was strongly downregulated (CD14dimCD16⁺⁺: $18.1 \pm 9.6\%$;

CD14 + CD16⁺⁺: $29.8 \pm 11.9\%$ and CD14 + CD16⁺: $28.3 \pm 10.6\%$, $p < 0.01$) and also, though to a lesser extent, in culture with Pam3CSK4 (CD14dimCD16⁺⁺: $19.7 \pm 7.7\%$; CD14 + CD16⁺⁺: $39.8 \pm 9.5\%$ and CD14 + CD16⁺: $38.3 \pm 11.1\%$; $p < 0.01$) and FSL1 (CD14dimCD16⁺⁺: $27.6 \pm 11.2\%$; CD14 + CD16⁺⁺: $63.2 \pm 19.1\%$ and CD14 + CD16⁺: $59.4 \pm 19.1\%$, $p < 0.05$).

Similar changes in CD36 expression was observed when we repeated the analysis with purified monocytes by the method described in materials and methods ($>95\%$ of monocytes) (Supplemental Fig. 1). We also observed that CD36 mRNA levels on purified monocytes were downregulated by TLR signals (unpublished results). This result suggests that CD36 downregulation on monocytes did not depend on the presence of other leukocytes.

3.2. Cytokine production in response to TLR2 and TLR4 ligands and its effect on CD36 expression

CD36 downregulation by TLR2 and TLR4 ligands could be an indirect effect of TLR-induced cytokines. TNF α , IL-10, IL-6 and IFN γ secretion were therefore measured by ELISA in supernatants from PBMC cultured with TLR2 and TLR4 ligands after 24 h and 48 h (Fig. 3A). PBMC cultured in medium did not secrete detectable TNF α levels. When PBMC were stimulated with TLR2 and TLR4 ligands, the highest levels of TNF α were seen at 24 h of culture. LPS induced higher TNF α levels than medium and TLR2 ligands (LPS: 1519 ± 248 pg/ml; Pam3CSK4: 254 ± 53 pg/ml and FSL1 187 ± 43 pg/ml, $p < 0.05$).

PBMC cultured in medium did not secrete detectable IL-10 and IL-6 levels, but TLR ligands induced IL-10 and IL-6, peaking at 48 h. Supernatants from 48 h LPS cultures presented higher IL-10 concentrations than TLR2 ligand cultures (585 ± 105 pg/ml, $p < 0.01$

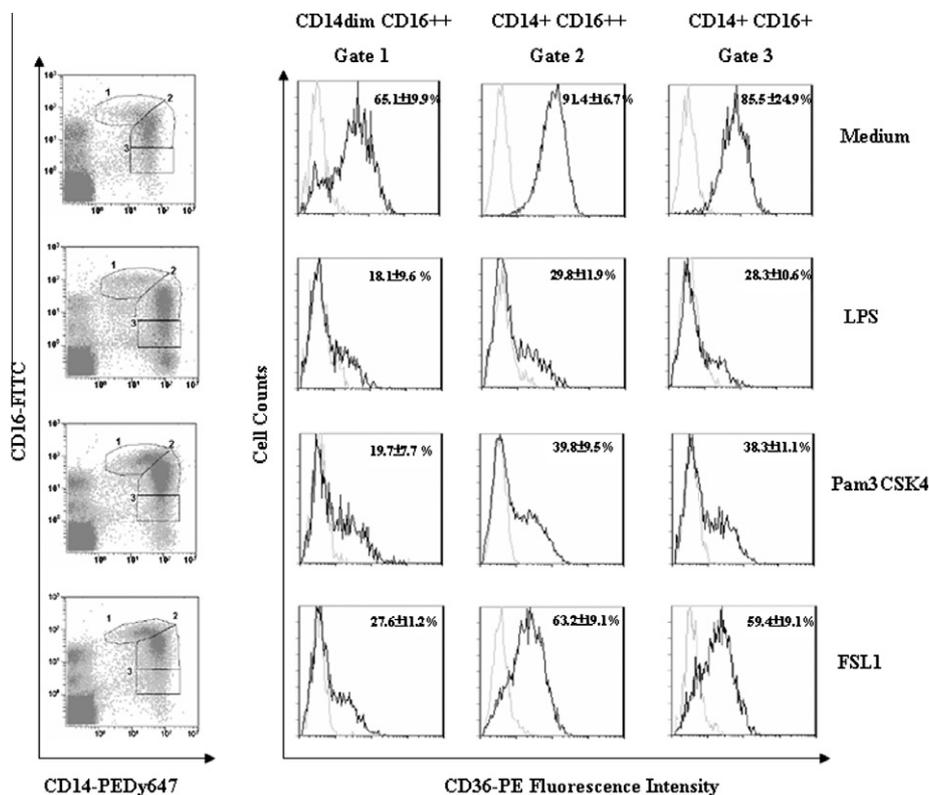


Fig. 1. CD36 expression on CD14dim CD16⁺⁺, CD14 + CD16⁺⁺ and CD14 + CD16⁺ monocyte subpopulations after 48 h of culture with TLR4 and TLR2 ligands. PBMC were cultured (1×10^6 cells/ml) with LPS (0.02 μ g/ml), Pam3CSK4 (0.1 μ g/ml), FSL1 (0.01 μ g/ml) and medium for 48 h. PBMC were then recollected and stained with anti-CD14-PEDy647, anti-CD16-FITC and anti-CD36-PE antibodies. Expression of CD36 on CD14dim CD16⁺⁺ (1), CD14 + CD16⁺⁺ (2) and CD14 + CD16⁺ (3) monocytes was analyzed by flow cytometry. A representative experiment is shown ($n = 8$). Data are expressed as percentage of CD36 \pm s.e.m.

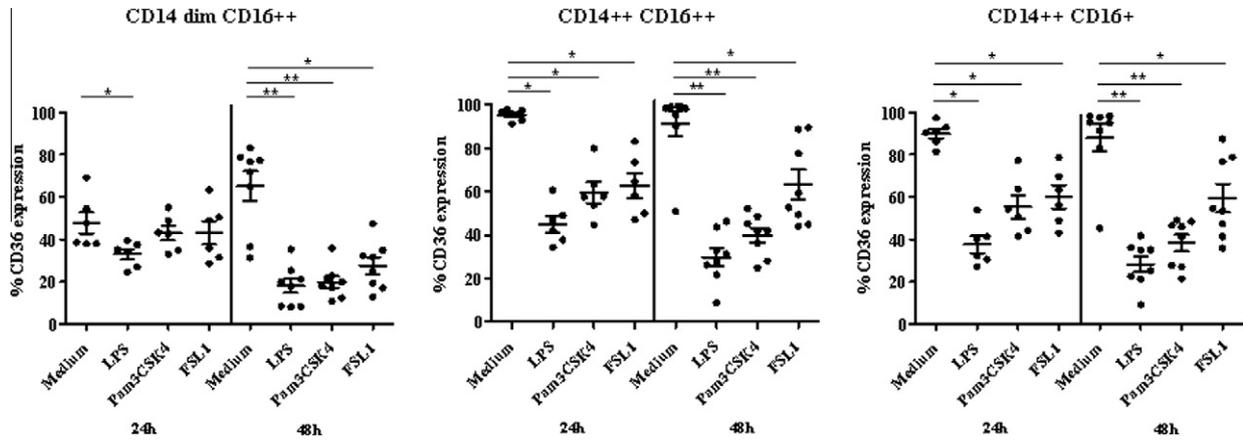


Fig. 2. CD36 expression on CD14^{dim} CD16⁺⁺, CD14⁺⁺ CD16⁺⁺ and CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulations after 24 h and 48 h of culture with TLR4 and TLR2 ligands. PBMC were cultured (1×10^6 cells/ml) with LPS (0.02 μ g/ml), Pam3CSK₄ (0.1 μ g/ml), FSL1 (0.01 μ g/ml) and medium for 24 h and 48 h. PBMC were then recollected and stained with anti-CD14-PEDy647, anti-CD16-FITC and anti-CD36-PE antibodies. Expression of CD36 on CD14^{dim} CD16⁺⁺, CD14⁺ CD16⁺⁺ and CD14⁺ CD16⁺ monocytes was analyzed by flow cytometry. Each data correspond to individual percentage of CD36. Mean of percentages \pm s.e.m. was also shown ($n = 8$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with medium using Wilcoxon test.

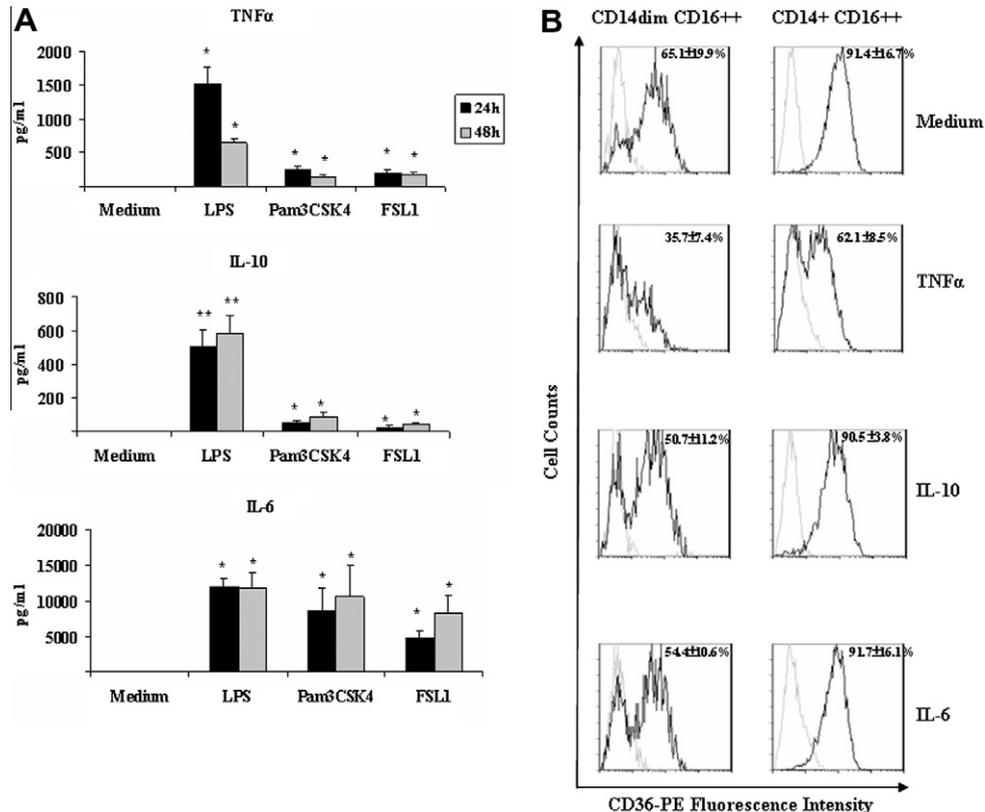


Fig. 3. TNF- α , IL-10 and IL-6 production by PBMC after TLR activation and their effect on CD36 expression after 48 h of culture. (A) PBMC were cultured (1×10^6 cells/ml) with LPS (0.02 μ g/ml), Pam3CSK₄ (0.1 μ g/ml), FSL1 (0.01 μ g/ml) and medium for 24 h and 48 h. After culture, supernatants were collected and tested for TNF α , IL-10 and IL-6 concentration by ELISA ($n = 8$). (B) PBMC were cultured with TNF- α (2 ng/ml), IL-10 (40 ng/ml) and IL-6 (100 ng/ml) for 48 h and PBMC were then recollected and stained with anti-CD14-PEDy647, anti-CD16-FITC and anti-CD36-PE antibodies to analyze CD36 expression on CD14^{dim} CD16⁺⁺ and CD14⁺ CD16⁺⁺ monocytes by flow cytometry ($n = 5$). TNF α , IL-10 and IL-6 levels were expressed as mean \pm s.e.m. pg/ml. Data are expressed as percentage of CD36 \pm s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with medium using Wilcoxon test. ELISA detection limits were 30 pg/ml for TNF α and IL-10 and 7.03 pg/ml for IL-6.

for LPS; 87 ± 24 pg/ml for Pam3CSK₄ and 42 ± 9 pg/ml for FSL1, $p < 0.05$). Supernatants from 48 h LPS and Pam3CSK₄ cultures presented similar IL-6 levels (11841 ± 2246 pg/ml for LPS and 10630 ± 4285 pg/ml for Pam3CSK₄), whereas FSL1 cultures presented lower IL-6 levels (8201 ± 2489 pg/ml, $p < 0.05$). On the other hand, IFN γ levels were undetectable in supernatants from TLR4 and TLR2 ligand cultures.

To determine the effect of TLR induced cytokines on CD36 downregulation, PBMC from 5 healthy donors were cultured in the presence of TNF α , IL-10 and IL-6 for 24 h and 48 h at different concentrations (See Material and Methods). After 24 h of culture in the presence of cytokines, CD36 expression did not change in any of the three monocyte subpopulations (data not shown). After 48 h of culture with TNF α , but not with IL-10 or IL-6, CD36 expres-

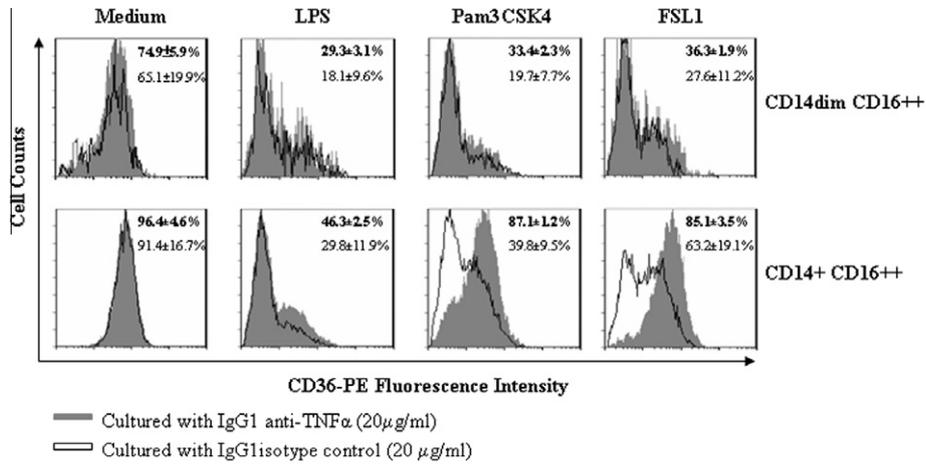


Fig. 4. CD36 expression after culturing with TLR2 and TLR4 ligands in the presence of neutralizing anti-TNF α antibodies. PBMC were cultured (1×10^6 cells/ml) with LPS (0.02 μ g/ml), Pam3CSK4 (0.1 μ g/ml), FSL1 (0.01 μ g/ml) and medium with 20 μ g/ml of neutralizing anti-TNF α or isotype control for 48 h (bold and plain data respectively). After culturing, cells were stained with anti-CD14-PEDy647, anti-CD16-FITC and anti-CD36-PE antibodies to analyze CD36 expression on CD14dim CD16++ and CD14 + CD16++ monocytes by flow cytometry. A representative experiment of CD36 expression on monocyte populations after culturing PBMC with TLR2 and TLR4 ligands plus 20 μ g/ml of anti-TNF α is shown ($n = 4$). Data are expressed as percentage of CD36 \pm s.e.m.

sion was downregulated on three monocyte subpopulations in a concentration dependent manner (CD14dimCD16++: $35.7 \pm 7.4\%$; CD14 + CD16++: $62.1 \pm 8.5\%$ and CD14 + CD16+: $55.4 \pm 5.9\%$ for 2 ng/ml of TNF α culture, $p < 0.05$). Since CD14 + CD16+ and CD14 + CD16++ monocytes showed a comparable CD36 downregulation, only results from CD14 + CD16++ are shown (Fig. 3B).

3.3. Effect of neutralizing TLR induced TNF on CD36 expression

We next investigated whether TLR-induced TNF α could be the only factor responsible for CD36 downregulation after culturing with TLR2 and TLR4 ligands. Neutralizing anti-TNF α antibodies (20, 10 and 2 μ g/ml) were included in PBMC cultures from 4 healthy donors before adding 0.02 μ g/ml ultrapure LPS, 0.1 μ g/ml Pam3CSK4, 0.01 μ g/ml FSL1 and medium. Neutralizing anti-TNF α partially restored CD36 expression on CD14 + CD16++ and CD14 + CD16+ monocytes in Pam3CSK4 and FSL1 cultures

(Pam3CSK4: $87.1 \pm 1.2\%$ for CD14 + CD16++ and $75.8 \pm 0.9\%$ for CD14 + CD16+; FSL1: $85.1 \pm 3.5\%$ for CD14 + CD16++ and $71.6 \pm 7.6\%$ for CD14 + CD16+, $p < 0.01$) (only CD14 + CD16++ showed, Fig. 4). Anti-TNF α antibodies were unable to restore LPS-induced CD36 downregulation ($29.3 \pm 3.1\%$ for CD14dim CD16++, $46.3 \pm 2.5\%$ for CD14 + CD16++ and $40.4 \pm 2.3\%$ for CD14 + CD16+). To analyze if anti-TNF α antibodies neutralize TNF α produced in LPS-culture (2 ng/ml), we stimulated PBMC with TNF α after adding 20 μ g/ml of antiTNF α antibody. We observed that CD36 was completely restored, confirming the total TNF α neutralization in our system (data not shown). Since anti-TNF α antibodies could not completely restore CD36 expression in our TLR2 and TLR4 ligand cultures, other induced mediators must contribute to the CD36 downregulation.

When PBMC were cultured with ultrapure LPS, Pam3CSK4, FSL1 or medium in the presence of 1 μ g/ml cycloheximide (protein synthesis inhibitor) for 24 h, CD36 downregulation was partially abro-

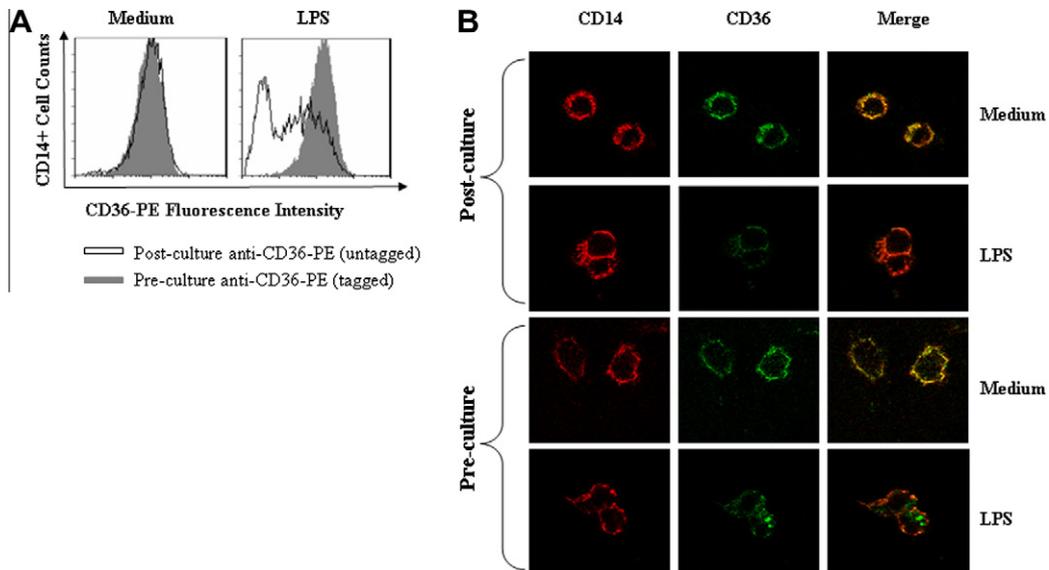


Fig. 5. Fate of CD36 after downregulation with TLR4 ligand. PBMC were incubated with anti-CD36-PE monoclonal antibody before adding LPS (tagged cells) or after culturing with LPS (untagged cells). After 24 h culture, PBMC were collected and stained with anti-CD14-PEDy647. (A) Cells were analyzed by flow cytometry ($n = 3$) and (B) cytospin centrifugated to analyze by confocal microscopy. To assess antibody location by confocal microscopy, images were obtained with a LEICA TCS SP5 laser scanning confocal microscope. A representative experiment of CD36 localization after culturing PBMC with TLR4 ligand is shown.

gated on monocytes (medium: $93.2 \pm 2.3\%$ CD36+ cells; LPS: $76.6 \pm 6.1\%$ CD36+ cells; Pam3CSK4: $76.4 \pm 9.1\%$ CD36+ cells; FSL1: $71.8 \pm 8.2\%$ CD36+ cells) (Supplemental Fig. 2). This result suggested that protein synthesis was involved in the TLR2 and TLR4 ligand induced CD36 downregulation.

3.4. Determination of the fate of down regulation of CD36 on monocytes

To determine the fate of CD36 on the cell surface, we tagged extracellular CD36 domain with PE-conjugated anti-CD36 monoclonal antibodies prior to 24 h TLR4 ligand cultures. Monocytes were then stained with PE-Dy647 anti-CD14. Flow cytometry analysis showed that LPS stimulated CD14+ monocytes with tagged CD36 molecules were all CD36+ similar to unstimulated monocytes (Fig. 5A). Cytometry analysis suggested that CD36 expression in tagged monocytes was not on cell surface but rather in cytoplasm. Confocal microscopy confirmed that a significant portion of CD36 was intracellularly located on tagged but not on untagged monocytes (Fig. 5B).

3.5. Effect of CD36 downregulation in the phagocytosis of apoptotic neutrophils

It has been shown that monocytes are involved in the phagocytosis of apoptotic cells through CD36 recognition [32]. To demonstrate that CD36 was crucially involved in the phagocytosis of apoptotic neutrophils in our system, we analyzed whether anti-CD36 antibodies (clone CB38) were able to block this phagocytosis. After culturing neutrophils in medium for 48 h, the percentage of

apoptotic neutrophils CD66b+ + Annexin FITC+ was $50.9 \pm 8.4\%$. When apoptotic CD66b-FITC+ neutrophils were co-cultured at 40:1 ratio with medium-cultured syngeneic PBMC, $68.1 \pm 10.8\%$ of monocytes have phagocytosed apoptotic neutrophils. When apoptotic CD66b-FITC+ neutrophils were co-cultured with blocked CD36 PBMC, we observed a significant reduction (46%) of phagocytosed apoptotic neutrophils (Supplemental Fig. 3). To analyze whether TLR2 and TLR4 ligand cultured monocytes were able to phagocytose apoptotic neutrophils, we co-cultured labeled apoptotic neutrophils with medium-cultured syngeneic PBMC or with LPS-cultured syngeneic PBMC from 5 healthy donors. Four hours later, the percentage of monocytes that became CD14+ CD66b+ was significantly higher in medium ($37.8 \pm 9.1\%$ for 4:1 ratio and $60.7 \pm 6.6\%$ for 40:1 ratio) than in LPS ($13.7 \pm 4.3\%$ for 4:1, $p < 0.05$, and 32.9 ± 3.5 for 40:1, $p < 0.01$), suggesting a significant less engulfment of apoptotic neutrophils. In contrast, no differences were observed in the engulfment of apoptotic neutrophils by Pam3CSK4- or FSL1- cultured monocytes (Pam3CSK4: $31.4 \pm 12.3\%$ for 4:1 and $54.9 \pm 5.1\%$ for 40:1 ratio; FSL1: 32.1 ± 12.1 for 4:1 and $57.9 \pm 5.9\%$ for 40:1 ratio) (Fig. 6).

A significant correlation between percentage of phagocytosed apoptotic neutrophils and CD36 expression was observed ($r = 0.520$, $p < 0.05$), indicating the role of CD36 in phagocytosis of apoptotic neutrophils.

4. Discussion

Our results show that both TLR2 and TLR4 signals can downregulate CD36 expression on peripheral blood monocytes. This downregulation is partly reversible and mediated by TLR-induced

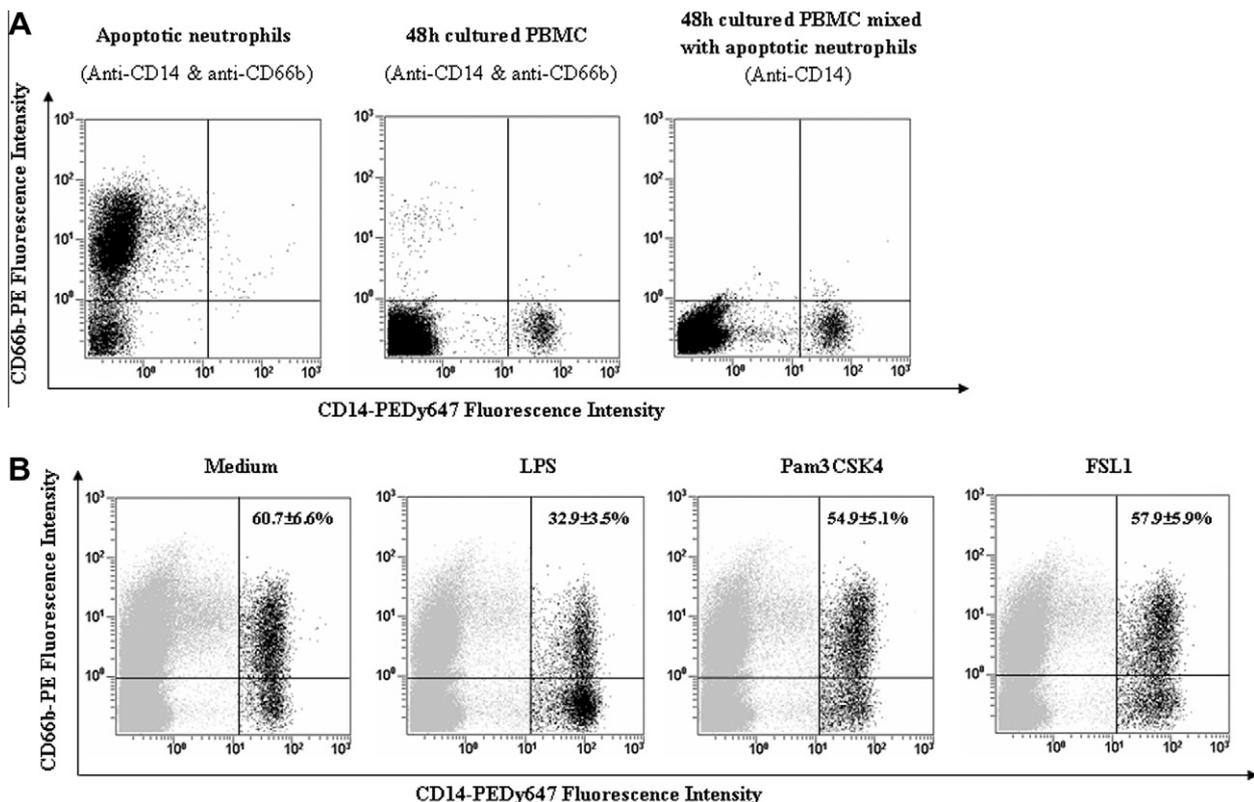


Fig. 6. Phagocytosis of apoptotic neutrophils after culturing with TLR2 and TLR4 ligands. Collected neutrophils from Ficoll pellet were cultured for 48 h in medium and stained with anti-CD66b-PE antibody. PBMC (1×10^6 cells/ml) were cultured with LPS (0.02 $\mu\text{g/ml}$), Pam3CSK4 (0.1 $\mu\text{g/ml}$), FSL1 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) and medium for 48 h. (A) As internal controls to set up quadrants for positive cells: apoptotic neutrophils without PBMC were stained with anti-CD66b-PE and anti-CD14-PE-Dy647 antibody; PBMC without apoptotic neutrophils were stained with anti-CD66b-PE and anti-CD14-PE-Dy647 antibody and a co-culture of PBMC with unlabeled apoptotic neutrophils were stained with anti-CD14-PE-Dy647 antibody. (B) The phagocytosis were analyzed in 4 h co-cultures of apoptotic CD66b-PE neutrophils with PBMC (at ratio 40:1) after staining with anti-CD14-PE-Dy647 antibody. Monocytes that had engulfed apoptotic neutrophils were identified as CD14+ CD66b+ cells by flow cytometry. A representative experiment of monocytes phagocytosing apoptotic neutrophils is shown ($n = 5$). Data are expressed as mean \pm s.e.m. of gated monocytes (black).

cytokine, TNF α . After CD36 gains entry into intracellular compartments, CD36-downregulated monocytes become less capable to phagocyte apoptotic neutrophils.

TLR2/TLR6 ligands, such as FSL1, expectedly downregulated CD36. Previous reports suggested that CD36 acts as an accessory protein or co-receptor, associating and presenting the ligand to the TLR2/TLR6 heterodimers on the cell surface. The whole complex must be subsequently internalized and targeted to the Golgi apparatus. CD36 then facilitates TLR2/TLR6 mediated NF- κ B activation [27,28,35]. CD36 is a selective sensor of ligands that signals via the TLR2/TLR6 heterodimer [36]. However, ligands that act via TLR2/TLR1 (Pam3CSK4) or via TLR2 and Nod (PGN) can also downregulate CD36 expression on cell surface, indicating the presence of a TLR6-unrestricted TLR2 pathway in CD36 regulation. Recent reports have accordingly described the formation of heterotypic receptor complexes comprising TLR2, TLR1 and CD36, that could be responsible for Pam3CSK4-induced CD36 downregulation [37]. In addition to ligands that require functional TLR2 expression, LPS, a TLR4 ligand, can also induce CD36 endocytosis. Since available TLR4 ligands are ultrapure and not contaminated with TLR2 ligands, LPS-induced CD36 downregulation may take place through a TLR2-independent recognition. Alternatively, it could be induced after LPS recognition by a recently described TLR4/TLR6 heterodimer [38].

We here demonstrated that CD36 downregulation is not clearly TLR2/TLR6 restricted. This event could thus be the effect of common cytokines induced by several TLRs. The secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-6 and IL-10 was induced after stimulation with TLR2 and TLR4 ligands. In contrast to IL-10 and IL-6, TNF α added at the TLR-induced concentration could downregulate CD36 on monocyte subpopulations. This observation agrees with reports indicating that TNF α inhibits both CD36 membrane expression and mRNA expression, and TNF α reduces the transcription of a homologous molecule to CD36 in hamster adipocytes [39].

LPS, Pam3CSK4 and FSL1 induced different degrees of CD36 downregulation, with LPS having the highest and FSL1 the lowest effect on CD14 + CD16 + cells. This gradient does not correlate with the production and TNF α secretion in the supernatants because TNF α levels in Pam3CSK4 and FSL-1 cultures were comparable. In addition, blocking the effect of TNF α with neutralizing antibodies in TLR2 ligand cultures could reverse FSL1. However, these antibodies could only partially reverse downregulation induced by Pam3CSK4 and they could not inhibit LPS-induced downregulation. As TLR4-induced CD36 downregulation was therefore not selective for TNF α , other TLR-induced factors must contribute to this phenomenon. These factors would be predominantly produced in LPS cultures. It has been shown that CD36 expression can be regulated by several cytokines. IL-1, IFN γ and TGF β can downregulate CD36 [40–42]. We did not observe significant changes after adding recombinant IL-10 to 24 and 48 h monocyte cultures. There are discordant reports about IL-10 effects on CD36 expression. CD36 mRNA transcripts were increased in lipid-laden murine macrophages treated with IL-10 [43]. On the contrary, CD36 mRNA transcripts were reduced on macrophage foam cells treated with IL-10 [44]. Differences in the monocyte/macrophage origin and experimental approach could explain these apparently contradictory observations. IL-4 or IL-13 upregulate CD36 [45,46]. This protein induction is paralleled by an increase in mRNA. IL-4 upregulates monocyte CD36 by generating an arachidonic acid metabolite that is a PPAR γ agonist [24]. It is therefore not surprising that TNF α inhibits CD36 expression via reduction of PPAR γ activation in human monocytes [39]. CD36 promoter contains a PPAR-9-cis-retinoic acid receptor complex that modulates CD36 gene expression through direct promoter interaction [47]. However, running experiments will reveal whether TLR regulates CD36 directly or indi-

rectly through a PPAR γ mechanism. We cannot rule out that recognition of ligands through TLR4 can directly downregulate CD36 expression on cell surface aside from the mediators. In this case, our observed TLR4-induced CD36 downregulation would be the final result of the direct signaling plus TNF α and/or other produced factors.

It is intriguing that CD36 expression on the CD14dim CD16++ subpopulation, also known as nonclassical monocytes, was the most sensitive to TLR ligands and TNF α . This population was unable to restore the original CD36 expression after blocking TLR-induced downregulation with neutralizing anti-TNF α antibodies. One explanation could be the distinct level of TLR expression observed during the phenotype characterization of peripheral blood monocyte subpopulations [48]. Recent microarray results suggested a lineage relationship between the three subsets, with CD14dim CD16++ monocytes as the most mature subpopulation [49]. According to this hypothesis, our results suggest that as the monocyte matures, it becomes more sensitive to TLR signals, losing rapidly the expression of scavenger receptors.

Modulating the expression of scavenger receptors on monocytes may be critical for antigen processing, scavenging and host defense against pathogens. Accordingly, some authors have observed that CD36 mediated phagocytosis of *P. falciparum* parasitized erythrocyte [50]. Our results also support this proposal because monocytes expressing significantly lower levels of CD36 phagocytosed fewer apoptotic neutrophils. One consequence of CD36 downregulation induced by TLR ligands could therefore be the impairment of bacterial clearance. Scavenger receptors can cooperate with TLR not only in apoptotic cell sensing, but also in enhancing inflammatory signals [51]. Recent reports have demonstrated that TLR-induced cytokine production (IL-6 and TNF α) was significantly reduced in CD36 deficient macrophages [52]. However, it is unclear whether CD36 signaling leads to inflammatory cytokine response. There are reports suggesting that the engagement and internalization of CD36 has blocking inflammatory consequences in primary macrophages [50]. Similar conclusions were achieved when CD36-mediated phagocytosis failed to induce cytokine secretion in primary macrophages [50]. Rather, CD36 signaling decreased the parasite induced TNF α secretion by monocytes [45].

The critical role of CD36 is not limited to host defense against pathogens. It has been implicated in a wide variety of normal and pathologic biological functions, including angiogenesis, atherosclerosis and lipid metabolism. Alterations of CD36 expression have been described on monocytes/macrophages in conditions with elevated levels of modified lipoproteins such as atherosclerosis, hyperglycemia or monocytes incubated with high glucose levels [53–57]. A new paradigm is emerging from all these results. The outcome of ligand binding to TLR must integrate the direct TLR signaling plus the functional consequences of TLR-modulated scavenger receptors. Our observations could therefore help to understand how TLR2 polymorphisms, that lead to differences in CD36 expression, have been associated with an enhanced susceptibility to skin infections in AD patients [36]. Anti-inflammatory therapeutic agents that indirectly target CD36 could additionally benefit from the modulation of CD36 expression. Characterizing the mechanisms involved in the complex regulation of CD36 may have implications for the prevention of inflammatory pathologies.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministerio Educacion y Ciencia (BFU06/15063) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (PS09/132). S.V. was supported by “Fondo Investigaciones Sanitarias” and participant in the Program for Stabilization of Investiga-

tors of the “Direcció d’Estrategia i Coordinació del Departament Salut de la Generalitat de Catalunya.”

We thank Carolyn Newey for helpful editorial assistance; and Carme Casals for confocal microscopy assistance.

This work has been performed within the Ph.D Immunology program of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

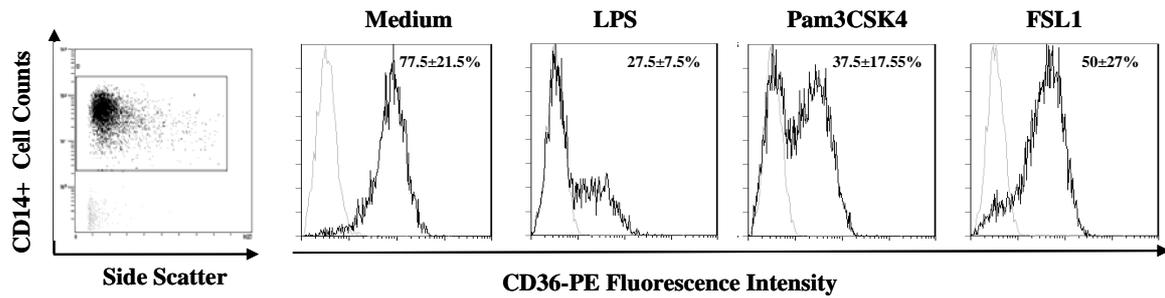
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.020>.

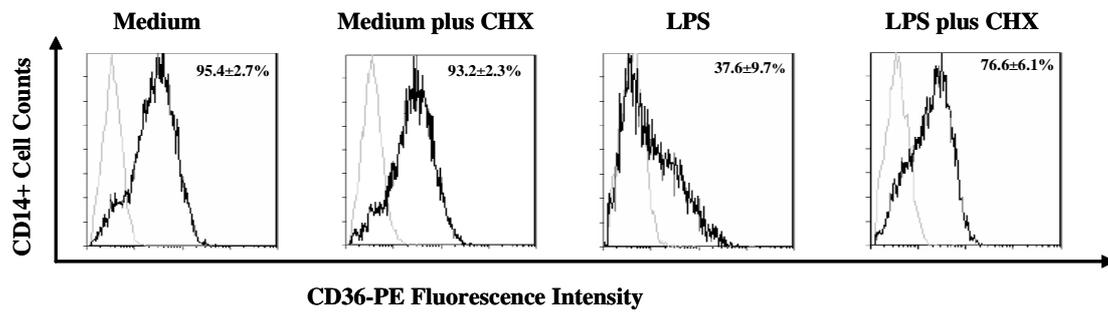
References

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783–801.
- Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 2007;147:199–207.
- Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005;140:395–407.
- Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, et al. Genetic analysis of host resistance. Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 2006;24:353–89.
- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:979–87 [quiz 88].
- Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* 2004;304:1014–8.
- Doyle SE, O’Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* 2004;199:81–90.
- Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 2005;11:653–60.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, et al. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001;291:1544–7.
- Blander JM. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiol* 2007;9:290–9.
- Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338–44.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499–511.
- Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* 2001;50:315–21.
- Weaver LK, Pioli PA, Wardwell K, Vogel SN, Guyre PM. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2007;81:663–71.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108:785–91.
- Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. Binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:269–75.
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993;268:11811–6.
- Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 1995;270:16221–4.
- Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 1995;181:1857–62.
- Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 1987;79:1054–61.
- Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* 1989;264:7576–83.
- Barnwell JW, Ockenhouse CF, Knowles 2nd DM. Monoclonal antibody OKM5 inhibits the in vitro binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to monocytes, endothelial, and C32 melanoma cells. *J Immunol* 1985;135:3494–7.
- Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 1996;87:2020–8.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, et al. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999;400:378–82.
- Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 1984;2:283–318.
- Han J, Hajjar DP, Tauras JM, Feng J, Gotto Jr AM, Nicholson AC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 2000;275:1241–6.
- Hoebel K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433:523–7.
- Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, et al. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 2005;170:477–85.
- Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol* 1998;161:6250–7.
- Cairns AP, Crockard AD, Bell AL. CD36-mediated apoptotic cell clearance in SLE. *Lupus* 2001;10:656–7.
- Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 2001;3:149–59.
- Mikolajczyk TP, Skrzeczynska-Moncznik JE, Zarebski MA, Marewicz EA, Wisniewska AM, Dzieba M, et al. Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. *Immunology* 2009;128:103–13.
- Yassin LM, Rojas M, Ramirez LA, Garcia LF, Vasquez G. Monocyte activation by apoptotic cells removal in systemic lupus erythematosus patients. *Cell Immunol* 2010;266:52–60.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74–80.
- Triantafylou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 2006;281:31002–11.
- Niebuhr M, Langnickel J, Sigel S, Werfel T. Dysregulation of CD36 upon TLR-2 stimulation in monocytes from patients with atopic dermatitis and the TLR2 R753Q polymorphism. *Exp Dermatol* 2010;19:e296–298.
- Triantafylou M, Gamper FG, Lepper PM, Mouratis MA, Schumann C, Harokopakis E, et al. Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol* 2007;9:2030–9.
- Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010;11:155–61.
- Boyer JF, Balard P, Authier H, Faucon B, Bernad J, Mazieres B, et al. Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R22.
- Draude G, Lorenz RL. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1042–8.
- Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, et al. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest* 1995;96:1859–65.
- Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 1994;15:19–26.
- Han X, Kitamoto S, Lian Q, Boisvert WA. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J Biol Chem* 2009;284:32950–8.
- Lin J, Li M, Wang Z, He S, Ma X, Li D. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation. *J Lipid Res* 51:1208–17.
- Berry A, Balard P, Coste A, Olgarnier D, Lagane C, Authier H, et al. IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation. *Eur J Immunol* 2007;37:1642–52.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79–82.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241–52.
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168:3536–42.
- Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011;118:e16–31.
- Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, Gowda DC, Grinstein S, Kain KC. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol* 2009;183:6452–9.
- Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein: a recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunology* 2005;22:551–60.
- Baranova IN, Kurlander R, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Chen Z, Remaley AT, et al. Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol* 2008;181:7147–56.
- Griffin E, Re A, Hamel N, Fu C, Bush H, McCaffrey T, et al. A link between diabetes and atherosclerosis: glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med* 2001;7:840–6.

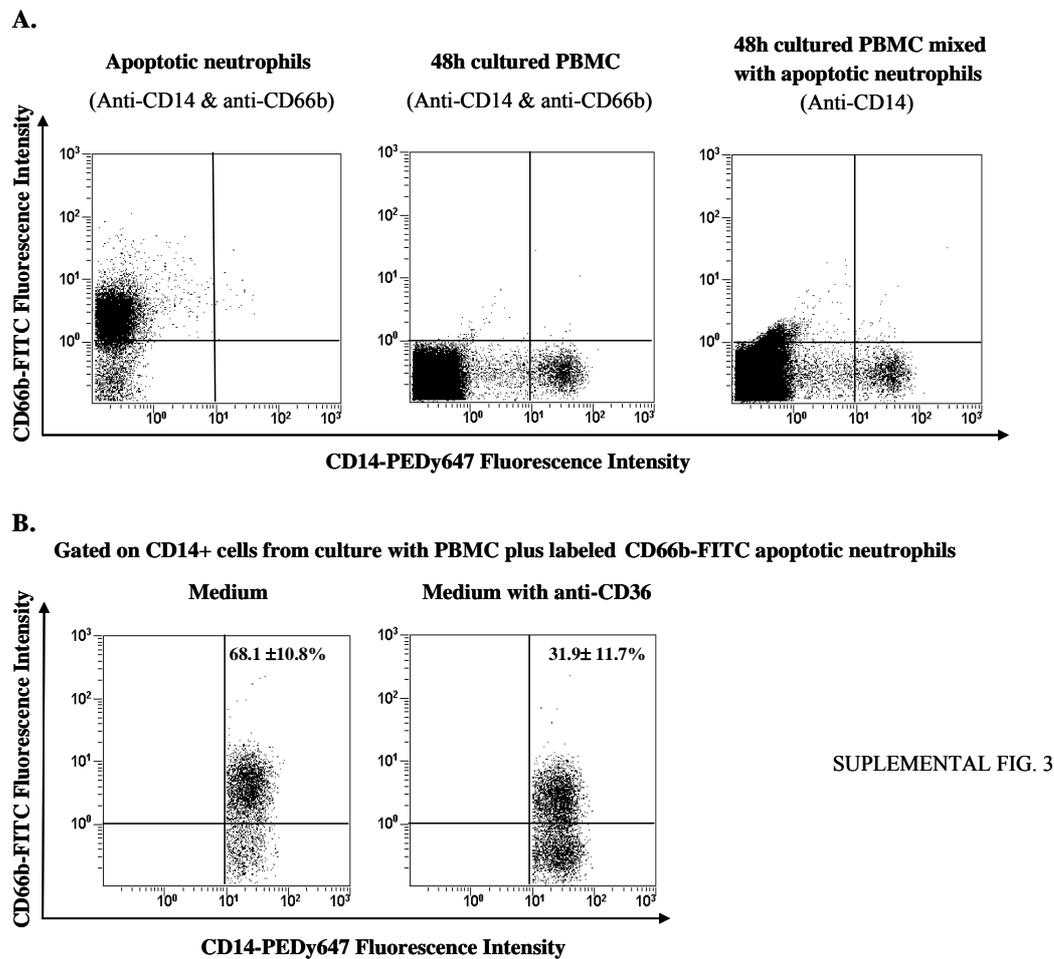
- [54] Handberg A, Levin K, Hojlund K, Beck-Nielsen H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: a novel marker of insulin resistance. *Circulation* 2006;114:1169–76.
- [55] Lamharzi N, Renard CB, Kramer F, Pennathur S, Heinecke JW, Chait A, et al. Hyperlipidemia in concert with hyperglycemia stimulates the proliferation of macrophages in atherosclerotic lesions: potential role of glucose-oxidized LDL. *Diabetes* 2004;53:3217–25.
- [56] Sampson MJ, Davies IR, Braschi S, Ivory K, Hughes DA. Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003;167:129–34.
- [57] Zhao Z, de Beer MC, Cai L, Asmis R, de Beer FC, de Villiers WJ, et al. Low-density lipoprotein from apolipoprotein E-deficient mice induces macrophage lipid accumulation in a CD36 and scavenger receptor class A-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:168–73.



Supplemental Figure 1. CD36 expression on CD14+ purified monocytes after 48h of culture with TLR4 and TLR2 ligands. Purified monocytes were cultured (1×10^6 cells/ml) with LPS (0.02 $\mu\text{g/ml}$), Pam3CSK₄ (0.1 $\mu\text{g/ml}$), FSL1 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) and medium for 48h. Purified monocytes were then recollected and stained with anti-CD14-PEDy647 and anti-CD36-PE antibodies. Expression of CD36 on CD14+ purified monocytes was analyzed by flow cytometry. A representative experiment is shown (n=2). Data correspond to mean of percentage \pm s.e.m.



Supplemental Figure 2. CD36 expression on CD14+ monocytes after 24h of culture with LPS in presence of cycloheximide. PBMC (1×10^6 cells/ml) were cultured with 1 μ g/ml cycloheximide for 1h in 5 % CO₂ at 37°C before incubation with ultrapure LPS (0.02 μ g/ml) and medium for 24h. PBMC were then recollected and stained with anti-CD14-PEDy647 and anti-CD36-PE antibodies. Expression of CD36 on CD14+ monocytes was analyzed by flow cytometry. A representative result of 3 experiments is shown. Data correspond to mean of percentage \pm s.e.m.



Supplemental Figure 3. Phagocytosis of apoptotic neutrophils after blocking CD36 on 48h cultured medium PBMC. Collected neutrophils from Ficoll pellet were cultured for 48h in medium and stained with anti-CD66b-FITC antibody. PBMC (1×10^6 cells/ml) were cultured with medium for 48h. After culturing, CD36 was blocking with 40 μ l of anti-CD36 clone CB38. (A) As internal controls to set up quadrants for positive cells: apoptotic neutrophils without PBMC were stained with anti-CD66b-FITC and anti-CD14-PEDy647 antibody, PBMC without apoptotic neutrophils were stained with anti-CD66b-FITC and anti-CD14-PEDy647 antibody and a co-culture of PBMC with unlabelled apoptotic neutrophils were stained with anti-CD14-PEDy647 antibody. (B) The phagocytosis was analyzed in 4h co-cultures of apoptotic CD66b-FITC neutrophils with PBMC (at ratio 40:1) after staining with anti-CD14-PEDy647 antibody. Monocytes that had engulfed apoptotic neutrophils were identified as CD14+ CD66b+ cells by flow cytometry. A representative experiment of monocytes phagocytosing apoptotic neutrophils is shown. Data are expressed as mean \pm s.e.m. of gated monocytes.

4.2. ARTICLE II:

Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation. Carlos Zamora, Elisabet Cantó, Juan C. Nieto, M. Angels Ortiz, Cesar Diaz-Torné, Cesar Diaz-Lopez, Josep M. Llobet, Candido Juarez, Silvia Vidal. *Journal of Leukocyte Biology* 2013 Sep; 94(3): 521-9.

Factor de impacte: 4.568. Primer quartil. Press release

FOR IMMEDIATE RELEASE

CONTACT:

Cody Mooneyhan

cmooneyhan@faseb.org

301-634-7104

CLINGY PLATELETS SUGGEST POTENTIAL TREATMENT STRATEGY FOR RHEUMATOID ARTHRITIS

New research published in the Journal of Leukocyte Biology suggests that a sub population of lymphocytes in peripheral blood carries platelets attached the surface which reduces activation and proliferation.

Bethesda, MD—No one likes clingy people, but “clingy” blood platelets may offer hope for millions of people with rheumatoid arthritis. According to new research findings published in the *Journal of Leukocyte Biology* (<https://www.jleukbio.org>), a sub population of immune cells (lymphocytes) known to play a significant role in rheumatoid arthritis has platelets attached to their surface. Those attached platelets reduced the ability of the immune cells to cause disease by reducing their activity levels and ability to spread. This opens the door to new investigations into treatments that ultimately bind platelets to lymphocytes. In addition, understanding this process may serve as a tool for better being able to predict the severity of the disease.

“We hope with this knowledge to contribute to the reduction in the chronicity of inflammatory diseases, one of the main aspects that compromise the quality of life of the patients,” said Silvia Vidal, Ph.D., a researcher involved in the work from the Department of Immunology at the Institut Recerca of the Hospital Santa Creu I Sant Pau in Barcelona, Spain.

To make this discovery, scientists found specific platelet markers on the surface of lymphocytes from peripheral blood of healthy donors by flow cytometry. Visual confirmation that these markers belonged to platelets attached to lymphocytes was achieved by confocal microscopy. In cell cultures, those lymphocytes with bound platelets were less sensitive to activation and proliferation and they produced less inflammatory mediators. Researchers analyzed the frequency of these platelet-bound lymphocytes in the peripheral blood of 20 rheumatoid arthritis patients. Associations were established between clinical parameters and activity disease scores and the frequency of platelet-bound lymphocytes.

“This report expands our understanding of how the mechanisms of inflammation operate and reveal new potential ways we can bring it under control,” said John Wherry, Ph.D., Deputy Editor of the *Journal of Leukocyte Biology*. “Defining how platelets regulate other immune cells by binding to their surface and influencing their role in inflammation, is an important step toward new platelet-based treatments to control damaging inflammatory diseases caused by many immune cells.”

The *Journal of Leukocyte Biology* (<http://www.jleukbio.org>) publishes peer-reviewed manuscripts on original investigations focusing on the cellular and molecular biology of leukocytes and on the origins, the developmental biology, biochemistry and functions of granulocytes, lymphocytes, mononuclear phagocytes and other cells involved in host defense and inflammation. The *Journal of Leukocyte Biology* is published by the Society for Leukocyte Biology.

###

Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation

Carlos Zamora,* Elisabet Cantó,* Juan C. Nieto,* M. Angels Ortiz,* Cesar Diaz-Torné,[†]
Cesar Diaz-Lopez,[†] Josep M. Llobet,[†] Candido Juarez,[‡] and Silvia Vidal*¹

*Department of Immunology, Institut Recerca, IIB-Sant Pau, Barcelona, Spain; and [†]Unit of Rheumatology and [‡]Department of Immunology, Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain

RECEIVED FEBRUARY 10, 2013; REVISED JUNE 4, 2013; ACCEPTED JUNE 4, 2013. DOI: 10.1189/jlb.0213074

ABSTRACT

Expression of the scavenger receptor CD36 on lymphocytes is intriguing. We observed that a minor subpopulation of lymphocytes expressed CD36 on the cell surface. We investigated the source of CD36 and also the proliferation and cytokine production of these CD36⁺ CD4⁺ lymphocytes. Flow cytometry analysis and immunofluorescence microscopy showed that CD36⁺ platelets were responsible for CD36 detection on lymphocytes. CD36 was then used as a tool to characterize lymphocytes with bound platelets. Activation-induced proliferation was lower in CD4⁺ lymphocytes with bound platelets than lymphocytes without bound platelets. IL-17 and IFN- γ production was also reduced in lymphocytes with bound platelets. We then studied the presence of CD36⁺ CD4⁺ lymphocytes in RA patients. We observed that the percentage of CD4⁺ lymphocytes with bound platelets was higher on RA patients than in healthy donors. RA patients with higher titers of anti-CCP, RF levels, and cardiovascular risk index presented a lower percentage of CD4⁺ lymphocytes with bound platelets. These patients also had higher IL-17 and IFN- γ production. These results suggest that platelet-binding modifies lymphocyte function. This binding could be a regulatory mechanism in RA that confers a less severe phenotype. *J. Leukoc. Biol.* 94: 521–529; 2013.

Introduction

CD36 is a transmembrane glycoprotein member of the class B scavenger receptor family. This receptor has been found on macrophages/monocytes, microglia, microvascular endothe-

lium, cardiac and skeletal muscle, adipocytes, and platelets [1]. In these cells, CD36 recognizes a wide variety of ligands that supports its scavenger role. We have recently found a minor subpopulation of lymphocytes that express CD36 (unpublished results). The presence of such a scavenger receptor on a lymphocyte is intriguing. Vallejo et al. [2] were not able to detect CD36 in T lymphocytes by Western blot. However, recent reports showed that B and $\gamma\delta$ T cells can express CD36 [3, 4]. Other authors described that after mitogenic stimulation, CD36 was up-regulated on peripheral blood lymphocytes [5].

The subpopulation of positive CD36 lymphocytes could have a characteristic function. In recent literature, the description and analysis of subpopulations provide useful markers to predict disease development or activity. Th17 lymphocytes, for instance, are involved in the pathogenesis of RA, partially through IL-17 production [6, 7]. IL-17 is highly expressed in RA synovium [8], where it contributes to angiogenesis [9]. IL-17 has also become a predictor of microvascular function and arterial compliance in RA [10]. CD161 has been described as a marker of a T lymphocyte subpopulation producing IL-17 [11]. The analysis of CD4⁺ CD161⁺ by flow cytometry on whole blood has been associated with RA disease activity [12]. Other T lymphocyte subpopulations, such as Th1, produce IFN- γ and TNF- α . These two inflammatory mediators are also associated with RA, supporting the microenvironment in the RA joint [13]. Another type of relevant cells in inflammatory diseases is the Treg, which produced IL-10, inhibits T cell expansion in vivo [14], and regulates Th1 and Th2 responses [15]. Tregs can be identified by flow cytometry based on their CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low/-} phenotype. The percentage of cells with the Treg phenotype has been associated with RA disease activity [16].

To clarify the controversy about CD36 expression on T lymphocytes and the function of the CD36⁺ cell subset, first, we analyzed whether CD36 expression was extrinsic or intrinsic to lymphocytes. Secondly, we studied the functional capability of this subpopulation, selecting T lymphocytes with this marker.

Abbreviations: anti-CCP=anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, CRP=C-reactive protein, DAS28=disease activity score, ESR=erythrocyte sedimentation rate, GMFI=geometric mean fluorescence intensity, iGMFI=integrated geometric fluorescence mean, Plt-ng=negative platelet, Plt-pos=positive platelet, PSGL-1=P-selectin glycoprotein ligand-1, RA=rheumatoid arthritis, RF=rheumatoid factor, SI=stimulation index, Treg=regulatory T cell

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

1. Correspondence: Dept. of Immunology, Institut Recerca, Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, Avda. Antoni M.Claret, 167, Barcelona-08025, Spain. E-mail: svidal@santpau.cat

Finally, we analyzed their role in autoimmune pathologies, such as RA.

MATERIALS AND METHODS

Samples and isolation of PBMCs

Whole blood from healthy donors ($n=16$) and RA patients ($n=20$) was collected in BD Vacutainer tubes (BD PharMingen, Franklin Lakes, NJ, USA), containing heparin as an anticoagulant. Diagnosis was based on the American College of Rheumatology diagnostic criteria for RA [17]. Disease activity was assessed using the DAS28-CRP [18]. The mean DAS28-CRP was 2.81 (range 1.13–5.08), and the mean disease duration was 12.6 years (range 2–40). Sixteen RA patients received methotrexate (7.5–22.5 mg), six received prednisone too (1.25–5 mg), and four RA patients received leflunomide (20 mg). We obtained clinical parameters of RA patients, CRP, and ESR. The cardiovascular risk index was calculated, according to age at the time of the study, gender, smoking history, systolic arterial blood pressure, and total serum cholesterol level [19]. Written consent was obtained, and ethical approval for the study was granted by the Institutional Ethics Committee.

Human PBMCs were isolated from peripheral blood by gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Axis-Shield, Oslo, Norway). After centrifugation, cells were collected, washed twice in PBS, and resuspended in complete medium (RPMI, supplemented with 10% FCS; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel; and 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin; BioWhittaker, Verviers, Belgium).

PBMCs and whole blood staining

PBMCs (3×10^5 cells) were washed and resuspended in 100 μ l staining buffer (PBS, supplemented with 0.5% BSA; Calbiochem Merk, Darmstadt, Germany). PBMCs were incubated with anti-CD4-PE-Cy7, -CCR5-PE, -CCR6-PE, -CCR7-FITC and HLA-DR-PE (BioLegend, San Diego, CA, USA); anti-CD8-PE-Dy647, -CD14-PE-Dy647, -CD36-FITC (Clone TR9), -CD41a-FITC, and -CD45RA-PE-Dy647 (Immunotools, Friesoythe, Germany); anti-CD3-PE-Cy7, -CD25-PE, -CD36-PE (Clone CDB38), -CD45RA-FITC, -CD45RO-FITC, -CCR4-PE, and -CXCR3-PE (BD PharMingen) mAb; and the corresponding isotype controls for 20 min in the dark. Samples were then washed with staining buffer and resuspended in PBS.

Whole blood cells (100 μ l) were incubated for 20 min at room temperature in the dark with anti-CD4-PE-Cy7, -CD8-PE-Dy647, and -CD36-FITC mAb. Red blood cells were lysed and white cell fixed using the TQ-Prep system (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) to be analyzed by flow cytometry.

Immunofluorescence microscopy analysis

To assess CD36 expression on monocyte and lymphocyte surface, PBMCs (2×10^5 cells) were stained with anti-CD3-FITC (Immunotools) or -CD14-FITC (Immunotools) with -CD36-PE (BD PharMingen) and -CD41a-PE (Immunotools) or corresponding isotype control. A drop of cells in PBS was then left to dry on a glass slide at room temperature. Expression of these markers was analyzed using Nikon Eclipse 80i microscopy.

Proliferation assay of lymphocyte

To determine CD4⁺ lymphocyte proliferation, PBMCs were labeled with CFSE (Sigma, St. Louis, MO, USA). Adjusted 10^7 cells/ml were stained with 7 μ M CFSE and incubated for 15 min at 37°C. After incubation, cells were washed with prewarmed medium and incubated for 30 min at 37°C to ensure complete modification of the probe. Cells were then washed with prewarmed medium, resuspended with complete medium at 5×10^6 cells/ml, and incubated with anti-CD3, -CD28, and -CD2 T cell activation/expansion kit for 72 h and 7 days, according to the manufacturer's instructions (Milteny Biotec, Auburn, CA, USA). After culturing, PBMCs (3×10^5 cells)

were collected and stained with anti-CD4-PE-Cy7 and -CD36-PE mAb (BD PharMingen). Cells were then washed with staining buffer and resuspended in PBS. CD4⁺ CD36⁻ and CD4⁺ CD36⁺ history cycles of proliferation were analyzed by flow cytometry.

Determination of intracellular cytokine production

PBMCs were cultured with anti-CD3, -CD28, and -CD2 T cell activation/expansion kit for 48 h, according to the manufacturer's instructions. Cytokine production on healthy controls was assessed on CD3⁺ CD36⁻ and CD3⁺ CD36⁺ cells by intracellular staining of IL-17-PE (eBioscience, San Diego CA, USA), IFN- γ -PE (BD PharMingen), IL-10-PE (eBioscience), and TNF- α -PE (BD PharMingen), using a Cytofix/Cytoperm and Perm/Wash kit from BD Biosciences. Five hours before analysis, PBMCs were cultured with PMA (50 ng/ml)/ionomycin (1 μ g/ml) in the presence of BD GolgiStop protein transport inhibitor. Cells were collected and stained. Intracellular cytokine production was analyzed on gated subpopulations by flow cytometry.

Determination of cytokine plasma levels

Plasma samples from healthy donors and RA patients were recollected and kept at -80°C until use. IL-17 (PeproTech, London, UK), TNF- α , IFN- γ , and IL-10 (BD PharMingen) levels were tested using a specific ELISA kit, according to the manufacturer's instructions. All cytokines were quantified with standard curves provided by the corresponding ELISA kit. The limits of detection were: 10 pg/ml for IL-17 and IL-10, 20 pg/ml for TNF- α , and 32 pg/ml for IFN- γ .

Flow cytometry analysis

Surface expression of CD36 and CD14 was analyzed on monocytes and lymphocytes (gated according to morphology by forward- and side-scatter parameters). Other markers were analyzed on CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells. Naïve and memory T cells were selected according to CD3⁺ CD45RA⁺ and CD3⁺ CD45RA⁻, respectively. These analyses were performed on a Beckman Coulter F500 flow cytometer. We calculated the percentages of positive cells (percent cells) and GMFI of each individual marker using EXPO 32 MultiCOMP software (Beckman Coulter). The iGMFI determines the amount of cytokines produced in each subpopulation and was calculated by multiplying the percentage of positive cytokine-producing cells by the GMFI [20].

SI in CFSE culture was measured calculating the ratio of proliferating versus nonproliferating cells [21].

Quantification of anti-CCP and RF levels

Anti-CCP were determined in plasma using UniCAP EliA (Phadia Laboratory Systems, Uppasala, Sweden), and RF was determined using the Nephelometry system (Beckman Coulter). Levels of anti-CCP and RF were expressed as ELIA units/ml and IU/ml, respectively. Anti-CCP were positive with levels >20 ELIA units/ml, and RFs were positive with levels >26 IU/ml.

Statistics

Statistical analyses were performed using the probe's *t*-test, Mann-Whitney, and Fisher exact test on Graph Pad Prism 5 software. Nonparametric correlation Spearman test was applied to the analysis. Data were presented as mean \pm SEM deviation. *P* values <0.05 were considered significant.

RESULTS

CD36 expression on lymphocytes

Most CD14⁺ monocytes from Ficoll-isolated peripheral blood expressed CD36 on their cell surface ($90.8 \pm 1.83\%$). Unexpectedly, $6.23 \pm 1.23\%$ of lymphocytes (CD14⁻) were also CD36⁺.

To rule out the possibility of unspecific staining of the mAb (Clone CB38), the analysis was repeated with another clone (TR9; $89.5 \pm 1.74\%$ on gated $CD14^+$ monocytes and $6.59 \pm 1.55\%$ on lymphocytes; Fig. 1A). Monocytes and platelets express CD36 on their surface. As lymphocytes can interact with circulating platelets [22], we speculated that the CD36 expression on lymphocytes was derived from bound $CD36^+$ platelets. Our results showed that those $CD36^+$ lymphocytes were also $CD41a^+$ (a specific marker of platelets; Fig. 1B). We observed that $CD4^+$ $CD36^+$ and $CD8^+$ $CD36^+$ lymphocytes were $CD41a^+$. Immunofluorescence microscopy finally confirmed that CD36 expression on lymphocytes was a result of bound platelets. In contrast to the whole surface CD36 staining of monocytes, the CD36 staining of the $CD36^+$ lymphocyte minority was in a small, protruding area of the surface. The image was compatible with a platelet bound to a lymphocyte. A comparable image was observed staining with $CD41a^+$. These observations confirmed that the source of this marker is the presence of platelets bound to lymphocytes (Fig. 1C). We observed that stoichiometry between platelet and T cells was 1 to 1 in the majority of cells (73%).

We next analyzed CD36 expression on $CD4^+$ and $CD8^+$ cells from whole blood. We observed a comparable CD36 expression on $CD4^+$ and $CD8^+$ cells from whole blood and Ficoll-isolated mononuclear cells (data not shown). This result confirms that the binding between lymphocytes and platelets was neither a separation artifact nor dependent on the proportion of platelets per lymphocyte. CD36 expression on lympho-

cytes was then a convenient marker to study lymphocytes with bound platelets.

Phenotyping of CD3-naive and CD3-memory lymphocytes with bound platelets

We first investigated whether the presence of bound platelets on naïve and memory lymphocytes is restricted to a characteristic phenotype. The percentage of naïve $CD3^+$ lymphocytes with bound platelets was not different from memory $CD3^+$ lymphocytes without platelets (naïve $CD3^+$: 61.1 ± 3.33 of Plt-ng vs. 55.4 ± 6.05 of Plt-pos; memory $CD3^+$: 38.9 ± 5.29 of Plt-ng vs. 44.6 ± 6.37 of Plt-pos). A significant higher percentage of $CXCR3^+$ and $CCR4^+$ cells was observed in the naïve $CD3^+$ cells with platelets than in naïve $CD3^+$ cells without platelets ($CCR4$: 2.33 ± 0.53 of Plt-ng vs. 4.71 ± 0.85 of Plt-pos, $P=0.02$; $CXCR3$: 8.81 ± 1.93 of Plt-ng vs. 13.98 ± 3.47 of Plt-pos, $P=0.04$). In contrast, a significantly higher percentage of $CD25^+$, $CCR5^+$, $CCR4^+$, and $HLA-DR^+$ cells was observed in memory $CD3^+$ cells with bound platelets than in memory $CD3^+$ without platelets ($CD25$: 3.43 ± 0.65 of Plt-ng vs. 7.47 ± 1.61 of Plt-pos, $P=0.01$; $HLA-DR$: 1.98 ± 0.23 of Plt-ng vs. 4.83 ± 0.55 of Plt-pos, $P=0.01$) and chemokine receptor $CCR5$ (32.4 ± 3.05 of Plt-ng vs. 44.11 ± 4.69 of Plt-pos, $P=0.005$) and $CCR4$ (15.37 ± 2.24 of Plt-ng vs. 20.86 ± 3.04 of Plt-pos, $P=0.04$; Table 1).

We next evaluated whether the presence of bound platelets was associated to Th1 ($CCR5$ and $CXCR3$) or Th2 ($CCR4$) markers. Significantly higher percentages of $CCR5^+$ were observed in the $CD4^+$ cells with bound platelets than in $CD4^+$ cells without platelets, suggesting that platelets are predominantly bound to

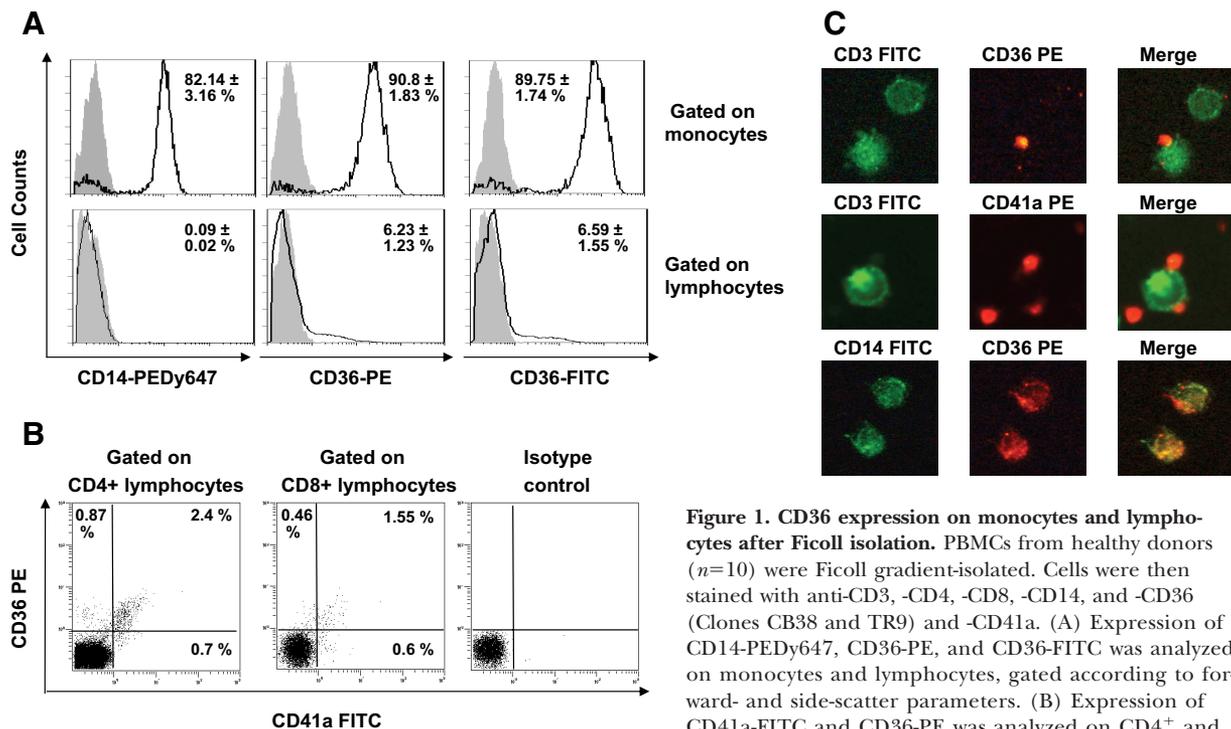


Figure 1. CD36 expression on monocytes and lymphocytes after Ficoll isolation. PBMCs from healthy donors ($n=10$) were Ficoll gradient-isolated. Cells were then stained with anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD14, and -CD36 (Clones CB38 and TR9) and -CD41a. (A) Expression of CD14-PEDy647, CD36-PE, and CD36-FITC was analyzed on monocytes and lymphocytes, gated according to forward- and side-scatter parameters. (B) Expression of CD41a-FITC and CD36-PE was analyzed on $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes by flow cytometry, gated on $CD3^+$ lymphocytes. (C) CD36 expression was analyzed on $CD3^+$ and $CD14^+$ cells and CD41a on $CD3^+$ cells using fluorescence microscopy. A representative experiment is shown. Data are expressed as percentage \pm SEM of analyzed marker.

TABLE 1. Phenotyping of CD3-naive and CD3-Memory Lymphocytes with Bound Platelets

Marker	CD3 naive ^a		P value	CD3 memory ^b		P value
	Plt-ng	Plt-pos		Plt-ng	Plt-pos	
	Mean ± SEM	Mean ± SEM		Mean ± SEM	Mean ± SEM	
CD25	0.86 ± 0.34	0.79 ± 0.24	0.86	3.43 ± 0.65	7.47 ± 1.61	0.01
CCR5	10.48 ± 1.76	17.16 ± 4.36	0.22	32.4 ± 3.05	44.11 ± 4.69	0.005
CCR6	4.06 ± 1.14	4.92 ± 1.01	0.28	35.42 ± 7.44	32.37 ± 6.53	0.09
CXCR3	8.81 ± 1.93	13.98 ± 3.47	0.04	35.32 ± 6.76	34.97 ± 6.96	0.86
CCR4	2.33 ± 0.53	4.71 ± 0.85	0.02	15.37 ± 2.24	20.86 ± 3.04	0.04
HLA-DR	1.11 ± 0.55	2.63 ± 1.06	0.08	1.98 ± 0.23	4.83 ± 0.55	0.01

^aPercentage of each marker in the CD3⁺ naive cells, with or without platelets (n=5). ^bPercentage of each marker in the CD3⁺ memory, with or without platelets (n=5). P value was calculated with Mann-Whitney test.

cells expressing certain Th1 markers (CCR5: 11.99±1.01 of Plt-ng vs.21.59±1.81 of Plt-pos, P=0.0004; CXCR3: 20.44±2.09 of Plt-ng vs.25.76±2.74 of Plt-pos, P=0.14).

We finally observed no differences in the percentage of naive, effector, and central memory in CD4⁺ T cells, with or without platelets (data not shown).

Reduced TCR-induced proliferation of CD4⁺ Plt-pos lymphocytes

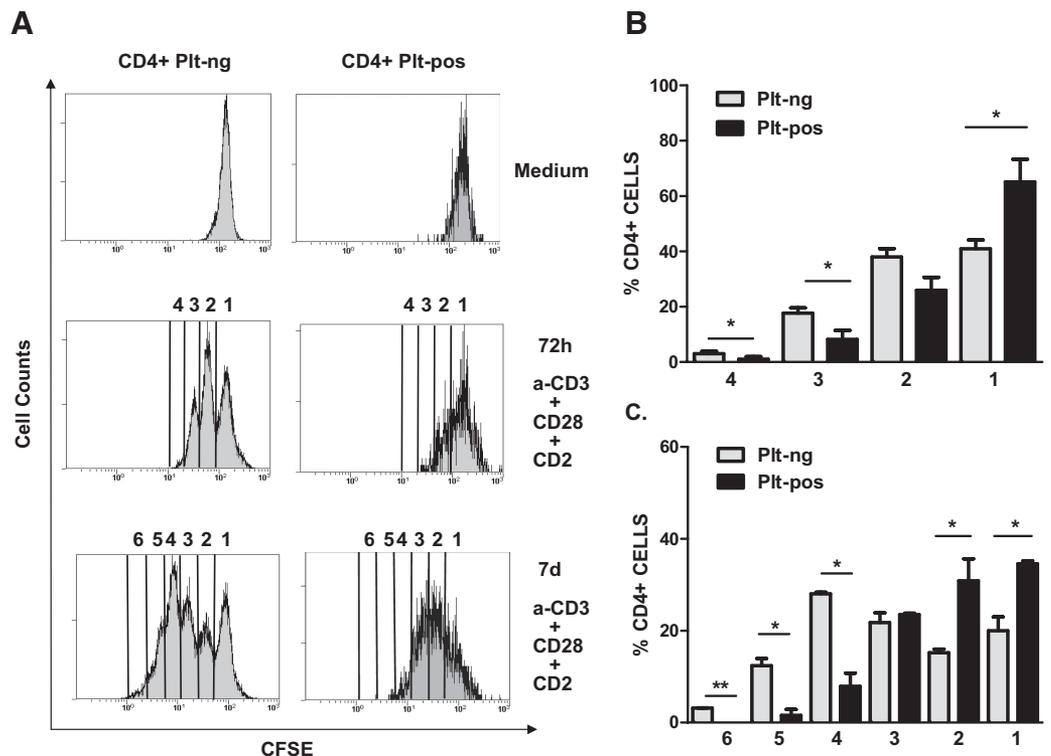
We compared the TCR-induced proliferation of CD4⁺ Plt-pos and CD4⁺ Plt-ng cells. PBMCs from healthy donors were labeled with CFSE and stimulated with anti-CD3, -CD28, and -CD2 T cell activation/expansion for 72 h and 7 days (Fig. 2). After 72 h and 7 days of culture, we observed that fewer CD4⁺ Plt-pos than CD4⁺ Plt-ng lymphocytes reached a higher num-

ber of proliferation cycles (72 h, Cycle 3: 8.18±3.24% of CD4⁺ Plt-pos vs.17.67±1.89% of CD4⁺ Plt-ng, P<0.05; 7 days, Cycle 4: 7.87±2.9% of CD4⁺ Plt-pos vs.28±0.33% of CD4⁺ Plt-ng, P<0.05; Fig. 2B and C). SI was also calculated in CD4⁺ Plt-ng and CD4⁺ Plt-pos. CD4⁺ with platelets had a lower SI than CD4⁺ without platelets (72 h: 1.49±0.17 for CD4⁺ Plt-ng vs.0.55±0.17 for CD4⁺ Plt-pos, P<0.01; 7 days: 4.22±0.37 for CD4⁺ Plt-ng vs.1.74±0.05 for CD4⁺ Plt-pos, P<0.01; Supplemental Fig. 1). The binding of platelets to lymphocytes can therefore reduce the proliferation capacity of the CD4⁺ cells.

Binding of platelets modified the cytokine production of CD3⁺ lymphocytes

PBMCs from healthy donors were stimulated with an anti-CD3, -CD28, and -CD2 T cell activation/expansion kit for 48 h. Five

Figure 2. Influence of binding platelet to CD4⁺ lymphocytes on activation-induced proliferation. PBMCs from healthy donors were labeled with 7 μM CFSE. PBMCs were then cultured with anti-CD3 plus CD2 and CD28 or medium for 72 h and 7 days. After culturing, PBMCs were collected and stained with anti-CD4-PE-Cy7 and -CD36-PE. (A) Representative experiment of history proliferation cycles on CD4⁺ Plt-ng and CD4⁺ Plt-pos cells after 72 h and 7 days. Bar graphs show percentage of cells in each proliferation cycle after 72 h (B) and (C) 7 days of culture with anti-CD3 plus CD2 and CD28 on CD4⁺ Plt-ng and CD4⁺ Plt-pos cells (n=5). Mann-Whitney test was used for statistical analysis. *P < 0.05; **P < 0.01.



hours before cytokine production analysis, PMA/ionomycin and a BD GolgiStop protein transport inhibitor were added to the lymphocyte culture. We then compared the intracellular cytokine production of CD3⁺ Plt-pos and CD3⁺ Plt-ng lymphocytes.

Although there were no differences in the percentage of cells producing IL-17, IFN- γ , IL-10, and TNF- α , binding platelets modified the amount of cytokine levels in lymphocytes (iGMFI). CD3⁺ Plt-ng cells expressed higher levels of IL-17 and IFN- γ than CD3⁺ Plt-pos cells (iGMFI IL-17: 67.94 \pm 25.89 in CD3⁺ Plt-ng vs. 19.5 \pm 10.73 in CD3⁺ Plt-pos, $P < 0.05$; iGMFI IFN- γ : 340 \pm 97.53 in CD3⁺ Plt-ng vs. 172 \pm 57.66 in CD3⁺ Plt-pos, $P < 0.05$). No differences were observed in IL-10 or TNF- α levels between the two lymphocyte populations (iGMFI IL-10: 1.36 \pm 0.49 on CD3⁺ Plt-ng vs. 8.54 \pm 3.62 on CD3⁺ Plt-pos; iGMFI TNF- α : 245 \pm 137.1 on CD3⁺ Plt-ng vs. 153 \pm 35.34 on CD3⁺ Plt-pos; **Fig. 3**). These results suggest that the binding of platelets decreased the production of Th1 and Th17 cytokines.

CD4⁺ Plt-pos and cytokine plasma levels from healthy donors and RA patients

Activation molecule P-selectin has a significantly higher expression on platelets from active RA patients than from remission RA patients or healthy donors [23]. P-Selectin can bind to its ligand PSGL-1 expressed on leukocytes [24, 25]. We observed that platelets, bound to lymphocytes in RA patients, present higher levels of P-selectin than healthy donors (37.11 \pm 6.18% for RA patients vs. 13.35 \pm 1.76% for healthy donors $P < 0.05$; data not shown). We then compared the percentage of T lymphocytes with bound platelets in the peripheral blood of RA patients and healthy donors. The percentage of CD8⁺ Plt-pos was similar in healthy donors and RA patients (data not shown). However, the percentage of CD4⁺ Plt-pos in RA patients was significantly higher than in healthy donors (7.81 \pm 0.84 and 4.46 \pm 0.51, respectively, $P < 0.01$). According to the CD4⁺ Plt-pos percentage, we distinguished two groups of RA patients. One group (Group H) presented a higher CD4⁺ Plt-pos percentage (10.61 \pm 0.68) than healthy donors. The other group (Group L) presented CD4⁺ Plt-pos levels (3.79 \pm 0.44) compared with healthy donors (4.46 \pm 0.51; **Fig. 4A and B**). Clinical and laboratory parameters were compared between these two groups of RA patients (Supplemental Table 1). Cardiovascular

risk index was significantly different between these groups. Plasma IL-17 and IFN- γ levels in Group L of RA patients presented higher plasma levels of IL-17 (189.7 \pm 70.83 pg/ml) and IFN- γ (147.3 \pm 36.7 pg/ml) than healthy donors and Group H RA patients (IL-17: 38.28 \pm 18.24 pg/ml for healthy donors and 51.13 \pm 11.26 pg/ml for Group H RA patients, $P < 0.05$; IFN- γ : 43.25 \pm 20.33 pg/ml for healthy donors and 67.76 \pm 15.55 pg/ml for Group H RA patients, $P < 0.05$). These results suggest that increased levels of CD4⁺ lymphocytes with bound platelets have a regulatory effect in the excessive Th1 and Th17 cytokine levels of RA patients. We did not observe a significant correlation between the proportion of CD4⁺ Plt-pos with serum levels of cytokines in healthy donors. However, a negative correlation was observed between CD4⁺ Plt-pos and IFN- γ in RA patients ($r = -0.47$, $P < 0.05$).

Percentage of CD4⁺ Plt-pos lymphocytes in RA patients segregated according to clinical parameters

We analyzed the association among CD4⁺ Plt-pos and antibody levels and clinical parameters in RA patients (anti-CCP, RF, CRP, ESR, DAS28, and score cardiovascular risk index). Negative or moderate-to-low anti-CCP titer (<340) RA patients showed a higher percentage of CD4⁺ Plt-pos than high anti-CCP titer RA patients (10.01 \pm 0.93 for titers <20; 9.98 \pm 1.72 for 20–340 titers; and 5.64 \pm 0.64 for titers >340, $P < 0.05$; **Fig. 5A**). With the use of a rank-based correlation, anti-CCP correlated inversely with CD4⁺ Plt-pos ($r = -0.443$, $P = 0.05$). RA patients with lower RF levels (<26) showed a higher percentage of CD4⁺ Plt-pos than RA patients with RF levels >160 (10.08 \pm 1.42 and 5.49 \pm 1.11, respectively, $P < 0.05$; **Fig. 5B**). RA patients with lower CRP levels (≤ 10 mg/l) showed a higher percentage of CD4⁺ Plt-pos than RA patients with CRP >10 mg/l (9.74 \pm 1.5 and 4.19 \pm 0.54, respectively, $P < 0.05$; **Fig. 5C**). No differences in CD4⁺ Plt-pos percentages were observed when patients were segregated according to ESR levels and DAS28 (**Fig. 5D and E**). RA patients with a lower cardiovascular risk index (≤ 3) presented a higher percentage of CD4⁺ Plt-pos lymphocytes than patients with higher cardiovascular risk index (>5; 9.01 \pm 1.16 and 3.84 \pm 0.58, respectively, $P < 0.05$). CD4⁺ Plt-pos in RA patients, segregated according to medication, was not significantly different (data not shown).

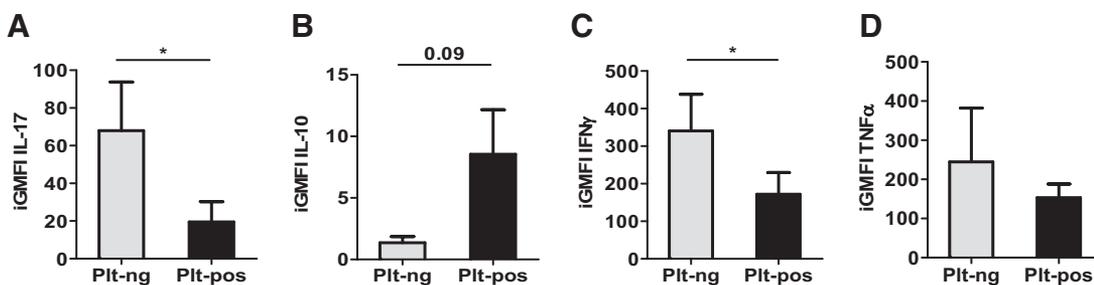
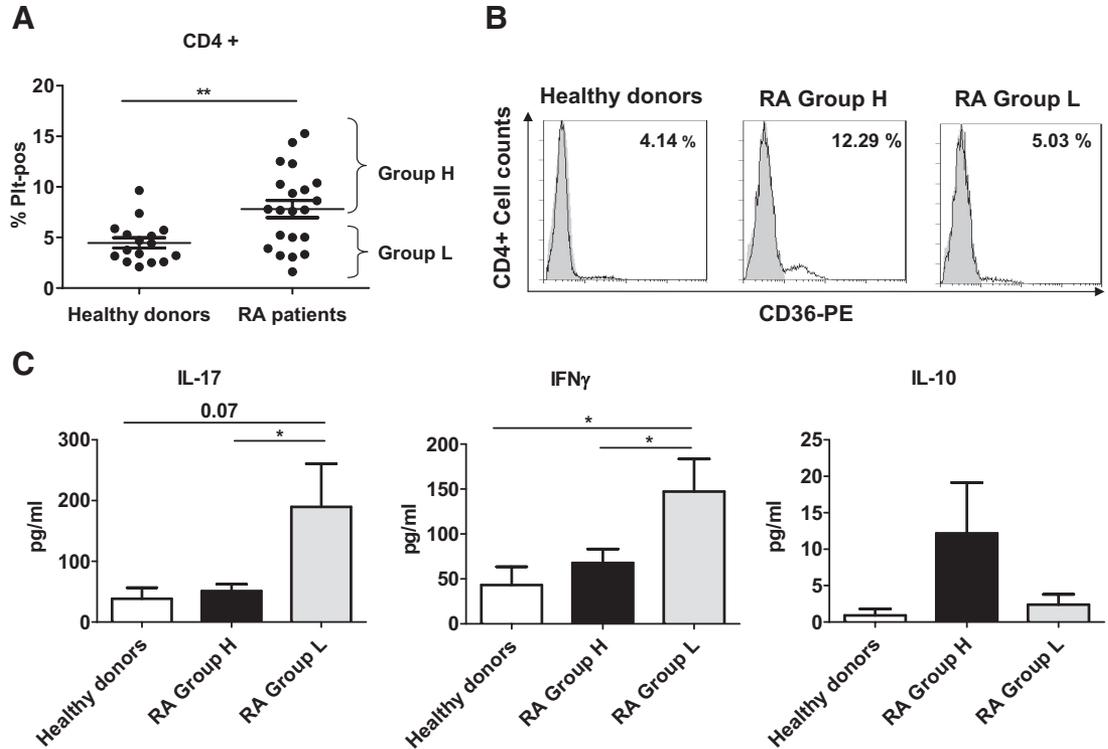


Figure 3. Influence of binding platelet to CD3⁺ lymphocytes on cytokine production. PBMCs from healthy donors were cultured with anti-CD3 plus CD2 and CD28 or medium. After 48 h, cells were cultured with PMA (50 ng/ml)/ionomycin (1 μ g/ml) in the presence of BD GolgiStop protein transport

inhibitor for 5 h before analysis of cytokine production. (A) IL-17, (B) IL-10, (C) IFN- γ , and (D) TNF- α iGMFI production cells were calculated, gating on CD3⁺ Plt-ng and CD3⁺ Plt-pos lymphocytes ($n = 5$). Data are expressed as iGMFI \pm SEM. Mann-Whitney test was used for statistical analysis. * $P < 0.05$.

Figure 4. CD4⁺ Plt-pos and cytokine plasma levels in RA patients. PBMCs from healthy donors and RA patients were stained with anti-CD4-PE-Cy7 and CD36-PE. (A) Graph shows percentage of Plt-pos \pm SEM on CD4⁺ lymphocytes from healthy donors ($n=16$) and RA patients ($n=20$). (B) Representative experiment of CD36 expression on CD4⁺ lymphocytes from healthy controls and Groups H and L RA patients. (C) Bar graph showing IL-17, IFN- γ , and IL-10 plasma levels from healthy donors and RA patients (pg/ml). *t*-Test was used for statistical analysis. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



DISCUSSION

Our results demonstrated that the CD36 expression on lymphocytes was derived from bound platelets. Platelet binding reduced the capability of lymphocytes to proliferate and to produce Th1/Th17 cytokines. Less IL-17, IFN- γ , and cardiovascular risk was observed in a group of RA patients with a higher percentage of CD4⁺ cells with bound platelets.

Vallejo et al. [2] demonstrated that T lymphocytes do not express CD36. However, other reports described a subpopu-

lation of B, T, and NK lymphocytes expressing CD36 [3, 4]. Some authors have already suggested the presence of platelet-leukocyte complexes [26, 27]. Accordingly, we observed that these platelets were the source of the unexpected CD36 expression on this subpopulation of lymphocytes. We were able to finally confirm this result by microscopy. The presence of CD36 on lymphocytes was not a result of trogocytosis of membrane chunks of APCs, as platelet-bound lymphocytes also expressed CD41a, a specific marker of platelets,

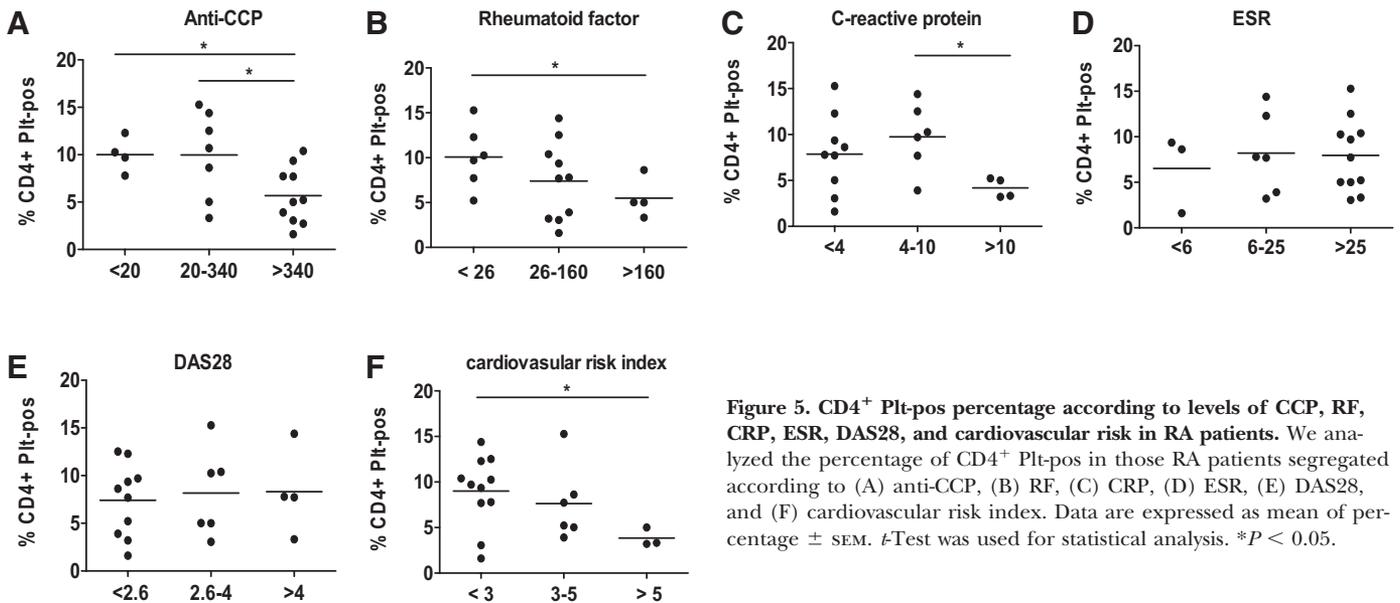


Figure 5. CD4⁺ Plt-pos percentage according to levels of CCP, RF, CRP, ESR, DAS28, and cardiovascular risk in RA patients. We analyzed the percentage of CD4⁺ Plt-pos in those RA patients segregated according to (A) anti-CCP, (B) RF, (C) CRP, (D) ESR, (E) DAS28, and (F) cardiovascular risk index. Data are expressed as mean of percentage \pm SEM. *t*-Test was used for statistical analysis. * $P < 0.05$.

absent on APCs. Most of the CD36⁺ lymphocytes had one bound platelet (73%). Undergoing analysis of bound-platelet characteristics will provide some explanation to this stoichiometry.

Staining lymphocytes with anti-CD36 antibodies proved to be a good tool to analyze the functional consequences of platelet binding. Significant phenotype differences were observed between CD3⁺ Plt-pos and CD3⁺ Plt-ng in naïve and memory T cells. CD3⁺ Plt-pos memory cells present a higher expression of DR⁺, CD25⁺, CCR5⁺, and CCR4⁺, whereas CD3⁺ Plt-pos naïve present a higher expression of CXCR3⁺ and CCR4⁺. We are currently analyzing a predominant subpopulation of CCR5⁺ CD4⁺ T lymphocytes among those with bound platelets.

Multiple ligands could be involved in this platelet-lymphocyte binding. P-selectin (CD62P), on activated platelets, can bind to its ligand PSGL-1 (CD162), expressed on most leukocytes [25]. GPIb-CD11b [28] and GPIIb/IIIa-CD11/CD18 [29] could also be involved in platelet-leukocyte binding. It has been shown that platelet-lymphocyte binding, initiated by platelet activation, can be abolished by P-selectin blockade and reduced by inhibition of GPIIb/IIIa, CD11b, or CD40 ligand [22]. We have found that <15% of platelets bound to lymphocytes are P-selectin-positive, and this seems contradictory. However, we cannot rule out that bound platelets were activated when bound to lymphocytes, and then, CD62P was released for the surface of platelets as a result of shedding of this molecule [30].

Only 3% of circulating lymphocytes carried bound platelets. This low percentage could be a result of the binding of few free-activated platelets on circulation [27]. Accordingly, *in vitro* activation of platelets increases the lymphocyte-platelet binding (12% for Th lymphocytes and 15% by cytotoxic T lymphocytes) [22]. Activation of T lymphocytes also increases the binding of platelets [22], probably as activation up-regulates PSGL-1 expression. This up-regulation could explain the superior capacity of platelet binding by activated lymphocytes [24]. Accordingly, we could speculate that a higher percentage of CCR5⁺ CD4⁺ lymphocytes has bound platelets, as they express more PSGL-1. Previous reports with juvenile idiopathic arthritis patients showed that CCR5⁺ CD4⁺ lymphocytes from synovial fluid have higher PSGL-1 expression than CCR4⁺ and CXCR3⁺ CD4⁺ lymphocytes [31].

After activation, lymphocytes with bound platelets have a reduced proliferation and IFN- γ and IL-17 production. Previous reports showed that coculture with activated platelets reduces the activation-induced proliferation of lymphocytes [32, 33] and IL-2 and IL-6 release [33]. However, other authors have shown that coculturing activated platelets with lymphocytes increases the release of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 [32]. These reports suggest that soluble molecules released by platelets could be activating or inhibiting factors [34]. One of these molecules, PF4, was able to modulate Tregs and non-Tregs but in opposite manners. PF4 inhibits non-Treg proliferation and also reduced the ability of Treg to inhibit non-Treg proliferation [35]. In our system, we cannot exclude the presence of inhibitory soluble factors

released by activated platelets. However, the inhibitory effects were more evident in lymphocytes with bound platelets. Furthermore, our experiments were performed with isolated PBMCs after eliminating most free platelets through the Ficoll gradient.

Our results suggest that platelet binding to lymphocytes could be relevant in the pathology of inflammatory diseases. We distinguished two groups of RA patients, according to the percentage of CD4⁺ Plt-pos. One group with CD4⁺ Plt-pos was comparable with healthy donors, and the other group had a higher CD4⁺ Plt-pos percentage. This was not surprising, as platelets in active RA patients show higher expression of P-selectin than those in remission or healthy controls [23], observing in our experiment that platelets bound to lymphocyte in RA patients present a higher percentage of activated platelet than healthy donors. The plasma levels of IL-17 and IFN- γ were significantly higher in patients with a normal CD4⁺ Plt percentage. This result was not observed in patients with a higher CD4⁺ Plt-pos percentage, concordant with the lower production of IL-17 and IFN- γ by lymphocytes with bound platelets. It has been described that RA pathology is caused partially by an increased Th1/Th17 response, with high levels of inflammatory cytokines on serum [36, 37]. We suggest that binding of platelets could then be a regulatory mechanism to correct the altered production of inflammatory cytokines in RA patients.

RA patients with the highest levels of CRP, RF, and anti-CCP are those with the lowest CD4⁺ Plt-pos levels. Binding of platelets to CD4⁺ lymphocytes might therefore be associated with a less-severe phenotype of RA disease. These results are intriguing, as platelets have been shown to participate in the pathogenesis of RA and atherogenesis, a complication of RA [38]. Free-activated platelets shed vesicles called microparticles; during inflammatory arthritis, these microparticles are abundant in synovial fluid and can exacerbate inflammation via IL-1. This cytokine can promote release of inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-8 [39]. Moreover, platelets also produce PGs. PGI₂ is increased in synovial fluid from the joints of RA patients and contributes to arthritis in animal models [40].

Patients with the highest cardiovascular risk also had the lowest levels of CD4⁺ Plt-pos. However, it has been described that platelets are associated with cardiovascular risk. CD62P levels on platelets increase in cardiovascular ischemia associated with atherosclerotic complications [41, 42]. This apparent contradiction could be explained by a different function between free- and bound-activated platelets. We should also consider other factors apparently unrelated to platelets, such as anti-CCP and IL-17, which contribute to the development of endothelial dysfunction and cardiovascular disease [10, 43]. In these cases, our patients with the highest levels of CD4⁺ Plt-pos could have had a lower cardiovascular risk, as they had a lower production of IL-17 and anti-CCP.

Further experiments are needed to decipher the mechanisms of platelet binding and determine how and when these platelets can regulate lymphocyte functions. Similarly, we need to study the influence of platelets on other subpopulations.

Ongoing experiments will describe whether this mechanism is RA-specific or whether it could be extended to other inflammatory pathologies. The platelet-lymphocyte interaction could open new, therapeutic approaches to regulate the chronic inflammation.

AUTHORSHIP

C.Z. performed flow cytometry, ELISAs, cell culture, data analysis, and the manuscript preparation. E.C. and J.C.N. performed flow cytometry. M.A.O. worked on the ELISAs. C.D-T., C.D-L., and J.M.L. completed the collection of samples and clinical parameters. C.J. analyzed the results. S.V. analyzed the results, conceived of and designed the paper, and prepared the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Ministerio Educacion y Ciencia (BFU06/15063) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (PS09/132). S.V. was supported by “Fondo Investigaciones Sanitarias” and was a participant in the Program for Stabilization of Investigators of the “Direcció d’Estrategia i Coordinació del Departament Salut de la Generalitat de Catalunya”. This work has been performed within the Ph.D. Immunology Program of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). We thank Carolyn Newey for helpful editorial assistance and Ignasi Gich for his statistical assistance.

DISCLOSURES

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest associated with this study.

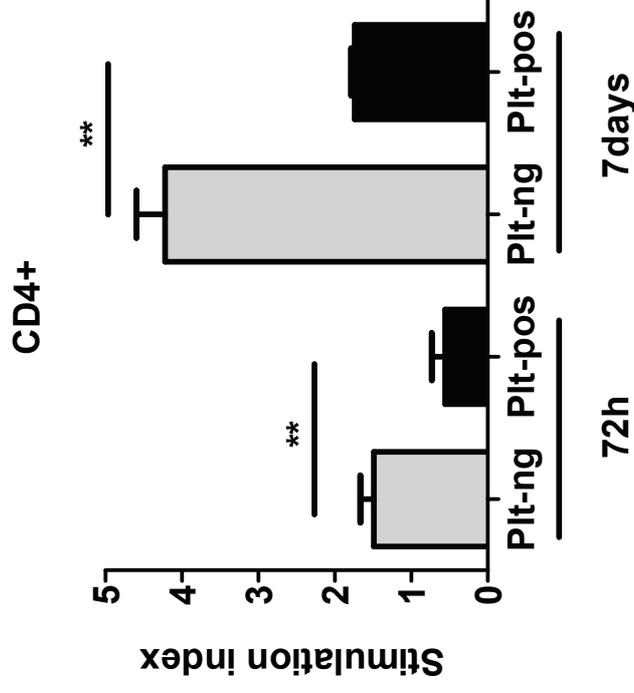
REFERENCES

- Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **108**, 785–791.
- Vallejo, A. N., Muggé, L. O., Klimiuk, P. A., Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (2000) Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *J. Immunol.* **164**, 2947–2954.
- McDonnell, M., Liang, Y., Noronha, A., Coukos, J., Kasper, D. L., Far-raye, F. A., Ganley-Leal, L. M. (2011) Systemic Toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 298–307.
- Lubick, K., Jutila, M. A. (2006) LTA recognition by bovine $\gamma\delta$ T cells involves CD36. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1268–1270.
- Tassone, P., Tuccillo, F., Gao, W., Korn, T., Strom, M. C., Cecco, L., Cerra, M., Bond, H. M., Barbieri, V., Venuta, S. (1998) CD36 is rapidly and transiently upregulated on phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood lymphocytes. Analysis by a new monoclonal antibody (UN7). *Tissue Antigens* **51**, 671–675.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Weaver, C. T. (2005) Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., Kuchroo, V. K. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., Martin, T. J., Suda, T. (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* **103**, 1345–1352.
- Pickens, S. R., Volin, M. V., Mandelin II, A. M., Kolls, J. K., Pope, R. M., Shahrara, S. (2010) IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **184**, 3233–3241.
- Marder, W., Khalatbari, S., Myles, J. D., Hench, R., Yalavarthi, S., Lustig, S., Brook, R., Kaplan, M. J. (2011) Interleukin 17 as a novel predictor of vascular function in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1550–1555.
- Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S. Q., Querci, V., Fambrini, M., Liotta, F., Levings, M. K., Maggi, E., Cosmi, L., Romagnani, S., Annunziato, F. (2010) CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2174–2181.
- Chalan, P., Abdulahad, W., Huitema, M. G., Kroesen, B. J., Brouwer, E., Boots, A. M. (2011) Rheumatoid arthritis patients shown a decline in peripheral blood CD4⁺CD161⁺T lymphocytes. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, A6.
- Ruschpler, P., Stiehl, P. (2002) Shift in Th1 (IL-2 and IFN- γ) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokine mRNA balance within two new histological main-types of rheumatoid-arthritis (RA). *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **48**, 285–293.
- Sundstedt, A., O’Neill, E. J., Nicolson, K. S., Wraith, D. C. (2003) Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *J. Immunol.* **170**, 1240–1248.
- Xu, D., Liu, H., Komai-Koma, M., Campbell, C., McSharry, C., Alexander, J., Liew, F. Y. (2003) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells *Leishmania major* infection, and colitis in mice. *J. Immunol.* **170**, 394–399.
- Kawashiri, S. Y., Kawakami, A., Okada, A., Koga, T., Tamai, M., Yamasaki, S., Nakamura, H., Origuchi, T., Ida, H., Eguchi, K. (2011) CD4⁺CD25⁺(high)CD127⁺(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **38**, 2517–2521.
- Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H., Luthra, H. S., et al. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31**, 315–324.
- Aletaha, D., Smolen, J. S. (2006) The definition and measurement of disease modification in inflammatory rheumatic diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **32**, 9–44.
- Conroy, R. M., Pyorala, K., Fitzgerald, A. P., Sans, S., Menotti, A., De Backer, G., De Bacquer, D., Ducimetiere, P., Jousilahti, P., Keil, U., Njolstad, I., Oganov, R. G., Thomsen, T., Tunstall-Pedoe, H., Tverdal, A., Wedel, H., Whincup, P., Wilhelmsen, L., Graham, I. M. (2003) Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur. Heart J.* **24**, 987–1003.
- Darrah, P. A., Patel, D. T., De Luca, P. M., Lindsay, R. W., Davey, D. F., Flynn, B. J., Hoff, S. T., Andersen, P., Reed, S. G., Morris, S. L., Roederer, M., Seder, R. A. (2007) Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat. Med.* **13**, 843–850.
- Milovanova, T. N. (2007) Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. *Cytometry B Clin. Cytom.* **72**, 265–275.
- Li, N., Ji, Q., Hjelm Dahl, P. (2006) Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 874–881.
- Wang, F., Wang, N. S., Yan, C. G., Li, J. H., Tang, L. Q. (2007) The significance of platelet activation in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **26**, 768–771.
- Moore, K. L., Stults, N. L., Diaz, S., Smith, D. F., Cummings, R. D., Varki, A., McEver, R. P. (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* **118**, 445–456.
- Furie, B., Furie, B. C. (1995) The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb. Haemost.* **74**, 224–227.
- Furman, M. I., Benoit, S. E., Barnard, M. R., Valeri, C. R., Borbone, M. L., Becker, R. C., Hechtman, H. B., Michelson, A. D. (1998) Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**, 352–358.
- Joseph, J. E., Harrison, P., Mackie, I. J., Isenberg, D. A., Machin, S. J. (2001) Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br. J. Haematol.* **115**, 451–459.
- Simon, D. I., Chen, Z., Xu, H., Li, C. Q., Dong, J., McIntire, L. V., Ballyntyne, C. M., Zhang, L., Furman, M. I., Berndt, M. C., Lopez, J. A. (2000) Platelet glycoprotein Iba is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **192**, 193–204.
- Silverstein, R. L., Asch, A. S., Nachman, R. L. (1989) Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.* **84**, 546–552.
- Dole, V. S., Bergmeier, W., Patten, I. S., Hirahashi, J., Mayadas, T. N., Wagner, D. D. (2007) PSGL-1 regulates platelet P-selectin-mediated endothelial activation and shedding of P-selectin from activated platelets. *Thromb. Haemost.* **98**, 806–812.
- Issekutz, A. C., Quinn, P. J., Lang, B., Ramsey, S., Huber, A. M., Rowter, D., Karkada, M., Issekutz, T. B. (2011) Coexpression of chemokine receptors CCR5, CXCR3, and CCR4 and ligands for P- and E-selectin on T

- lymphocytes of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* **63**, 3467–3476.
32. Gerdes, N., Zhu, L., Ersoy, M., Hermansson, A., Hjemdahl, P., Hu, H., Hansson, G. K., Li, N. (2011) Platelets regulate CD4(+) T-cell differentiation via multiple chemokines in humans. *Thromb. Haemost.* **106**, 353–362.
 33. Wang, Y., Niu, J. (2008) Platelets inhibit in vitro response of lymphocytes to mitogens. *Immunol. Lett.* **119**, 57–61.
 34. Fleischer, J., Grage-Griebenow, E., Kasper, B., Heine, H., Ernst, M., Brandt, E., Flad, H. D., Petersen, F. (2002) Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J. Immunol.* **169**, 770–777.
 35. Liu, C. Y., Battaglia, M., Lee, S. H., Sun, Q. H., Aster, R. H., Visentin, G. P. (2005) Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells. *J. Immunol.* **174**, 2680–2686.
 36. Tukaj, S., Kotlarz, A., Jozwik, A., Smolenska, Z., Bryl, E., Witkowski, J. M., Lipinska, B. (2010) Cytokines of the Th1 and Th2 type in sera of rheumatoid arthritis patients; correlations with anti-Hsp40 immune response and diagnostic markers. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 327–332.
 37. Ziolkowska, M., Koc, A., Luszczkiewicz, G., Ksiezopolska-Pietrzak, K., Klimczak, E., Chwalinska-Sadowska, H., Maslinski, W. (2000) High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J. Immunol.* **164**, 2832–2838.
 38. Boilard, E., Blanco, P., Nigrovic, P. A. (2012) Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 534–542.
 39. Boilard, E., Nigrovic, P. A., Larabee, K., Watts, G. F., Coblyn, J. S., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R. W., Ware, J., Lee, D. M. (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580–583.
 40. Honda, T., Segi-Nishida, E., Miyachi, Y., Narumiya, S. (2006) Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* **203**, 325–335.
 41. McCabe, D. J., Harrison, P., Sidhu, P. S., Brown, M. M., Machin, S. J. (2004) Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. *Br. J. Haematol.* **126**, 861–869.
 42. Yamazaki, M., Uchiyama, S., Iwata, M. (2001) Measurement of platelet fibrinogen binding and P-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction. *Thromb. Res.* **104**, 197–205.
 43. Lopez-Longo, F. J., Oliver-Minarro, D., de la Torre, I., Gonzalez-Diaz de Rabago, E., Sanchez-Ramon, S., Rodriguez-Mahou, M., Paravisini, A., Monteagudo, I., Gonzalez, C. M., Garcia-Castro, M., Casas, M. D., Carreno, L. (2009) Association between anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and ischemic heart disease in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **61**, 419–424.

KEY WORDS:

human · T cell activation · rheumatoid arthritis



Supplemental Figure 1. Stimulation index on CD4+ Plt-pos and CD4+ Plt-ng. PBMC from healthy donors were labelled with $7\mu\text{M}$ of CFSE and cultured with anti-CD3 plus CD2 and CD28 for 72h and 7d. PBMC were then collected and stained with anti CD4-PEcy7 and CD36-PE. Stimulation index was measured calculating the ratio of proliferating to non-proliferating cells (n=5). Mann-Whitney test was used for statistical analysis. **P<0.01

Supplemental Table 1

	RA patients			
	Group H	Group L	p value	test
Anti-CCP+	64%	100%	0.11	Fisher exact
RF+	77%	86%	0.32	Fisher exact
CRP (mg/L)	4.14 ± 0.91	11.74 ± 5.21	0.09	t-test
ESR (mm/h)	25.5 ± 4.85	29.5 ± 7.96	0.53	t-test
DAS28	2.9 ± 0.29	2.68 ± 0.41	0.65	Mann-Whitney
Cardiovascular risk index	2.79 ± 0.47	6.37 ± 1.61	0.03	Mann-Whitney

5. SÍNTESI DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1. ARTICLE I.

5.1.1. Síntesi de resultats

Els TLRs són receptors de membrana crucials pel reconeixement de patògens. Un cop activats, aquests receptors dirigeixen la resposta immunitària a través de diferents mecanismes per fer front a agents infecciosos, tals com induir activitats antimicrobianes, regular la fagocitosi i la diferenciació de monòcits a macròfags i cèl·lules dendrítiques, induir l'activació de NF- κ B que augmentarà la secreció de citokines pro- i antiinflamatòries, induir l'expressió de molècules co-activadores i augmentar l'expressió de MHC-II i alguns receptors *scavenger* com el CD163.

Els receptors *scavenger* juguen un paper important en el sistema immunitari, tant per fer front a agents infecciosos com per intervenir en processos finals de reparació de danys. Un receptor *scavenger* que intervé en aquests processos és el CD36, expressat en monòcits, macròfags, endoteli, adipòcits i plaquetes entre d'altres i que presenta un ampli ventall de lligands. Aquest receptor intervé en la fagocitosi i producció de citokines en resposta a àcids lipoteicoics de la superfície dels bacteris gram positius i actua com a coreceptor de TLR2/TLR6 per reconèixer lipoproteïnes diacetilades. El CD36 no només intervé en els moments inicials d'una infecció, sinó que també intervé en processos finals de la inflamació per tal de recuperar l'homeòstasi dels teixits, reconeixent cèl·lules apoptòtiques, fagocitant-les i induint l'expressió de IL-10 que ajudaran a la recuperació dels teixits danyats.

Donat que els TLRs i el CD36 juguen un paper important en el sistema immune innat durant processos inflamatoris i no es coneix com el CD36 pot ser regulat després d'una activació per lligands de TLRs, ens vam proposar estudiar in vitro com els lligands de

5. SÍNTESE DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

TLR2 i TLR4 regulen l'expressió de CD36 en les diferents subpoblacions de monòcits humans. A més, ens vam proposar estudiar si la regulació era induïda per les citokines generades després d'una activació via TLR, quin era el destí del CD36 i les conseqüències funcionals de la regulació de CD36 en els monòcits induïda per lligands de TLR2 i TLR4.

L'anàlisi de l'expressió de CD36 es va dur a terme mitjançant citometria de flux en les subpoblacions de monòcits $CD14^{dim}CD16^{++}$, $CD14^{+}CD16^{++}$ i $CD14^{+}CD16^{+}$ després de cultivar cèl·lules mononuclears (CMNs) de 15 donants sans amb medi de cultiu i lligands de TLR2/TLR1 (Pam_3CSk_4), TLR2/TLR6 (FSL1) i TLR4 (LPS) durant 24h i 48h. Es va observar que la població $CD14^{dim}CD16^{++}$ presentava una menor expressió de CD36 que les altres dues subpoblacions en els cultius en medi. Després dels cultius amb lligands de TLR2 i TLR4, es va observar una regulació a la baixa del CD36 a les 24h i 48h de cultiu en les tres subpoblacions, presentant la mínima expressió de CD36 a les 48h en els cultius amb LPS. Es van observar els mateixos resultats en monòcits purificats, suggerint així que la regulació a la baixa no depenia de la presència d'altres leucòcits.

El fet que estigués descrit que el CD36 pot ser regulat per diferents citokines, ens va fer pensar que aquesta regulació a la baixa podria ser una conseqüència indirecta de les citokines generades pels lligands de TLRs. Mitjançant un ELISA, vam observar que les citokines inflamatòries ($TNF\alpha$ i IL-6) i antiinflamatòries (IL-10) eren induïdes per lligands de TLR2 i TLR4. Així, es va cultivar CMNs de 5 donants sans amb $TNF\alpha$, IL-6 i IL-10. Després de 24h, cap citocina era capaç de regular CD36 en les diferents

5. SÍNTESE DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

subpoblacions de monòcits, mentre que a les 48h el TNF α va regular a la baixa el CD36 en les tres subpoblacions de monòcits analitzades.

Com que el TNF α era capaç de regular l'expressió del CD36 en les subpoblacions de monòcits, es va bloquejar el TNF α en els cultius de TLR2 i TLR4 per determinar si era l'única citocina capaç de regular el CD36. La neutralització del TNF α en els cultius de TLR2 va recuperar l'expressió del CD36 parcialment en les subpoblacions de monòcits CD14⁺CD16⁺ i CD14⁺CD16⁺⁺, però no en la subpoblació CD14^{dim}CD16⁺. Per altra banda, la neutralització del TNF α en cultius de LPS (TLR4) no va permetre recuperar l'expressió del CD36 en cap subpoblació de monòcits. Per comprovar si la síntesi de proteïnes estava involucrada amb la regulació a la baixa del CD36, es va cultivar les CMNs amb lligands de TLR2 i TLR4 en presència de cicloheximida (inhibidor de la síntesi de proteïnes), observant una recuperació parcial de l'expressió de CD36 en els monòcits. Aquests resultats suggerien que el TNF α no era l'únic factor involucrat en la regulació a la baixa del CD36 pels lligands de TLR en les diferents subpoblacions, i que la síntesi de proteïna *de novo* estava involucrat en la regulació del CD36.

Per determinar la localització del CD36 després de la regulació a la baixa, es va marcar les CMNs prèviament amb CD36. Després del cultiu amb LPS, es va observar per citometria de flux que tots els monòcits eren positius per CD36, suggerint que no es veia a la superfície, però es trobava a l'espai intracel·lular. Això es va confirmar per microscòpia de confocal, observant així que el CD36 s'havia internalitzat.

Es coneixia que el CD36 intervé en la fagocitosis de cèl·lules apoptòtiques. Així, vam voler comprovar si la regulació a la baixa del CD36 en la superfície dels monòcits

produïa conseqüències funcionals en la fagocitosis de cèl·lules apoptòtiques. Per això, les CMNs cultivades 48h amb medi o amb lligands de TLR2 i TLR4 es van posar en co-cultiu amb neutròfils autòlegs apoptòtics prèviament marcats amb CD66b-PE. Després de 4h de co-cultiu, es va observar per citometria de flux que els monòcits cultivats amb LPS presentaven menor capacitat fagocítica de neutròfils (CD14+CD66b+) comparat amb els cultivats amb medi, observant-ne una correlació dels nivells de CD36 en la superfície dels monòcits amb el percentatge de CD14+ CD66b+.

5.1.2. Discussió i rellevància

Els nostres resultats demostren que senyals inflamatòries per lligands de TLR2 i TLR4 poden regular a la baixa el CD36 en la superfície dels monòcits, internalitzant-se cap a l'interior de la cèl·lula. Aquesta regulació és parcialment causada pel TNF α induït després dels cultius amb TLR2 i TLR4 i pot ser revertida amb el seu bloqueig. La disminució de l'expressió del CD36 en la superfície dels monòcits repercuteix en la capacitat de fagocitar neutròfils apoptòtics, un procés biològic important pel manteniment de l'homeòstasi dels teixits i per la resolució de la inflamació

El fet que una disminució del CD36 pels lligands de TLR2 i TLR4 repercuteixi en la fagocitosis de cèl·lules apoptòtiques pels monòcits, posa de manifest que l'estudi d'aquest receptor *scavenger* en patologies inflamatòries cròniques és de gran importància per poder entendre la fisiopatologia de les malalties i poder desenvolupar teràpies antiinflamatòries. Amb aquestes teràpies es podria modular l'expressió del CD36 i aconseguir un efecte beneficiós en els processos finals de la inflamació, intentant reduir la cronicitat de les patologies inflamatòries.

5.2. ARTICLE II.

5.2.1. Síntesi de resultats

Recentment vam trobar una subpoblació de limfòcits T que expressa CD36. La presència d'aquest receptor en cèl·lules del sistema immune adaptatiu és intrigant, doncs el CD36 s'expressa majoritàriament en cèl·lules del sistema immune innat. Existeix una controvèrsia sobre l'expressió de CD36 en els limfòcits, ja que recentment alguns autors mostren que limfòcits B i T $\gamma\delta$ expressen CD36, mentre que d'altres no detecten l'expressió d'aquest receptor en limfòcits. A més, en alguns treballs es descriu que l'expressió del CD36 augmenta en els limfòcits T després d'una estimulació mitogènica. Llavors, vam pensar que els limfòcits CD36+ podrien tenir una funció característica. En l'actualitat, la descripció i l'anàlisi de subpoblacions proporciona marcadors útils per predir el desenvolupament o l'activitat de la malaltia. Per exemple, els limfòcits Th17 estan involucrats en la patogènesi de l'AR, a través de la producció de IL-17. Aquesta subpoblació pot ser identificada com a CD161+, on els nivells de cèl·lules CD4+CD161+ estan associats amb l'activitat de l'AR. Altres subpoblacions que intervenen en la patologia AR són les Th1 i Treg, on també el seu increment ha estat associat amb l'activitat de la patologia d'AR. Per tal de clarificar la controvèrsia sobre l'expressió i funció del CD36 en els limfòcits, vam analitzar si l'expressió d'aquest receptor era extrínseca o intrínseca als limfòcits. A més, ens vam proposar analitzar la capacitat funcional d'aquesta subpoblació de limfòcits T i analitzar el seu paper en malalties autoimmunes com l'AR.

5. SÍNTESE DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

Inesperadament, un 6.23 % dels limfòcits provinents de separació per Ficoll expressaven CD36 per citometria de flux. Per excloure que aquesta expressió podia ser deguda a una tinció inespecífica de l'anticòs monoclonal utilitzat, es va repetir amb un altre clon d'anticòs anti-CD36, observant els mateixos resultats. El fet que les plaquetes expressin CD36 i que aquestes puguin unir-se als limfòcits, ens va fer pensar que l'expressió de CD36 als limfòcits podria ser derivada de plaquetes unides. Això es va confirmar quan vam observar que els limfòcits T CD36+ presentaven també el marcador CD41a a la superfície (marcador específic de plaqueta). També ho vam confirmar per microscòpia de fluorescència, on a diferència dels monòcits que presentaven una expressió homogènia de CD36 per la superfície cel·lular, els limfòcits T CD36+ presentaven CD36 en una àrea concreta i protuberant de la superfície. La imatge era compatible amb la presència de plaquetes unides a un limfòcit. A més, és va observar la mateixa imatge utilitzant l'anticòs anti-CD41a, confirmant que es tractava de plaquetes. Per descartar que l'aïllament per Ficoll de les CMNs produís un artefacte entre la unió de plaquetes i limfòcits T, es va comparar el percentatge de limfòcits T units a plaquetes en sang total i en limfòcits T separats per Ficoll. Vam observar el mateix resultat, descartant així un possible artefacte. A més, amb aquest resultat també es va observar que el nombre de plaquetes unides a limfòcits T no depenia del nombre de plaquetes per limfòcit.

Utilitzant el CD36 com a marcador per estudiar la subpoblació de limfòcits T amb plaquetes unides, es va analitzar el fenotip dels limfòcits T CD3-naïve i CD3-memòria amb plaquetes unides per citometria de flux. No es va observar diferències entre el nombre de limfòcits T CD3 naïve o de memòria amb plaquetes unides. En canvi, es va observar un augment significatiu de l'expressió de CXCR3 i CCR4 en els limfòcits T

5. SÍNTESE DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

CD3-naïve amb plaquetes unides comparats amb els limfòcits T CD3-naïve sense plaquetes. Els limfòcits T CD3-memòria amb plaquetes unides presentaven una major expressió de CD25, CCR5, CCR4 i HLA-DR comparades amb els que no presentaven plaquetes unides. També es va analitzar si la presència de plaquetes unides estava associada amb marcadors de Th1 (CCR5 i CXCR3) o Th2 (CCR4) en els limfòcits T CD4+. Es va observar que hi havia un augment de limfòcits T CCR5+ entre els que presentaven plaquetes unides, suggerint així que les plaquetes s'unien prioritàriament a limfòcits T CD4+ Th1.

Vam investigar si la unió de plaquetes als limfòcits T CD4+ modificava la proliferació induïda per TCR. Per això, es van tenyir els CMNs amb CFSE i es van estimular amb anti-CD3, CD28 i CD2 durant 72h i 7 dies. Per citometria de flux es va veure que els limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides presentaven menor nombre de cicles de proliferació i índex d'estimulació que els limfòcits T CD4+ sense plaquetes, suggerint així que la unió de plaquetes disminuïa la capacitat proliferativa dels limfòcits.

Fet això, vam voler analitzar per citometria de flux si la unió de plaquetes modificava la producció de citoquines intracel·lulars dels limfòcits T CD3+ després d'una estimulació amb anti-CD3, CD28 i CD2 durant 48h. Tot i que no es va observar una diferència entre percentatge de cèl·lules productores de IL-17, IFN- γ , IL-10 i TNF α entre els limfòcits T CD3+ amb o sense plaquetes unides, la unió de plaquetes modificava la quantitat de citoquines produïdes. Els limfòcits T CD3+ amb plaquetes unides presentaven menor quantitat de IL-17 i IFN- γ que els limfòcits T CD3+ sense plaquetes. No es va observar diferència en la quantitat de IL-10 i TNF α entre les dues poblacions de limfòcits T

CD3+. Tots aquests resultats suggerien que la unió de plaquetes als limfòcits disminuïa la producció de citoquines Th1 i Th17.

Donat que la P-selectina de les plaquetes activades s'uneix a PSGL-1 expressat en els leucòcits, i que els pacients d'AR presenten un augment d'expressió de P-selectina en les plaquetes, vam comparar el percentatge de limfòcits T amb plaquetes unides entre pacients d'AR i donants sans. El percentatge de limfòcits T CD8+ amb plaquetes unides entre pacients d'AR i donants sans era similar. En canvi, el percentatge de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides era superior en els pacients d'AR comparat amb els donants sans. Segons el percentatge de CD4+ amb plaquetes unides, es distingien dos grups de pacients d'AR: un grup amb elevat percentatge de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides (Grup H) comparat amb donants sans, i un altre grup (grup L) amb nivells comparables a donants sans. Quan es va analitzar les diferències entre aquests dos grups de pacients d'AR, es va observar que el grup L presentava major risc cardiovascular i major nivells de IL-17 i IFN- γ en el plasma comparat amb els donants sans i el grup H d'AR. Així, aquests resultats suggerien que l'augment dels nivells d'unió de plaquetes a limfòcits T CD4+ tenia un efecte regulador en els nivells de citoquines Th1 i Th17 de pacients d'AR. A més a més, es va observar una correlació negativa entre el percentatge de cèl·lules T CD4+ amb plaquetes unides i els nivells IFN- γ en plasma en els pacients d'AR.

Després d'això, vam analitzar l'associació entre els nivells de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides i els nivells d'anticossos i paràmetres clínics (anticossos anti-CCP i FR, PCR, VSG, DAS28 i index de risc cardiovascular). Els pacients amb títols negatius o baixos d'anticossos anti-CCP presentaven percentatges superiors de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides que els que presentaven nivells alts d'anticossos anti-CCP,

observant-ne una correlació inversa entre els nivells d'anticossos anti-CCP i el percentatge de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides. Els pacients amb menors títols de FR, i valors de PCR més baixes, també presentaven percentatges superiors de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides. No es va observar diferència en els percentatges de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides quan els pacients va ser segregats d'acord amb els nivells de VSG i DAS28. En canvi, si es va observar que els pacients amb menor risc cardiovascular presentaven major percentatge de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides que els de major risc cardiovascular.

5.2.2. Discussió i rellevància

Els nostres resultats demostren per citometria de flux i microscòpia de fluorescència que l'expressió del CD36 en els limfòcits és derivada de les plaquetes unides a limfòcits, resolent així la controvèrsia que hi havia a la literatura. Utilitzant el CD36 com a marcador per seleccionar els limfòcits amb plaquetes unides, vam observar que la unió de la plaqueta redueix la capacitat de proliferació dels limfòcits units i disminueix la producció de citoquines Th1 i Th17. A més, la unió de plaquetes als limfòcits T CD4+ sembla tenir un paper important en la patologia d'AR, doncs aquells pacients que tenien major percentatge de CD4+ amb plaquetes unides presentaven menors nivells de IL-17, IFN- γ , anti-CCP, FR, PCR i índex de risc cardiovascular, donant lloc a un fenotip patològic menys sever.

Aquest treball obre les portes a noves investigacions en tractaments que modulin la unió entre plaquetes i limfòcits. A més, definir com les plaquetes poden regular el sistema immunològic mitjançant la unió als leucòcits i influir en la seva funció durant la

5. SÍNTESE DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

inflamació pot servir per investigar nous tractaments per les malalties inflamatòries on participin múltiples cèl·lules del sistema immune. No podem oblidar que també podrà ajudar-nos com a eina complementària per predir la severitat de la malaltia.

6. CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. Senyals via TLR2/1, TLR2/6 i TLR4 disminueixen l'expressió del CD36 en la superfície de les diferents subpoblacions de monòcits perifèrics. La mínima expressió de CD36 s'observa després de cultivar-los 48h amb LPS.
2. El TNF α induït durant la resposta a lligands de TLR2 és el principal factor que contribueix a la disminució de l'expressió de CD36.
3. Tot i que s'indueix més TNF α durant la resposta a lligands de TLR4 que a TLR2, aquest factor no és l'únic que contribueix a la disminució de CD36 per LPS. A banda de la senyalització directa del TLR4 per LPS i en menor grau pel TNF α induït, altres factors podrien intervenir en la disminució de CD36.
4. La pèrdua de l'expressió de CD36 és deguda a la internalització de la molècula cap a dins dels monòcits després de l'activació per LPS.
5. En els monòcits, la disminució de l'expressió de CD36 per senyals TLR afecta processos claus implicats en la resolució de la inflamació. La disminució de CD36 induïda per l'estimulació via TLR en els monòcits redueix la fagocitosi de neutròfils apoptòtics, dificultant la resolució de la inflamació. La mínima fagocitosi de neutròfils apoptòtics coincideix amb la mínima expressió de CD36 després de l'activació amb LPS.

6. L'expressió de CD36 en els limfòcits T és extrínseca. Són les plaquetes unides a certes poblacions de limfòcits T, les responsables de la detecció de CD36 en aquestes cèl·lules.
7. Es pot utilitzar el CD36 present a la superfície de les plaquetes unides a certs limfòcits T per seleccionar aquesta subpoblació i estudiar la seva funció.
8. Els limfòcits T que porten plaquetes unides tenen menor capacitat proliferativa i menor producció de citokines implicades en els processos inflamatoris: Th1 (IFN γ) i Th17 (IL-17).
9. En l'artritis reumatoide, la presència de plaquetes unides als limfòcits T CD4+ ens permet classificar els pacients en dos grups. El grup de pacients amb major percentatge de limfòcits T CD4+ amb plaquetes unides correspon als que presenten un fenotip clínic menys sever: menors nivells d'autoanticossos anti-CCP, menors nivells de FR i PCR, menor índex de risc cardiovascular i IL-17 i IFN γ en plasma.
10. La unió de plaquetes als limfòcits T CD4+ és un mecanisme regulador de la resposta immune que probablement participa en la patologia de l'artritis reumatoide.

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

1. Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-35.
2. Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C. R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M. P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D., Caruso, C. (2007) Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 128, 83-91.
3. Parker, L. C., Prince, L. R., Sabroe, I. (2007) Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 147, 199-207.
4. Takeda, K. and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17, 1-14.
5. Kobe, B. and Kajava, A. V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725-32.
6. Bella, J., Hindle, K. L., McEwan, P. A., Lovell, S. C. (2008) The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol Life Sci* 65, 2307-33.
7. Kim, H. M., Park, B. S., Kim, J. I., Kim, S. E., Lee, J., Oh, S. C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O. J., Lee, J. O. (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130, 906-17.
8. Jin, M. S. and Lee, J. O. (2008) Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 29, 182-91.
9. Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H., Lee, J. O. (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071-82.
10. Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S. J., Ryu, Y. H., Mah, S., Han, S. H., Lee, H., Paik, S. G., Lee, J. O. (2009) Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31, 873-84.
11. Choe, J., Kelker, M. S., Wilson, I. A. (2005) Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309, 581-5.
12. Bell, J. K., Askins, J., Hall, P. R., Davies, D. R., Segal, D. M. (2006) The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8792-7.
13. Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., Kuroki, Y. (2007) Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 8, 124.
14. O'Neill, L. A. (2006) How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 18, 3-9.
15. Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., Tong, L. (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* 408, 111-5.

16. Nyman, T., Stenmark, P., Flodin, S., Johansson, I., Hammarstrom, M., Nordlund, P. (2008) The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *J Biol Chem* 283, 11861-5.
17. Gautam, J. K., Ashish, Comeau, L. D., Krueger, J. K., Smith, M. F., Jr. (2006) Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling. *J Biol Chem* 281, 30132-42.
18. Nunez Miguel, R., Wong, J., Westoll, J. F., Brooks, H. J., O'Neill, L. A., Gay, N. J., Bryant, C. E., Monie, T. P. (2007) A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One* 2, e788.
19. Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32, 1958-68.
20. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
21. Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., Aderem, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-71.
22. Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlrardt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13, 933-40.
23. Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T., Moore, K. J. (2010) CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 11, 155-61.
24. Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., Cao, Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-47.
25. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-5.
26. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., Akira, S. (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-9.
27. Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., Medzhitov, R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420, 329-33.

28. Kagan, J. C. and Medzhitov, R. (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125, 943-55.
29. Mansell, A., Brint, E., Gould, J. A., O'Neill, L. A., Hertzog, P. J. (2004) Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem* 279, 37227-30.
30. Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., Beutler, B. (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743-8.
31. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 1144-50.
32. Kawai, T. and Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-25.
33. Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., Sambhara, S. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 169, 4697-701.
34. Ishida, I., Kubo, H., Suzuki, S., Suzuki, T., Akashi, S., Inoue, K., Maeda, S., Kikuchi, H., Sasaki, H., Kondo, T. (2002) Hypoxia diminishes toll-like receptor 4 expression through reactive oxygen species generated by mitochondria in endothelial cells. *J Immunol* 169, 2069-75.
35. Fan, J., Kapus, A., Marsden, P. A., Li, Y. H., Oreopoulos, G., Marshall, J. C., Frantz, S., Kelly, R. A., Medzhitov, R., Rotstein, O. D. (2002) Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide. *J Immunol* 168, 5252-9.
36. Monick, M. M., Yarovinsky, T. O., Powers, L. S., Butler, N. S., Carter, A. B., Gudmundsson, G., Hunninghake, G. W. (2003) Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J Biol Chem* 278, 53035-44.
37. Hopkins, P. A., Fraser, J. D., Pridmore, A. C., Russell, H. H., Read, R. C., Sriskandan, S. (2005) Superantigen recognition by HLA class II on monocytes up-regulates toll-like receptor 4 and enhances proinflammatory responses to endotoxin. *Blood* 105, 3655-62.
38. Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168, 554-61.
39. Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-7.

40. Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., Mantovani, A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164, 5998-6004.
41. Wang, Z. M., Liu, C., Dziarski, R. (2000) Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J Biol Chem* 275, 20260-7.
42. Ritter, M., Mennerich, D., Weith, A., Seither, P. (2005) Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond)* 2, 16.
43. Kopydlowski, K. M., Salkowski, C. A., Cody, M. J., van Rooijen, N., Major, J., Hamilton, T. A., Vogel, S. N. (1999) Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* 163, 1537-44.
44. Salkowski, C. A., Detore, G., Franks, A., Falk, M. C., Vogel, S. N. (1998) Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. *Infect Immun* 66, 3569-78.
45. Sabroe, I., Jones, E. C., Whyte, M. K., Dower, S. K. (2005) Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* 115, 90-8.
46. Sabroe, I., Prince, L. R., Jones, E. C., Horsburgh, M. J., Foster, S. J., Vogel, S. N., Dower, S. K., Whyte, M. K. (2003) Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 170, 5268-75.
47. Pivarcsi, A., Bodai, L., Rethi, B., Kenderessy-Szabo, A., Koreck, A., Szell, M., Beer, Z., Bata-Csorgoo, Z., Magocsi, M., Rajnavolgyi, E., Dobozy, A., Kemeny, L. (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 15, 721-30.
48. Kollisch, G., Kalali, B. N., Voelcker, V., Wallich, R., Behrendt, H., Ring, J., Bauer, S., Jakob, T., Mempel, M., Ollert, M. (2005) Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* 114, 531-41.
49. Droemann, D., Goldmann, T., Branscheid, D., Clark, R., Dalhoff, K., Zabel, P., Vollmer, E. (2003) Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 119, 103-8.

50. Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M., Si-Tahar, M. (2005) Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280, 5571-80.
51. Abreu, M. T., Fukata, M., Arditi, M. (2005) TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 174, 4453-60.
52. Morris, G. E., Parker, L. C., Ward, J. R., Jones, E. C., Whyte, M. K., Brightling, C. E., Bradding, P., Dower, S. K., Sabroe, I. (2006) Cooperative molecular and cellular networks regulate Toll-like receptor-dependent inflammatory responses. *FASEB J* 20, 2153-5.
53. Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Polentarutti, N., Muzio, M., Arditi, M. (2000) Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 11058-63.
54. Yang, X., Coriolan, D., Murthy, V., Schultz, K., Golenbock, D. T., Beasley, D. (2005) Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1069-76.
55. Liew, F. Y., Komai-Koma, M., Xu, D. (2004) A toll for T cell costimulation. *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2, ii76-ii78.
56. Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D., Liew, F. Y. (2006) Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7048-53.
57. Xu, D., Komai-Koma, M., Liew, F. Y. (2005) Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* 233, 85-9.
58. Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.
59. Hoebe, K., Janssen, E. M., Kim, S. O., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Han, J., Beutler, B. (2003) Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* 4, 1223-9.
60. Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., Ohteki, T., Kaisho, T., Takaoka, A., Akira, S., Seya, T., Taniguchi, T. (2003) Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10872-7.
61. Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., Akira, S. (2002) Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 14, 1225-31.

62. Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-95.
63. Ospelt, C. and Gay, S. (2010) TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 495-505.
64. Murphy, J. E., Tedbury, P. R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H., Ponnambalam, S. (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 182, 1-15.
65. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., Brown, M. S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-7.
66. Mukhopadhyay, S., Peiser, L., Gordon, S. (2004) Activation of murine macrophages by *Neisseria meningitidis* and IFN-gamma in vitro: distinct roles of class A scavenger and Toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. *J Leukoc Biol* 76, 577-84.
67. Areschoug, T., Waldemarsson, J., Gordon, S. (2008) Evasion of macrophage scavenger receptor A-mediated recognition by pathogenic streptococci. *Eur J Immunol* 38, 3068-79.
68. Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., Beutler, B. (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433, 523-7.
69. Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M., Maina, V., Magistrelli, G., Haeuw, J. F., Hoeffel, G., Thieblemont, N., Corvaia, N., Garlanda, C., Delneste, Y., Mantovani, A. (2005) Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* 22, 551-60.
70. Dhaliwal, B. S. and Steinbrecher, U. P. (1999) Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 286, 191-205.
71. Kraal, G., van der Laan, L. J., Elomaa, O., Tryggvason, K. (2000) The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect* 2, 313-6.
72. Brannstrom, A., Sankala, M., Tryggvason, K., Pikkarainen, T. (2002) Arginine residues in domain V have a central role for bacteria-binding activity of macrophage scavenger receptor MARCO. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1462-9.
73. Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108, 785-91.

74. Terpstra, V., van Amersfoort, E. S., van Velzen, A. G., Kuiper, J., van Berkel, T. J. (2000) Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1860-72.
75. Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N., Jamieson, G. A. (1992) Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80, 1105-15.
76. Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M. A., Vega, M. A. (1998) Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 39, 777-88.
77. Rigotti, A., Acton, S. L., Krieger, M. (1995) The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem* 270, 16221-4.
78. Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J., Savill, J. (1995) CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 181, 1857-62.
79. Pearson, A., Lux, A., Krieger, M. (1995) Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4056-60.
80. Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M., Ezekowitz, R. A. (2001) *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* 15, 1027-38.
81. Jiang, Z., Shih, D. M., Xia, Y. R., Lusic, A. J., de Beer, F. C., de Villiers, W. J., van der Westhuyzen, D. R., de Beer, M. C. (1998) Structure, organization, and chromosomal mapping of the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein. *Genomics* 50, 199-205.
82. Ramprasad, M. P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O., Steinberg, D. (1996) Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14833-8.
83. Chen, M., Masaki, T., Sawamura, T. (2002) LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 95, 89-100.
84. Jono, T., Miyazaki, A., Nagai, R., Sawamura, T., Kitamura, T., Horiuchi, S. (2002) Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett* 511, 170-4.
85. Moriwaki, H., Kume, N., Sawamura, T., Aoyama, T., Hoshikawa, H., Ochi, H., Nishi, E., Masaki, T., Kita, T. (1998) Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1541-7.

86. Kakutani, M., Masaki, T., Sawamura, T. (2000) A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 360-4.
87. Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T., Masaki, T. (1998) Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9535-40.
88. Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T., Yonehara, S. (2001) LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Immunol* 166, 5108-14.
89. Marsche, G., Levak-Frank, S., Quehenberger, O., Heller, R., Sattler, W., Malle, E. (2001) Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J* 15, 1095-7.
90. Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., Inoue, K. (1997) Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 31217-20.
91. Ishii, J., Adachi, H., Aoki, J., Koizumi, H., Tomita, S., Suzuki, T., Tsujimoto, M., Inoue, K., Arai, H. (2002) SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain. *J Biol Chem* 277, 39696-702.
92. Zhou, Z., Hartweg, E., Horvitz, H. R. (2001) CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* 104, 43-56.
93. Tamura, Y., Osuga, J., Adachi, H., Tozawa, R., Takanezawa, Y., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., Okazaki, H., Tomita, S., Iizuka, Y., Koizumi, H., Inaba, T., Yagyu, H., Kamada, N., Suzuki, H., Shimano, H., Kadowaki, T., Tsujimoto, M., Arai, H., Yamada, N., Ishibashi, S. (2004) Scavenger receptor expressed by endothelial cells I (SREC-I) mediates the uptake of acetylated low density lipoproteins by macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 279, 30938-44.
94. Shibata, M., Ishii, J., Koizumi, H., Shibata, N., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. (2004) Type F scavenger receptor SREC-I interacts with advillin, a member of the gelsolin/villin family, and induces neurite-like outgrowth. *J Biol Chem* 279, 40084-90.
95. Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Kataoka, H., Kita, T., Yonehara, S. (2000) Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem* 275, 40663-6.
96. Chandrasekar, B., Bysani, S., Mummidi, S. (2004) CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and

- induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 279, 3188-96.
97. Minami, M., Kume, N., Shimaoka, T., Kataoka, H., Hayashida, K., Akiyama, Y., Nagata, I., Ando, K., Nobuyoshi, M., Hanyuu, M., Komeda, M., Yonehara, S., Kita, T. (2001) Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1796-800.
 98. Clemetson, K. J., Pfueller, S. L., Luscher, E. F., Jenkins, C. S. (1977) Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 464, 493-508.
 99. Knowles, D. M., 2nd, Tolidjian, B., Marboe, C., D'Agati, V., Grimes, M., Chess, L. (1984) Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium. *J Immunol* 132, 2170-3.
 100. Silverstein, R. L. and Febbraio, M. (2009) CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2, re3.
 101. Rac, M. E., Safranow, K., Poncyljusz, W. (2007) Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med* 13, 288-96.
 102. Tao, N., Wagner, S. J., Lublin, D. M. (1996) CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem* 271, 22315-20.
 103. Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., McGregor, J. L. (2007) CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 75, 468-77.
 104. Rahaman, S. O., Lennon, D. J., Febbraio, M., Podrez, E. A., Hazen, S. L., Silverstein, R. L. (2006) A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 4, 211-21.
 105. Stuart, L. M., Deng, J., Silver, J. M., Takahashi, K., Tseng, A. A., Hennessy, E. J., Ezekowitz, R. A., Moore, K. J. (2005) Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 170, 477-85.
 106. Rickles, R. J., Botfield, M. C., Zhou, X. M., Henry, P. A., Brugge, J. S., Zoller, M. J. (1995) Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10909-13.
 107. Yesner, L. M., Huh, H. Y., Pearce, S. F., Silverstein, R. L. (1996) Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1019-25.
 108. Berry, A., Balard, P., Coste, A., Olagnier, D., Lagane, C., Authier, H., Benoit-Vical, F., Lepert, J. C., Seguela, J. P., Magnaval, J. F., Chambon, P., Metzger, D., Desvergne, B.,

- Wahli, W., Auwerx, J., Pipy, B. (2007) IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation. *Eur J Immunol* 37, 1642-52.
109. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., Evans, R. M. (1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229-40.
110. Boyer, J. F., Ballard, P., Authier, H., Faucon, B., Bernad, J., Mazieres, B., Davignon, J. L., Cantagrel, A., Pipy, B., Constantin, A. (2007) Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. *Arthritis Res Ther* 9, R22.
111. Nakagawa, T., Nozaki, S., Nishida, M., Yakub, J. M., Tomiyama, Y., Nakata, A., Matsumoto, K., Funahashi, T., Kameda-Takemura, K., Kurata, Y., Yamashita, S., Matsuzawa, Y. (1998) Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1350-7.
112. Baranova, I. N., Kurlander, R., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Chen, Z., Remaley, A. T., Csako, G., Patterson, A. P., Eggerman, T. L. (2008) Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol* 181, 7147-56.
113. Patel, S. N., Lu, Z., Ayi, K., Serghides, L., Gowda, D. C., Kain, K. C. (2007) Disruption of CD36 impairs cytokine response to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. *J Immunol* 178, 3954-61.
114. Erdman, L. K., Cosio, G., Helmers, A. J., Gowda, D. C., Grinstein, S., Kain, K. C. (2009) CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol* 183, 6452-9.
115. Triantafilou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T., Triantafilou, K. (2006) Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 281, 31002-11.
116. Podrez, E. A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R. L., Hajjar, D. P., Cohen, P. A., Frazier, W. A., Hoff, H. F., Hazen, S. L. (2000) Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 105, 1095-108.
117. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., Silverstein, R. L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105, 1049-56.

118. Podrez, E. A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P. J., Shan, L., Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L., Hoff, H. F., Salomon, R. G., Hazen, S. L. (2002) A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 277, 38517-23.
119. Janabi, M., Yamashita, S., Hirano, K., Sakai, N., Hiraoka, H., Matsumoto, K., Zhang, Z., Nozaki, S., Matsuzawa, Y. (2000) Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1953-60.
120. Martin-Fuentes, P., Civeira, F., Recalde, D., Garcia-Otin, A. L., Jarauta, E., Marzo, I., Cenarro, A. (2007) Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response. *J Immunol* 179, 3242-8.
121. Cho, S., Park, E. M., Febbraio, M., Anrather, J., Park, L., Racchumi, G., Silverstein, R. L., Iadecola, C. (2005) The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J Neurosci* 25, 2504-12.
122. Park, Y. M., Febbraio, M., Silverstein, R. L. (2009) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 119, 136-45.
123. Kim, E., Tolhurst, A. T., Qin, L. Y., Chen, X. Y., Febbraio, M., Cho, S. (2008) CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury. *J Neurosci* 28, 4661-70.
124. Kunz, A., Abe, T., Hochrainer, K., Shimamura, M., Anrather, J., Racchumi, G., Zhou, P., Iadecola, C. (2008) Nuclear factor-kappaB activation and postischemic inflammation are suppressed in CD36-null mice after middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci* 28, 1649-58.
125. El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M. W., Luster, A. D. (2003) CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med* 197, 1657-66.
126. Coraci, I. S., Husemann, J., Berman, J. W., Hulette, C., Dufour, J. H., Campanella, G. K., Luster, A. D., Silverstein, S. C., El-Khoury, J. B. (2002) CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* 160, 101-12.

127. Moore, K. J., El Khoury, J., Medeiros, L. A., Terada, K., Geula, C., Luster, A. D., Freeman, M. W. (2002) A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem* 277, 47373-9.
128. Greenberg, M. E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., Hazen, S. L. (2006) Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* 203, 2613-25.
129. Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslett, C. (1992) Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90, 1513-22.
130. Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., Girkontaite, I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350-1.
131. Zhao, Y., Xiong, Z., Lechner, E. J., Klenotic, P. A., Hamburg, B. J., Hulver, M., Khare, A., Oriss, T., Mangalmurti, N., Chan, Y., Zhang, Y., Ross, M. A., Stolz, D. B., Rosengart, M. R., Pilewski, J., Ray, P., Ray, A., Silverstein, R. L., Lee, J. S. (2013) Thrombospondin-1 triggers macrophage IL-10 production and promotes resolution of experimental lung injury. *Mucosal Immunol*.
132. Chung, E. Y., Liu, J., Homma, Y., Zhang, Y., Brendolan, A., Saggese, M., Han, J., Silverstein, R., Selleri, L., Ma, X. (2007) Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27, 952-64.
133. Dawson, D. W., Pearce, S. F., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A., Bouck, N. P. (1997) CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138, 707-17.
134. Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Bouck, N. (2000) Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6, 41-8.
135. Santiago-Schwarz, F. (1999) Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage. *J Leukoc Biol* 66, 209-16.
136. van Furth, R. and Cohn, Z. A. (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128, 415-35.
137. Funderburg, N. T., Jadowsky, J. K., Lederman, M. M., Feng, Z., Weinberg, A., Sieg, S. F. (2011) The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human beta-defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor-kappaB signalling patterns in human monocytes. *Immunology* 134, 151-60.
138. Blander, J. M. (2007) Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiol* 9, 290-9.

139. Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
140. Weaver, L. K., Pioli, P. A., Wardwell, K., Vogel, S. N., Guyre, P. M. (2007) Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 81, 663-71.
141. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., Lutz, M. B. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.
142. Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., Ziegler-Heitbrock, L. (2002) The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168, 3536-42.
143. Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010) Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-86.
144. Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., Wagner, U. (2012) The CD14(bright) CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 64, 671-7.
145. Wong, K. L., Tai, J. J., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., Kourilsky, P., Wong, S. C. (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16-31.
146. Smedman, C., Ernemar, T., Gudmundsdotter, L., Gille-Johnson, P., Somell, A., Nihlmark, K., Gardlund, B., Andersson, J., Paulie, S. (2011) FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine secreting subpopulations. *Scand J Immunol*.
147. Davis, M. M., Krogsgaard, M., Huppa, J. B., Sumen, C., Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Wu, L. C., Ehrlich, L. (2003) Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition. *Annu Rev Biochem* 72, 717-42.
148. Poli, G. and Bordignon, C. (2003) Unplugging the T cell receptor. *Nat Immunol* 4, 943-4.
149. Bonneville, M., O'Brien, R. L., Born, W. K. (2010) Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10, 467-78.
150. Wan, Y. Y. (2010) Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 130, 166-71.
151. Iadecola, C. and Anrather, J. (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796-808.

152. Acuto, O. and Cantrell, D. (2000) T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 18, 165-84.
153. Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., Dustin, M. L. (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19, 375-96.
154. Hutchcroft, J. E., Franklin, D. P., Tsai, B., Harrison-Findik, D., Varticovski, L., Bierer, B. E. (1995) Phorbol ester treatment inhibits phosphatidylinositol 3-kinase activation by, and association with, CD28, a T-lymphocyte surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8808-12.
155. Yang, H. and Reinherz, E. L. (2001) Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem* 276, 18775-85.
156. Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G. S., Xu, D., Liew, F. Y. (2004) TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3029-34.
157. Chapman, N. M., Bilal, M. Y., Cruz-Orcutt, N., Knudson, C., Madinaveitia, S., Light, J., Houtman, J. C. (2013) Distinct signaling pathways regulate TLR2 co-stimulatory function in human T cells. *Cell Signal* 25, 639-50.
158. Chen, Y., Qin, K., Wu, W. L., Li, G., Zhang, J., Du, H., Ng, M. H., Shih, J. W., Peiris, J. S., Guan, Y., Chen, H., Xia, N. (2009) Broad cross-protection against H5N1 avian influenza virus infection by means of monoclonal antibodies that map to conserved viral epitopes. *J Infect Dis* 199, 49-58.
159. Nyirenda, M. H., Sanvito, L., Darlington, P. J., O'Brien, K., Zhang, G. X., Constantinescu, C. S., Bar-Or, A., Gran, B. (2011) TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *J Immunol* 187, 2278-90.
160. Funderburg, N., Luciano, A. A., Jiang, W., Rodriguez, B., Sieg, S. F., Lederman, M. M. (2008) Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS One* 3, e1915.
161. Meyer, T., Oberg, H. H., Peters, C., Martens, I., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Wesch, D. (2012) poly(I:C) costimulation induces a stronger antiviral chemokine and granzyme B release in human CD4 T cells than CD28 costimulation. *J Leukoc Biol* 92, 765-74.
162. Holm, C. K., Petersen, C. C., Hvid, M., Petersen, L., Paludan, S. R., Deleuran, B., Hokland, M. (2009) TLR3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid induces IL-17A and IL-21 synthesis in human Th cells. *J Immunol* 183, 4422-31.
163. de Wit, J., Souwer, Y., van Beelen, A. J., de Groot, R., Muller, F. J., Klaasse Bos, H., Jorritsma, T., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C., van Ham, S. M. (2011) CD5

- costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood* 118, 6107-14.
164. Ayyoub, M., Raffin, C., Valmori, D. (2012) Generation of Th17 from human naive CD4⁺ T cells preferentially occurs from FOXP3⁺ Tregs upon costimulation via CD28 or CD5. *Blood* 119, 4810-2; author reply 4812-3.
 165. Vallejo, A. N., Mugge, L. O., Klimiuk, P. A., Weyand, C. M., Goronzy, J. J. (2000) Central role of thrombospondin-1 in the activation and clonal expansion of inflammatory T cells. *J Immunol* 164, 2947-54.
 166. McDonnell, M., Liang, Y., Noronha, A., Coukos, J., Kasper, D. L., Farraye, F. A., Ganley-Leal, L. M. (2011) Systemic Toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 17, 298-307.
 167. Lubick, K. and Jutila, M. A. (2006) LTA recognition by bovine gammadelta T cells involves CD36. *J Leukoc Biol* 79, 1268-70.
 168. Lee, T. H., Nagy, L., Nagakura, T., Walport, M. J., Kay, A. B. (1982) Identification and partial characterization of an exercise-induced neutrophil chemotactic factor in bronchial asthma. *J Clin Invest* 69, 889-99.
 169. Borregaard, N. and Cowland, J. B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89, 3503-21.
 170. Faurschou, M. and Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5, 1317-27.
 171. Babior, B. M., Kipnes, R. S., Curnutte, J. T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52, 741-4.
 172. Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 5, 1307-15.
 173. Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K., Dower, S. K. (2002) Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 168, 4701-10.
 174. Hattermann, K., Picard, S., Borgeat, M., Leclerc, P., Pouliot, M., Borgeat, P. (2007) The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J* 21, 1575-85.
 175. Janke, M., Poth, J., Wimmenauer, V., Giese, T., Coch, C., Barchet, W., Schlee, M., Hartmann, G. (2009) Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1026-33.
 176. Tamassia, N., Le Moigne, V., Rossato, M., Donini, M., McCartney, S., Calzetti, F., Colonna, M., Bazzoni, F., Cassatella, M. A. (2008) Activation of an immunoregulatory

- and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *J Immunol* 181, 6563-73.
177. Hayashi, F., Means, T. K., Luster, A. D. (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660-9.
 178. Wang, J. P., Bowen, G. N., Padden, C., Cerny, A., Finberg, R. W., Newburger, P. E., Kurt-Jones, E. A. (2008) Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood* 112, 2028-34.
 179. Park, J. S., Arcaroli, J., Yum, H. K., Yang, H., Wang, H., Yang, K. Y., Choe, K. H., Strassheim, D., Pitts, T. M., Tracey, K. J., Abraham, E. (2003) Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C870-9.
 180. van Zoelen, M. A., Yang, H., Florquin, S., Meijers, J. C., Akira, S., Arnold, B., Nawroth, P. P., Bierhaus, A., Tracey, K. J., van der Poll, T. (2009) Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock* 31, 280-4.
 181. Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser, C. J. (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464, 104-7.
 182. Kaushansky, K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 354, 2034-45.
 183. George, J. N. (2000) Platelets. *Lancet* 355, 1531-9.
 184. Ho-Tin-Noe, B., Demers, M., Wagner, D. D. (2011) How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1, 56-65.
 185. Kao, K. J., Cook, D. J., Scornik, J. C. (1986) Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood* 68, 627-32.
 186. Semple, J. W., Italiano, J. E., Jr., Freedman, J. (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11, 264-74.
 187. Henn, V., Steinbach, S., Buchner, K., Presek, P., Kroczeck, R. A. (2001) The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 98, 1047-54.
 188. Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., Kroczeck, R. A. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591-4.
 189. Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M., Crow, A. R., Bang, K. W., Nestel, F. P., Ni, H., Lazarus, A. H., Freedman, J., Semple, J. W. (2006) Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* 107, 637-41.

7. BIBLIOGRAFIA

190. Shiraki, R., Inoue, N., Kawasaki, S., Takei, A., Kadotani, M., Ohnishi, Y., Ejiri, J., Kobayashi, S., Hirata, K., Kawashima, S., Yokoyama, M. (2004) Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res* 113, 379-85.
191. Andonegui, G., Kerfoot, S. M., McNagny, K., Ebbert, K. V., Patel, K. D., Kubes, P. (2005) Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106, 2417-23.
192. Cognasse, F., Hamzeh, H., Chavarin, P., Acquart, S., Genin, C., Garraud, O. (2005) Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 83, 196-8.
193. Denis, M. M., Tolley, N. D., Bunting, M., Schwertz, H., Jiang, H., Lindemann, S., Yost, C. C., Rubner, F. J., Albertine, K. H., Swoboda, K. J., Fratto, C. M., Tolley, E., Kraiss, L. W., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Weyrich, A. S. (2005) Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122, 379-91.
194. Lindemann, S., Tolley, N. D., Dixon, D. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Weyrich, A. S. (2001) Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 154, 485-90.
195. Humphrey, J. H. and Jaques, R. (1953) Liberation of histamine and serotonin from platelets by antigen-antibody reactions in vitro. *J Physiol* 119, 43P.
196. Ehlers, R., Ustinov, V., Chen, Z., Zhang, X., Rao, R., Lusinskas, F. W., Lopez, J., Plow, E., Simon, D. I. (2003) Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Iba1. *J Exp Med* 198, 1077-88.
197. Furie, B. and Furie, B. C. (1995) The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* 74, 224-7.
198. Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H., Kubes, P. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13, 463-9.
199. Podrez, E. A., Byzova, T. V., Febbraio, M., Salomon, R. G., Ma, Y., Valiyaveetil, M., Poliakov, E., Sun, M., Finton, P. J., Curtis, B. R., Chen, J., Zhang, R., Silverstein, R. L., Hazen, S. L. (2007) Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med* 13, 1086-95.
200. Valiyaveetil, M., Kar, N., Ashraf, M. Z., Byzova, T. V., Febbraio, M., Podrez, E. A. (2008) Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI. *Blood* 111, 1962-71.
201. Bemelmans, M. H., van Tits, L. J., Buurman, W. A. (1996) Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 16, 1-11.

202. Bazzoni, F. and Beutler, B. (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334, 1717-25.
203. Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
204. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-33.
205. Bradley, J. R. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214, 149-60.
206. Messadi, D. V., Pober, J. S., Fiers, W., Gimbrone, M. A., Jr., Murphy, G. F. (1987) Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol* 139, 1557-62.
207. Bradley, J. R. and Pober, J. S. (1996) Prolonged cytokine exposure causes a dynamic redistribution of endothelial cell adhesion molecules to intercellular junctions. *Lab Invest* 75, 463-72.
208. Pober, J. S., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., Lapierre, L. A., Fiers, W., Gimbrone, M. A., Jr. (1986) Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol* 136, 1680-7.
209. Munro, J. M., Pober, J. S., Cotran, R. S. (1989) Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol* 135, 121-33.
210. Rollins, B. J., Yoshimura, T., Leonard, E. J., Pober, J. S. (1990) Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 136, 1229-33.
211. Mark, K. S., Trickler, W. J., Miller, D. W. (2001) Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 1051-8.
212. Feng, X., Deng, T., Zhang, Y., Su, S., Wei, C., Han, D. (2011) Lipopolysaccharide inhibits macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by regulating the production of tumour necrosis factor alpha and growth arrest-specific gene 6. *Immunology* 132, 287-95.
213. Feldmann, M., Brennan, F. M., Maini, R. N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14, 397-440.

214. Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Aguilar, L., Amalric, F., Girard, J. P. (2004) Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther* 6, 60-72.
215. Connor, A. M., Mahomed, N., Gandhi, R., Keystone, E. C., Berger, S. A. (2012) TNFalpha modulates protein degradation pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 14, R62.
216. Kinne, R. W., Brauer, R., Stuhlmuller, B., Palombo-Kinne, E., Burmester, G. R. (2000) Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2, 189-202.
217. Choy, E. H. and Panayi, G. S. (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344, 907-16.
218. Marshak-Rothstein, A. and Rifkin, I. R. (2007) Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 25, 419-41.
219. Andreakos, E., Sacre, S., Foxwell, B. M., Feldmann, M. (2005) The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 10, 2478-88.
220. Sacre, S. M., Drexler, S. K., Andreakos, E., Feldmann, M., Brennan, F. M., Foxwell, B. M. (2007) Could toll-like receptors provide a missing link in chronic inflammation in rheumatoid arthritis? Lessons from a study on human rheumatoid tissue. *Ann Rheum Dis* 66 Suppl 3, iii81-6.
221. Canto, E., Ricart, E., Monfort, D., Gonzalez-Juan, D., Balanzo, J., Rodriguez-Sanchez, J. L., Vidal, S. (2006) TNF alpha production to TLR2 ligands in active IBD patients. *Clin Immunol* 119, 156-65.
222. Howard, M. and O'Garra, A. (1992) Biological properties of interleukin 10. *Immunol Today* 13, 198-200.
223. Lalani, I., Bhol, K., Ahmed, A. R. (1997) Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79, 469-83.
224. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., Hymowitz, S. G. (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 29, 71-109.
225. Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R. N., Clark, R., Aguet, M., Schreiber, R. D. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-42.
226. Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., Akira, S. (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39-49.

7. BIBLIOGRAFIA

227. Fiorentino, D. F., Bond, M. W., Mosmann, T. R. (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170, 2081-95.
228. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., de Vries, J. E. (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-20.
229. Williams, O., Aroeira, L. S., Martinez, C. (1994) Absence of peripheral clonal deletion and anergy in immune responses of T cell-reconstituted athymic mice. *Eur J Immunol* 24, 579-84.
230. Kubin, M., Kamoun, M., Trinchieri, G. (1994) Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med* 180, 211-22.
231. Cassatella, M. A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M., Constantin, G. (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178, 2207-11.
232. Wang, P., Wu, P., Anthes, J. C., Siegel, M. I., Egan, R. W., Billah, M. M. (1994) Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood* 83, 2678-83.
233. Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C. (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174, 1549-55.
234. Mertz, P. M., DeWitt, D. L., Stetler-Stevenson, W. G., Wahl, L. M. (1994) Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 269, 21322-9.
235. Siegmund, B., Sennello, J. A., Lehr, H. A., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., Fantuzzi, G. (2004) Development of intestinal inflammation in double IL-10- and leptin-deficient mice. *J Leukoc Biol* 76, 782-6.
236. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-74.
237. Rios, F. J., Ferracini, M., Pecenin, M., Koga, M. M., Wang, Y., Ketelhuth, D. F., Jancar, S. (2013) Uptake of oxLDL and IL-10 Production by Macrophages Requires PAFR and CD36 Recruitment into the Same Lipid Rafts. *PLoS One* 8, e76893.
238. Parsons, M. S., Barrett, L., Little, C., Grant, M. D. (2008) Harnessing CD36 to rein in inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8, 184-91.

239. Tanabe, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamaguchi, S., Iida, H., Dohi, S., Kozawa, O. (2010) Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation* 7, 16.
240. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., Baumann, H. (1987) Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7251-5.
241. Jones, S. A. and Rose-John, S. (2002) The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta* 1592, 251-63.
242. Jones, S. A., Richards, P. J., Scheller, J., Rose-John, S. (2005) IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 25, 241-53.
243. Hodge, D. R., Hurt, E. M., Farrar, W. L. (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41, 2502-12.
244. Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G., Mantovani, A. (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6, 315-25.
245. Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., Farnarier, C. (2003) IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24, 25-9.
246. Xing, M., Firestein, B. L., Shen, G. H., Insel, P. A. (1997) Dual role of protein kinase C in the regulation of cPLA2-mediated arachidonic acid release by P2U receptors in MDCK-D1 cells: involvement of MAP kinase-dependent and -independent pathways. *J Clin Invest* 99, 805-14.
247. Gabay, C., Smith, M. F., Eidlen, D., Arend, W. P. (1997) Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest* 99, 2930-40.
248. Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G. M., Topley, N., Jones, S. A. (2001) Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14, 705-14.
249. Marin, V., Montero-Julian, F. A., Gres, S., Boulay, V., Bongrand, P., Farnarier, C., Kaplanski, G. (2001) The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol* 167, 3435-42.
250. Narimatsu, M., Maeda, H., Itoh, S., Atsumi, T., Ohtani, T., Nishida, K., Itoh, M., Kamimura, D., Park, S. J., Mizuno, K., Miyazaki, J., Hibi, M., Ishihara, K., Nakajima,

- K., Hirano, T. (2001) Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Mol Cell Biol* 21, 6615-25.
251. Curnow, S. J., Scheel-Toellner, D., Jenkinson, W., Raza, K., Durrani, O. M., Faint, J. M., Rauz, S., Wloka, K., Pilling, D., Rose-John, S., Buckley, C. D., Murray, P. I., Salmon, M. (2004) Inhibition of T cell apoptosis in the aqueous humor of patients with uveitis by IL-6/soluble IL-6 receptor trans-signaling. *J Immunol* 173, 5290-7.
252. Kimura, A. and Kishimoto, T. (2010) IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40, 1830-5.
253. Miossec, P. and Kolls, J. K. (2012) Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov* 11, 763-76.
254. Witowski, J., Ksiazek, K., Jorres, A. (2004) Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 61, 567-79.
255. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., Gurney, A. L. (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-4.
256. Schwandner, R., Yamaguchi, K., Cao, Z. (2000) Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med* 191, 1233-40.
257. Jovanovic, V., Dugast, A. S., Heslan, J. M., Ashton-Chess, J., Giral, M., Degauque, N., Moreau, A., Pallier, A., Chiffolleau, E., Lair, D., Usal, C., Smit, H., Vanhove, B., Soulillou, J. P., Brouard, S. (2008) Implication of matrix metalloproteinase 7 and the noncanonical wingless-type signaling pathway in a model of kidney allograft tolerance induced by the administration of anti-donor class II antibodies. *J Immunol* 180, 1317-25.
258. Shalom-Barak, T., Quach, J., Lotz, M. (1998) Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *J Biol Chem* 273, 27467-73.
259. McAleer, J. P. and Kolls, J. K. (2011) Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J Leukoc Biol* 90, 263-70.
260. Kolls, J. K., McCray, P. B., Jr., Chan, Y. R. (2008) Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* 8, 829-35.
261. Huang, W., Na, L., Fidel, P. L., Schwarzenberger, P. (2004) Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190, 624-31.
262. Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N., Lindemann, M. J., Ho, A. W., Hai, J. H., Yu, J. J., Jung, J. W., Filler, S. G., Masso-Welch, P., Edgerton, M.,

- Gaffen, S. L. (2009) Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206, 299-311.
263. Laan, M., Cui, Z. H., Hoshino, H., Lotvall, J., Sjostrand, M., Gruenert, D. C., Skoogh, B. E., Linden, A. (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162, 2347-52.
264. Laan, M., Prause, O., Miyamoto, M., Sjostrand, M., Hytonen, A. M., Kaneko, T., Lotvall, J., Linden, A. (2003) A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. *Eur Respir J* 21, 387-93.
265. Maertzdorf, J., Osterhaus, A. D., Verjans, G. M. (2002) IL-17 expression in human herpetic stromal keratitis: modulatory effects on chemokine production by corneal fibroblasts. *J Immunol* 169, 5897-903.
266. Jovanovic, D. V., Di Battista, J. A., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F. C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., Pelletier, J. P. (1998) IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160, 3513-21.
267. Prause, O., Bozinovski, S., Anderson, G. P., Linden, A. (2004) Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. *Thorax* 59, 313-7.
268. Albanesi, C., Cavani, A., Girolomoni, G. (1999) IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 162, 494-502.
269. Marder, W., Khalatbari, S., Myles, J. D., Hench, R., Yalavarthi, S., Lustig, S., Brook, R., Kaplan, M. J. (2011) Interleukin 17 as a novel predictor of vascular function in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 1550-5.
270. Erbel, C., Chen, L., Bea, F., Wangler, S., Celik, S., Lasitschka, F., Wang, Y., Bockler, D., Katus, H. A., Dengler, T. J. (2009) Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol* 183, 8167-75.
271. Kehlen, A., Thiele, K., Riemann, D., Langner, J. (2002) Expression, modulation and signalling of IL-17 receptor in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 127, 539-46.
272. Chabaud, M., Page, G., Miossec, P. (2001) Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* 167, 6015-20.
273. Lubberts, E., Joosten, L. A., van de Loo, F. A., Schwarzenberger, P., Kolls, J., van den Berg, W. B. (2002) Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II

- immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res* 51, 102-4.
274. Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.
275. Hata, K., Andoh, A., Shimada, M., Fujino, S., Bamba, S., Araki, Y., Okuno, T., Fujiyama, Y., Bamba, T. (2002) IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G1035-44.
276. Bamba, S., Andoh, A., Yasui, H., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y. (2003) Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. *J Gastroenterol* 38, 548-54.
277. Perussia, B., Dayton, E. T., Fanning, V., Thiagarajan, P., Hoxie, J., Trinchieri, G. (1983) Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J Exp Med* 158, 2058-80.
278. Young, H. A. and Hardy, K. J. (1995) Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 58, 373-81.
279. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-95.
280. Bach, E. A., Aguet, M., Schreiber, R. D. (1997) The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15, 563-91.
281. Jonasch, E. and Haluska, F. G. (2001) Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 6, 34-55.
282. Young, H. A. (1996) Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16, 563-8.
283. Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. (1999) Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 163, 4647-50.
284. Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J., Koyasu, S. (2001) IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 22, 556-60.
285. Gessani, S. and Belardelli, F. (1998) IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 117-23.
286. Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L., Lund, F. E. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1, 475-82.

287. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., Hume, D. A. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-89.
288. Shirayoshi, Y., Burke, P. A., Appella, E., Ozato, K. (1988) Interferon-induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear factors to the interferon consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5884-8.
289. Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K., Schmidtke, G. (2001) Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* 83, 367-72.
290. Belich, M. P., Glynn, R. J., Senger, G., Sheer, D., Trowsdale, J. (1994) Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 4, 769-76.
291. Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., Reith, W. (1996) Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14, 301-31.
292. Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., Yoshida, T. O. (1994) IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 857-61.
293. Gajewski, T. F. and Fitch, F. W. (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140, 4245-52.
294. Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M., Kovarik, P. (2002) IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest* 109, 1271-7.
295. Sakito, S., Ueki, Y., Eguchi, K., Kawabe, Y., Nagataki, S. (1995) Serum cytokines in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha with the characteristics of peripheral blood mononuclear cells. *Rheumatol Int* 15, 31-7.
296. Dolhain, R. J., ter Haar, N. T., Hoefakker, S., Tak, P. P., de Ley, M., Claassen, E., Breedveld, F. C., Miltenburg, A. M. (1996) Increased expression of interferon (IFN)-gamma together with IFN-gamma receptor in the rheumatoid synovial membrane compared with synovium of patients with osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 35, 24-32.
297. Panayi, G. S., Lanchbury, J. S., Kingsley, G. H. (1992) The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35, 729-35.
298. Fox, D. A. (1997) The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. *Arthritis Rheum* 40, 598-609.

