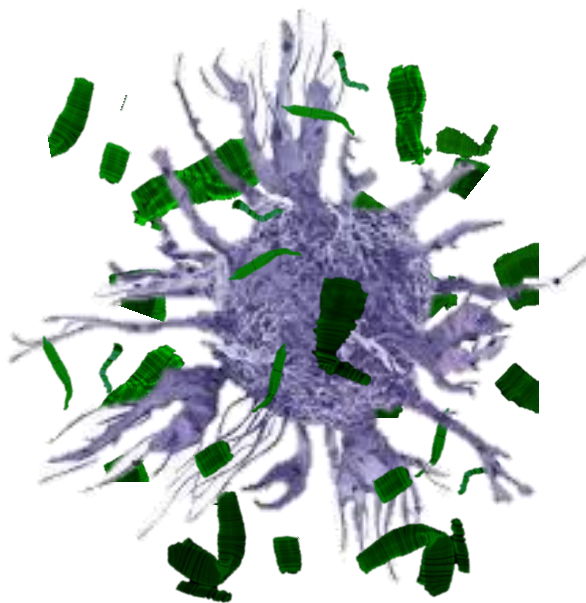


Tesis de Doctorado
PEDECIBA Biología, Biología celular y molecular

**Condicionamiento de células dendríticas por la
capa laminar de *Echinococcus granulosus*:
Búsqueda de agonistas y mecanismos a nivel de
señalización celular**



Lic. Álvaro Pittini

**Tutor: Dr. Álvaro Díaz
Co-tutora: Dra. Cecilia Casaravilla**

Octubre 2016

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis Tutores, Álvaro Díaz y Cecilia Casaravilla, que me acompañaron durante todo este camino. Álvaro, gracias por todas las enseñanzas, por siempre saber qué hacer cuando parece que se cierran todas las puertas, por mostrarme nuevas formas de pensar, y por contagiarme las ganas de hacer buena ciencia. Ceci, gracias por las incontables horas de mesada compartidas, donde me ensañaste todo lo que se, por las charlas motivantes en el flujo laminar, y por ser la mejor guía turística que pude pedir cuando lo necesite.

En segundo lugar quiero agradecer a todos los integrantes del laboratorio de Inmunología, a los que están y a los que no. A mis compañeros de laboratorio gracias por hacer del lugar de trabajo un sitio donde siempre te dan ganas de volver al otro día, por soportarme tanto tiempo (yo sé que no es fácil), por bancar los temones de verano, por las incontables discusiones de ciencia y no tan ciencia, y por siempre estar dispuestos ayudarme. Especialmente, quisiera agradecer a la “casita del medio”, a Silvi, Maite, María, Anabella, y a todos los nuevos integrantes que forman un grupo hermoso. A los jefes también quiero agradecerles, a Gustavo Salinas por contagiarme un poco de toda la pasión que siente por la ciencia, a Ana Ferreira por estar siempre con las palabras justas en el momento indicado, ya sea para planear un experimento o para darme fuerzas, a Cecilia Fernandez por siempre estar cuando precisé ayuda, por las incontables horas de charlas en el “party” sobre la vida y la ciencia. Además, quiero agradecer a Gabriel Lassabe, Martín Fló y Andrés González por ser unos amigos increíbles, por los mil almuerzos terapéuticos y la buena onda que le ponen al laboratorio. En particular, quisiera agradecer a Paula Seoane, por la buena onda, por las eternas discusiones sobre pLL, por estar siempre en los buenos y en los malos momentos, por bancarme tantas veces la cabeza, y por hacer de la mesada y la post-mesada algo muy divertido.

También quisiera agradecer a todas las personas que me ayudaron durante esta Tesis. A Judith Allen por recibirme en su laboratorio y permitirme hacer y deshacer toda clase de experimentos, a Dominik Rückerl por la disponibilidad y la paciencia para enseñarme a hacer

y no deshacer tantos experimentos. A Celia Quijano por toda la ayuda y las discusiones sobre metabolismo celular.

Por último, quiero agradecer a mi familia, a todos mis amigos y, en especial, a Naty por preocuparse siempre, por bancarme la cabeza, por soportarme de mal humor cuando no me salían las cosas, por escucharme hablar de pLL mil horas sin quejarse, por apoyarme y darme fuerzas; en fin, gracias por estar siempre.

Resumen

El estadio larvario del parásito cestodo *Echinococcus granulosus* causa la enfermedad conocida como hidatidosis quística, en ungulados domésticos, y accidentalmente en el ser humano. La infección se caracteriza por el crecimiento en órganos internos de larvas llenas de líquido, llamadas hidátides. Cada hidátide está delimitada por una pared, compuesta por una delgada capa celular interna y una cubierta protectora acelular externa gruesa (denominada capa laminar, CL), formada básicamente por mucinas, y que a consecuencia del crecimiento del parásito libera materiales insolubles. Si bien el parásito larvario es claramente capaz de controlar la respuesta inflamatoria del hospedero, poco se sabe acerca de los agonistas o mecanismos de acción a través de los cuales lo logra. Nuestro grupo se ha centrado en el estudio de la respuesta de células dendríticas (DCs) a la CL. Los datos previos a esta Tesis indicaban que la exposición a una suspensión acuosa de partículas de la CL (pLL), induce en las DCs fenotipos de maduración no convencionales, que pueden ser considerados “semi-maduros”. En detalle, la exposición de DCs a pLL *in vitro* inhibe la expresión de IL-12 y CD40, y potencia la expresión de IL-10, inducidas por agonistas de TLRs. Además causa el aumento de la expresión de la molécula coestimuladora CD86, tanto en presencia como en ausencia de agonistas de TLRs. Las alteraciones en moléculas de coestimulación y la potenciación de IL-10 se observan asimismo *in vivo*, en DCs peritoneales luego de inyección intraperitoneal de pLL, sin o con coinyección de LPS.

Los estudios realizados en esta Tesis se pueden dividir en dos grandes etapas. La primera buscó identificar los componentes activos presentes en pLL responsables de inducir los fenotipos semi-maduros observados en DCs, y la segunda trató de comprender los mecanismos por los cuales se inducen dichos fenotipos.

Los resultados de la primera etapa indican que la actividad de pLL deriva principalmente de su componente de origen parasitario, con una contribución marginal de las inmunoglobulinas del hospedero asociadas. Si bien no se identificaron agonistas a nivel molecular responsables de la actividad, se determinó que la misma requiere de la integridad de los enlaces disulfuro que se presumen unen los esqueletos peptídicos mucínicos. Los resultados de la segunda etapa indican que la estimulación de DCs con pLL en presencia de LPS inhibe la activación de Akt, efector de la vía de PI3K, y en consecuencia la fosforilación

de GSK-3, siendo estos cambios responsables de la inhibición en la expresión de CD40. La actividad de pLL sobre el resto de los parámetros estudiados, que no se explica por los cambios en Akt/GSK-3, depende de la presencia de la fosfatasa SHIP, que en cambio es dispensable para la inhibición de CD40. Esto sugiere la presencia de dos mecanismos de señalización independientes que involucran a Akt/GSK-3 y SHIP respectivamente. Todos los efectos de pLL requieren la participación de filamentos de actina y PI3K de clase I. Sin embargo, no se observó fagocitosis de pLL, sugiriendo un mecanismo por contacto en membrana plasmática. Estas observaciones, junto con la ausencia de agonistas evidentes a nivel molecular, así como la participación, también observada, de la quinasa Syk, sugieren que pLL probablemente señalice por un mecanismo independiente de receptor, denominado MATS (del inglés, *Membrane Affinity Triggered Signaling*), propuesto para los efectos sobre DCs de varios otros materiales particulados.

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP (del inglés, *AMP-activated protein kinase*)

Arg-1: Arginasa-1

ATP: Adenosín trifosfato (del inglés, *adenosine triphosphate*)

BAD: Promotor de muerte celular asociado a Bcl-2 (del inglés, *Bcl-2-associated death promoter*)

BCAP: Adaptador en células B para PI3K (del inglés, *B cell adaptor for PI3K*)

BMDC: Célula dendrítica derivada de medula ósea (del inglés, *Bone Marrow Dendritic Cells*)

BMDM: Macrófagos derivados de medula ósea (del inglés, *Bone Marrow-Derived Macrophages*)

BSA: Sero albúmina bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)

CBB: Azul brillante de Coomassie

cDC: Célula dendrítica convencional

CL: Capa Laminar

CUM : Cristales de urato monosódico

Cyt D: Citocalasina D

DC: Célula Dendríticas, (del inglés, *Dendritic cell*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: Ditiotreitól

ECAR: Tasa de acidificación extracelular (del inglés, *extracellular acidification rate*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona

FcR: Receptores de regiones Fc

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

Flt3L-BMDC: Células dendríticas derivadas de medula ósea en presencia del factor Flt3L

FOXO: Del inglés, *Forkhead Box O*

G100: Partículas de Sephadex G-100

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (del inglés, *Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

GSK-3: Glucógeno sintasa quinasa 3 (del inglés, *glycogen synthase kinase 3*)

HRP: Del inglés *horseradish peroxidase*

IAA: Iodoacetamida

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa (del inglés, *indolamine 2,3-dioxygenase*)

Ig: Inmunoglobulinas

IKK: Quinasa de I κ B (del inglés, *I κ B Kinase*)

IL: Interlequina

ILC2: Célula linfoide innata tipo 2 (del inglés, *innate lymphoid cells type 2*)

INF: Interferón

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, *inducible nitric oxide synthase*)

InsP6Ca: Myo-inositol hexakisfosfato

IRF: Factor regulador de interferón (del inglés, *interferon regulatory factor*)

ITAM: Del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

ITIM: Del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

I κ B: Inhibidor de κ B (del inglés, *inhibitor of κ B*)

KO: Del inglés, *Knockout*

LAL: Lisado de amebocitos del Limulus

LPS: Lipopolisacárido (del inglés, *Lipopolysaccharide*)

LX BSA: Esferas de látex con BSA adsorbido

Lx Ig: Esferas de látex con Ig adsorbida

Lx: Esferas de látex

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés, *Mitogen-activated protein kinase*)

MATS: Señalización por afinidad a membrana (del inglés, *Membrane Affinity Triggered Signaling*)

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos (del inglés, *Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

MGL2: Lectina de macrófagos tipo galactosa tipo C 2 (del inglés, *macrophage galactose-type C-type lectin 2*)

MHC: Complejo Mayor de histocompatibilidad (del inglés, *Major Histocompatibility Complex*)

moDC: Célula dendrítica derivada de monocito

MS: Espectrometría de masa (del inglés, *mass spectrometry*)

Ms: Microesferas

mTORC: Diana de rapamicina en células de mamífero (del inglés, *mammalian Target of Rapamycin Complex*)

MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88 (del inglés, *Myeloid differentiation primary response gene 88*)

NFκB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, *Nuclear Factor Kappa B*)

NO: Óxido nítrico

OCR: Tasa de consumo de oxígeno (del inglés, *oxygen consumption rate*)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)

pDC: Célula dendrítica plasmocitoide

PD-L2: Ligando de muerte programada 2 (del inglés, *programmed death Ligand-2*)

PH: Dominio con homología a pleckstrina (del inglés, *Pleckstrin homology*)

PHLPP: Del inglés, *PH domain and leucine-rich repeat phosphatase cross-talk*

PI(4,5)P2: Fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*)

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés, *Phosphoinositide 3-kinase*)

PI3P: Fosfatidilinositol 3-fosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol 3-phosphate*)

PIP3: Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)

pLL: Preparación particulada de la CL (del inglés, *particulate Laminated Layer*)

PNA: Del inglés, *peanut agglutinin*

PP2A: Fosfatasa 2A (del inglés, *Protein phosphatase-2A*)

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, *pattern recognition receptors*)

PTEN: Fosfatasa homóloga de la tensina (del inglés, *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*)

PVDF: Membranas de fluoruro de polivinilideno

PX: Homología Phox (del inglés, *Phox homology*)

SDS-PAGE: Del inglés, *SDS-polyacrylamide gel electroforesis*

SEA: Antígenos solubles de huevos (del inglés, *soluble egg antigen*)

Ser: Serina

SFB: Suero fetal bovino

SH2; Homología al dominio 2 de la Src (del inglés, *Src homology 2*)

SHIP: Inositol 5' fosfatasa conteniendo SH2 (del inglés, *SH2-containing inositol 5'-phosphatase*)

sLL: Preparación "soluble" de la CL (del inglés, *soluble laminar layer*)

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción (del inglés, *Signal transducer and activator of transcription*)

Syk: Del inglés, *Spleen tyrosine kinase*

TBK1: Quinasa 1 de unión a TANK (del inglés, *TANK-binding kinase 1*)

TCA: Ácido tricloroacético

TCR: Receptor de linfocitos T (del inglés, *T-cell receptor*)

TGF: Factor de crecimiento tumoral (del inglés, *Tumor grow factor*)

Th: Linfocito T colaborador (del inglés, *T helper*)

Thr: Treonina

Tio-Mac: Macrófagos reclutados por Tioglicolato

Tip-DC: Célula dendrítica productora de TNF y iNOS (del inglés, *TNF and iNOS producing DCs*)

TLR: Receptor tipo toll (del inglés, *Toll Like Receptor*)

TMB: Tetrametilbencidina

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés, *Tumor necrosis factor*)

T-R: Del inglés, *Tissue-Ruptor*

Treg: Linfocito T regulador

TRIF: Adaptador que contiene dominio TIR inductor de interferón β (del inglés, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*)

TSC: Complejo de Esclerosis Tuberosa (del inglés, *Tuberous Sclerosis Complex*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *vascular endothelial growth factor*)

VPS34: Proteína de Clasificación Vacuolar 34 (del inglés, *vacuolar protein sorting 34*)

Índice de contenido

Agradecimientos.....	i
Resumen.....	iii
Lista de abreviaturas.....	v
1 Introducción.....	1
1.1 Echinococcus granulosus.....	1
1.1.1 Ciclo de vida de <i>E. granulosus</i>	2
1.1.2 Estructura de la hidátide.....	3
1.1.3 Capa Laminar.....	4
1.2 Inmunobiología de helmintos, con énfasis en células dendríticas.....	7
1.2.1 Células dendríticas.....	7
1.2.2 Generalidades sobre respuestas inmunes a parásitos helmintos.....	10
1.2.3 Células dendríticas en la respuesta inmune Th2.....	12
1.2.4 Células dendríticas tolerogénicas.....	14
1.2.5 Respuestas de células dendríticas a productos de parásitos helmintos.....	14
1.2.6 Respuesta inmune en infecciones por <i>Echinococcus granulosus</i>	15
1.2.7 La capa laminar y la respuesta reguladora en la hidatidosis.....	17
1.3 Vías de señalización: NFκB, MAPKs, PI3K/Akt.....	19
1.3.1 Vía de NFκB.....	20
1.3.2 Vías de las MAPKs.....	21
1.3.3 Vía de PI3K/Akt.....	22
1.3.3.1 PI3K de clase I.....	22
1.3.3.2 Regulación de la vía de PI3K/Akt.....	26
1.3.3.3 SHIP.....	27
1.3.3.4 PI3K de clase II y III.....	29

1.3.3.5 Cambios en la vía de PI3K/Akt y metabólicos asociados con la maduración de DCs.	30
2. Objetivos.....	32
2.1 Objetivo general.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 Materiales y métodos.....	34
3.1 Muestras de origen biológico.....	34
3.1.1 Obtención de paredes de hidátides de <i>E. granulosus</i>	34
3.1.2 Producción de una suspensión de partículas de la capa laminar: pLL.....	34
3.1.3 Generación de nuevas preparaciones de la capa laminar: modificaciones físicas.....	35
3.1.3.1 pLL generado a partir de deshidratación por alcohol/acetona.....	35
3.1.3.2 Partículas de CL de tamaño mayor a 85 μm	36
3.1.3.3 Partículas de CL obtenidas por procesamiento con <i>Tissue-Ruptor</i>	36
3.1.3.4 Capa laminar “soluble”	36
3.1.4 Generación de nuevas preparaciones de la capa laminar: modificaciones químicas o enzimáticas.....	37
3.1.4.1 Tratamiento proteolítico.....	37
3.1.4.2 Tratamiento de oxidación de azúcares con metaperiodato de sodio.....	38
3.1.4.3 Tratamiento de reducción de enlaces disulfuros con ditioneitol.....	38
3.1.5 Extracción e identificación de proteínas del hospedero adsorbidas a pLL.....	39
3.2 Materiales sintéticos: Sephadex-G100, Lx BSA y Lx IgG.....	40
3.3 Técnicas para la visualización de pLL.....	41
3.3.1 Marcado de pLL con isotiocianato de fluoresceína.....	41
3.3.2 Marcado de pLL con la lectina PNA.....	41
3.4 Métodos generales de cultivo celular.....	42
3.4.1 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea: BMDC.....	42
3.4.2 Generación de macrófagos derivados de médula ósea: BMDM.....	43

3.4.3 Obtención de macrófagos peritoneales provenientes de estimulación con medio tioglicolato.....	44
3.4.4 Ensayos de la actividad de pLL sobre BMDCs.....	45
3.4.5 Ensayos de la actividad de pLL sobre Tio-Mac.....	45
3.4.6 Adsorción de sLL a placas de cultivo, y evaluación de la actividad sobre BMDCs.....	46
3.4.7 Ensayo de bloqueo de FcR γ II/III en BMDCs.....	46
3.4.8 Evaluación de la actividad de un péptido sintético sobre BMDCs.....	47
3.4.9 Evaluación de fagocitosis en BMDCs expuestas a pLL.....	47
3.4.10 Estudios de la actividad de pLL sobre BMDCs empleando inhibidores químicos.....	48
3.4.11 Generación de lisados celulares.....	49
3.5 Técnicas generales de análisis.....	49
3.5.1 Precipitación con ácido tricloroacético (TCA).....	49
3.5.2 SDS-PAGE.....	49
3.5.3 Tinción con azul brillante de Coomassie (CBB).....	50
3.5.4 Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).....	50
3.5.5 Western blot.....	50
3.5.6 Citometría de flujo.....	53
3.5.7 Determinación de la viabilidad por To-Pro3.....	54
3.5.8 Cuantificación de citoquinas por ELISA.....	54
3.5.9 Cuantificación de nitritos. Ensayo de Griess	55
3.5.10 Medidas de la tasa de consumo de O ₂ y la velocidad de acidificación extracelular...	55
3.6 Análisis estadístico.....	58
4 Resultados.....	59
4.1 Exploración de si la actividad de pLL sobre BMDCs está presente en otras presentaciones físicas de la CL.....	59
4.2 Identificación de proteínas del hospedero presentes en pLL, y evaluación de la contribución de las mismas a la actividad observada sobre BMDCs.....	70

4.3 Evaluación de la contribución de los componentes glucídicos y proteicos a la actividad de pLL sobre BMDCs.....	83
4.4 Identificación de posibles cambios en las vías de señalización intracelular NFκB, MAPKs y PI3K/Akt inducidos por pLL en BMDCs.....	95
4.5 Evaluación de la participación de la vía de PI3K/Akt en la actividad inmunoreguladora de pLL sobre BMDCs.....	104
4.6 Exploración de la forma de interacción y el mecanismo que gatilla la respuesta a pLL en BMDCs.....	135
4.7 Evaluación de la actividad de pLL sobre el metabolismo glicolítico aeróbico y la producción de óxido nítrico en BMDCs.....	143
4.8 Estudio de los efectos de la inhibición de PI3K de clase I y de clase III sobre la producción de citoquinas inducidas por agonistas de TLRs en BMDCs.....	147
5 Discusión.....	148
5.1 Evaluación de la actividad de diferentes presentaciones físicas de la CL.....	149
5.2 Participación de distintos componentes presentes en pLL a su actividad: búsqueda de agonistas.....	149
5.3 Evaluación de los cambios en vías centrales de señalización inducidos por pLL en BMDCs.....	150
5.4 Conexión entre la inhibición de la vía de PI3K/Akt y la actividad de pLL en términos de marcadores de superficie y citoquinas.....	151
5.5 Señalización proximal en respuesta pLL en BMDCs.....	159
5.6 Integración entre la señalización propuesta que lleva al fenotipo semi-maduro y la posible señalización por MATS en respuesta a pLL.....	162
5.7 Efectos de pLL sobre el metabolismo y sobre la producción de óxido nítrico en BMDCs.....	167
5.8 Desglose de los efectos de las PI3K de clase I y III sobre la producción de citoquinas en BMDCs estimuladas con agonistas de TLR.....	167
5.9 Perspectivas.....	169
6 Referencias.....	174
7 Anexo 1.....	197

8 Anexo 2.....	206
----------------	-----

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1.1 Prevalencia mundial de la echinococcosis quística, evaluada mediante genotipificación por secuenciación de ADN.....	1
Tabla 1.1. Especies de <i>E. granulosus</i> y algunas características de su infección.....	2
Figura 1.2 Ciclo de vida del <i>Echinococcus granulosus</i>	3
Figura 1.3 Esquema de la estructura del quiste hidático.....	4
Figura 1.4 Microscopía electrónica de la capa laminar de <i>E. granulosus</i>	5
Figura 1.5 Organización molecular de apomucinas expresadas únicamente por la capa germinativa.....	7
Figura 1.6 Diferentes estados de maduración de DCs se encuentran asociados a diferentes tipos de respuesta T.....	13
Figura 1.7 Resumen de aspectos de la respuesta inmune a <i>E. granulosus</i> en el hospedero intermediario.....	17
Figura 1.8 Diferencias fenotípicas BMDCs estimuladas con agonista de TLR vs agonista de TLR más pLL.....	18
Figura 1.9 Esquema de señalización de la vía PI3K/Akt.....	24
Figura 1.10 Resumen de los efectos sobre los parámetros estudiados en esta Tesis del eje PI3K/Akt/GSK-3 y de la fosfatasa SHIP1.	28
Tabla 3.1. Inhibidores utilizados en los estudios de la actividad de pLL sobre vías de señalización intracelular.....	48
Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados para <i>Western blot</i>	52
Tabla 3.3. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.....	53
Tabla 3.4. Inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa.....	57

Figura 3.1. Esquema de los parámetros de respiración mitocondrial cuantificables por medidas de consumo de oxígeno (OCR) utilizando inhibidores y un desacoplante de la fosforilación oxidativa.....	57
Figura 4.1. La actividad de pLL no depende de los métodos de deshidratación utilizados para su generación.....	61
Figura 4.2. La actividad de pLL depende del tamaño de partícula.....	63
Figura 4.3. La CL presenta actividad independientemente de su deshidratación.....	65
Figura 4.4. La actividad de pLL no es intrínseca de materiales particulados en general.....	67
Figura 4.5. La "solubilización" de la CL causa la pérdida de la actividad sobre la IL-10 pero no sobre la IL-12 p40.....	69
Figura 4.6. Identificación y extracción de proteínas del hospedero adsorbidas a pLL.....	72
Figura 4.7. Actividad sobre BMDCs de pLL generado a partir de CL de origen bovino o ratón.....	74
Figura 4.8. La actividad sobre BMDCs de un látex con IgG adsorbida es similar a la observada en pLL.....	76
Figura 4.9. Efecto de un anticuerpo bloqueante de FcR γ RII/III sobre la actividad de pLL y Lx IgG en BMDCs.....	78
Figura 4.10. Efecto de la citocalasina D sobre la actividad de pLL y Lx IgG sobre BMDCs.....	80
Figura 4.11. La actividad de pLL es independiente de la presencia de Ig adsorbidas al mismo.....	82
Figura 4.12. El tratamiento de pLL con IO4-/BH4- anula el reconocimiento por PNA.....	84

Figura 4.13. Evaluación del papel del componente glucídico de pLL en la actividad sobre BMDCs.....	85
Figura 4.14. Evaluación del papel de los componentes proteicos de pLL en el sesgo inducido sobre la producción de citoquinas en BMDCs.....	88
Figura 4.15. La actividad de pLL es sensible a la reducción de enlaces disulfuros con ditiotreitól.....	91
Figura 4.16. Evaluación de la actividad de péptido candidato sintético sobre el sesgo fenotípico inducido por pLL en BMDCs.....	93
Figura 4.17. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la vía de NFκB: IκBκ y p105.....	96
Figura 4.18. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la vía de las MAPKs: JNK/SAPK, p38 y ERK1/2.....	98
Figura 4.19. El inhibidor UO126 no inhibe la actividad de pLL sobre BMDCs.....	100
Figura 4.20. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la vía de PI3K/Akt.....	102
Figura 4.21. Exploración del efecto de la estimulación de pLL sobre la fosforilación de Akt en macrófagos.....	103
Figura 4.22. Esquema de las vías de señalización estudiadas, e inhibidores específicos de alguna de las proteínas involucradas.....	104
Figura 4.23. Efecto del inhibidor wortmanina sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	106
Figura 4.24. Efecto de la inhibición de PI3K de clase III sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	109
Figura 4.25. Efecto del inhibidor SAR405 sobre la actividad de pLL en BMDCs empleando una dosis más baja de LPS.....	110

Figura 4.26. Efecto de la inhibición de SGKs sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	111
Figura 4.27. Efecto del inhibidor GDC-0941 sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	114
Figura 4.28. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de PTEN.....	115
Figura 4.29. Efecto del inhibidor 3 α -aminocolestano sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	117
Figura 4.30. Comparación del efecto de pLL sobre BMDCs derivadas de ratones <i>Wild type</i> y SHIP1 -/-.....	119
Figura 4.31. Evaluación de la fosforilación de Akt (Ser473) en BMDCs estimuladas con pLL-DTT en presencia de LPS.....	120
Figura 4.32. Efecto del inhibidor triciribina a concentración 1.5 μ M sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	123
Figura 4.33. Efecto del inhibidor Triciribina a 10 μ M sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	124
Figura 4.34. Efecto del inhibidor Akt VIII sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	126
Figura 4.35. Estudio del efecto de BMDCs estimuladas con pLL sobre las quinasas relacionadas a IKKs, TBK1 y IKK ϵ	127
Figura 4.36. Efecto del inhibidor amlexanox sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	129
Figura 4.37. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de p70S6K.....	130
Figura 4.38. Efecto de la inhibición de mTORC1 sobre la actividad de pLL en	

BMDCs.....	131
Figura 4.39. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de GSK3.....	132
Figura 4.40. Efecto del inhibidor SB216763 sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	134
Figura 4.41. BMDCs incubadas con pLL-FITC.....	136
Figura 4.42. Estudio de la capacidad de fagocitosis en BMDCs.....	138
Figura 4.43. Las BMDCs son capaz de interactuar con pLL a nivel de membrana plasmática.....	141
Figura 4.44. Efecto del inhibidor piceatanol sobre la actividad de pLL en BMDCs.....	142
Figura 4.45. Evaluación de la función mitocondrial de BMDCs estimuladas con pLL.....	144
Figura 4.46. Evaluación de la producción de NO (en términos de nitrito) en sobrenadantes por BMDCs estimuladas con pLL.....	145
Figura 4.47. Evaluación de la glicólisis aeróbica en BMDCs estimuladas pLL.....	146
Figura 5.1. Esquema de los posibles mecanismos moleculares planteados que controlan los cambios inducidos por pLL en los parámetros estudiados en BMDC.....	155
Figura 5.2. Esquema indicando los posibles mecanismos moleculares planteados que controlan los cambios inducidos por pLL, presentes en diferentes modelos de DCs (BMDCs y Flt3L-BMDCs) y de macrófagos (Tio-Macs y BMDMs).....	159
Figura 5.3. Mecanismo hipotético de señalización por MATS y comparación entre la señal disparada por MATS y por la interacción ligando receptor.....	163
Figura 5.4. Contribución propuesta a nivel de señalización de las Igs asociadas a pLL.....	165
Figura 5.5. Eventos de señalización propuestos inducidos por pLL (sin considerar las Igs asociadas) y efectos a nivel de citoquinas y moléculas coestimuladoras, en el contexto de	

coestimulación con LPS.	166
Figura 7.1. Estrategia de <i>gating</i> de BMDCs.....	197
Tabla 7.1. Control de la viabilidad celular por TO-PRO-3, para BMDCs tratadas con diferentes estímulos utilizados en este trabajo.....	198
Figura 7.2. Estrategia de <i>gating</i> de Tio-Mac.....	199
Figura 7.3. Exploración de los efectos de tratamientos con proteasas, sobre el sesgo inducido en citoquinas producidas por BMDCs.....	200
Figura 7.4. Evaluación de la extracción de proteínas del hospedero por tratamientos pH2 y DTT.....	201
Figura 7.5. pLL inhibe la expresión de IL-12p70 inducida por LPS en BMDCs.....	202
Material 7.6. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de SGK en la posición Ser422.....	203
Figura 7.7. El oxamato inhibe el glicólisis aeróbica en BMDCs estimuladas pLL.....	204
Figura 7.8. Actividad de pLL sobre la expresión de moléculas coestimuladoras en macrófagos reclutados por tioglicolato estimulados con LPS.....	205

A mis padres,

1 Introducción

1.1 *Echinococcus granulosus*

Echinococcus granulosus es un parásito cestodo que presenta una gran distribución a nivel mundial. Este parásito es el agente causante de la zoonosis conocida como hidatidosis o equinococosis quística (1). Específicamente, esta enfermedad cobra relevancia en países con una fuerte actividad ganadera, como es el caso de Uruguay. Estudios realizados en el año 2000 indican pérdidas que podrían alcanzar los 22.1 millones de dólares americanos anuales en nuestro país (2).

La infección por *E. granulosus*, tal como la especie estaba definida hasta hace unos 10 años, presentaba una alta variabilidad en cuanto a la especificidad de huésped, epidemiología, morfología, fisiología y genética (3). Sin embargo, en los últimos años, análisis filogenéticos mitocondriales permitieron clasificar a la mayoría de los genotipos existentes en nuevas especies (Tabla 1.1) (4, 5). Así, lo que antes se consideraba la especie *E. granulosus* ahora se considera un grupo de especies, llamado *E. granulosus sensu lato*. Dentro de estas especies identificadas, la más relevante epidemiológicamente debido a su gran distribución es *E. granulosus sensu stricto* (el antiguo genotipo G1). Esta es la especie más frecuente en América del Sur, y en nuestro país en particular (Figura 1.1) (4).

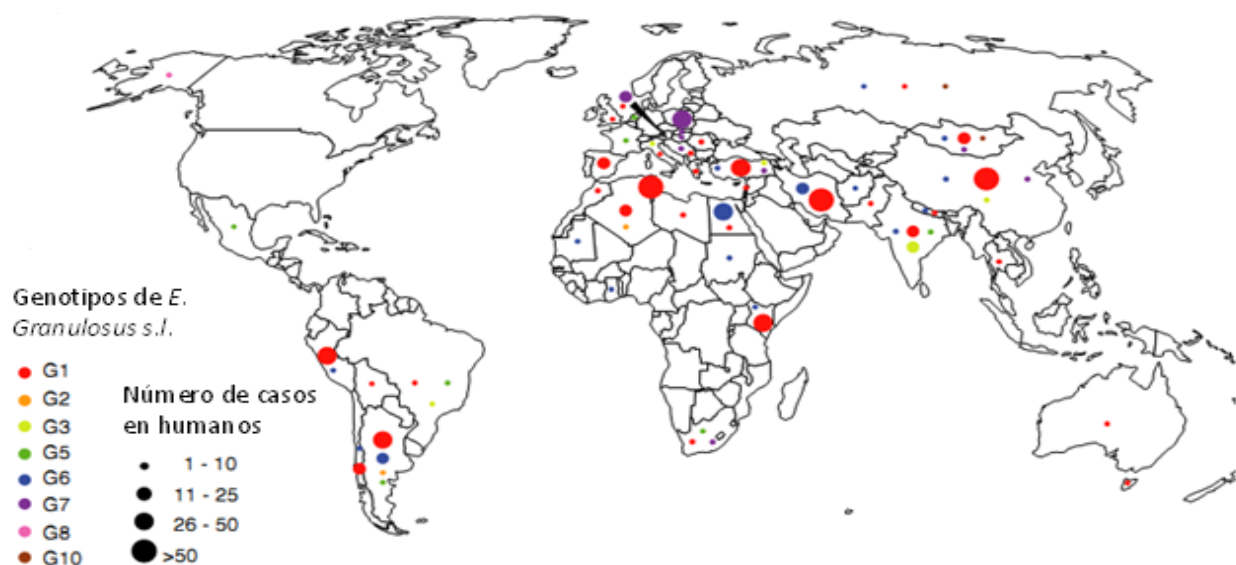


Figura 1.1 Prevalencia mundial de la echinococosis quística, evaluada mediante genotipificación por secuenciación de ADN. Adaptado de (4).

Tabla 1.1. Especies de *E. granulosus* y algunas características de su infección. Descripción de las especies, los genotipos, la distribución, los hospederos definitivos, los hospederos intermediarios y la presencia de infecciones en humanos (5).

Especie	Genotipos	Distribución	Hospedero definitivo	Hospedero intermediario	Infecciones en humanos
<i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i>	G1, G2 y G3	Mundial	Perro	Oveja, cabra y ganado bovino	Comunes
<i>Echinococcus equinus</i>	G4	Mundial	Perro	Caballos	Desconocidas
<i>Echinococcus ortleppi</i>	G5	Mundial	Perro	Ganado bovino	Poco comunes
<i>Echinococcus canadensis</i>	G6, G7, G8 y G10	Mundial	Perro (G6/G7) Lobo (G8) Perro (G10)	Cerdo, camello, ganado, cabra y oveja (G6/G7) Alce y ciervo (G8) Alce, ciervo y reno (G10)	Poco comunes
<i>Echinococcus felidis</i>	"Cepa de León"	África	León	Desconocido	Desconocidas

1.1.1 Ciclo de vida de *E. granulosus*

El ciclo de vida de *E. granulosus* (*sensu lato*) es complejo (Figura 1.2). En el mismo, los perros u otros cánidos (o el león para el caso de *E. felidis*) sirven como hospederos definitivos, es decir alojan al estadio adulto, mientras que algunos ungulados domésticos o salvajes sirven como hospederos intermediarios, es decir alojan al estadio larvario. De forma breve, el estadio adulto es un gusano con morfología parecida a las tenias pero pequeño (3-6 mm de largo) que se aloja en el intestino delgado, donde produce huevos que son liberados junto con las heces. Los hospederos intermediarios ingieren los huevos, los cuales eclosionan en el tracto digestivo liberando oncoesferas capaces de penetrar la pared intestinal y migrar por el sistema circulatorio hacia varios órganos blancos (principalmente hígado y pulmón). Una

vez en el órgano, la oncoesfera se desarrolla en forma de una estructura unilocular llena de líquido (hidátide). Ésta aumenta su tamaño gradualmente produciendo en su interior los precursores de la forma adulta (llamados protoescólices), y ocasionalmente además hidátides hijas. El hospedero definitivo se infecta al ingerir órganos de hospedadores intermedios infectados con hidátides fértiles (es decir, que contienen protoescólices). Luego de ser ingeridos los protoescólices evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal, donde en el transcurso de 32 a 80 días se desarrollan al estadio adulto. El ser humano se infecta al ingerir vegetales o aguas contaminadas; es un hospedador intermedio accidental, que no contribuye al ciclo del parásito (6, 7).

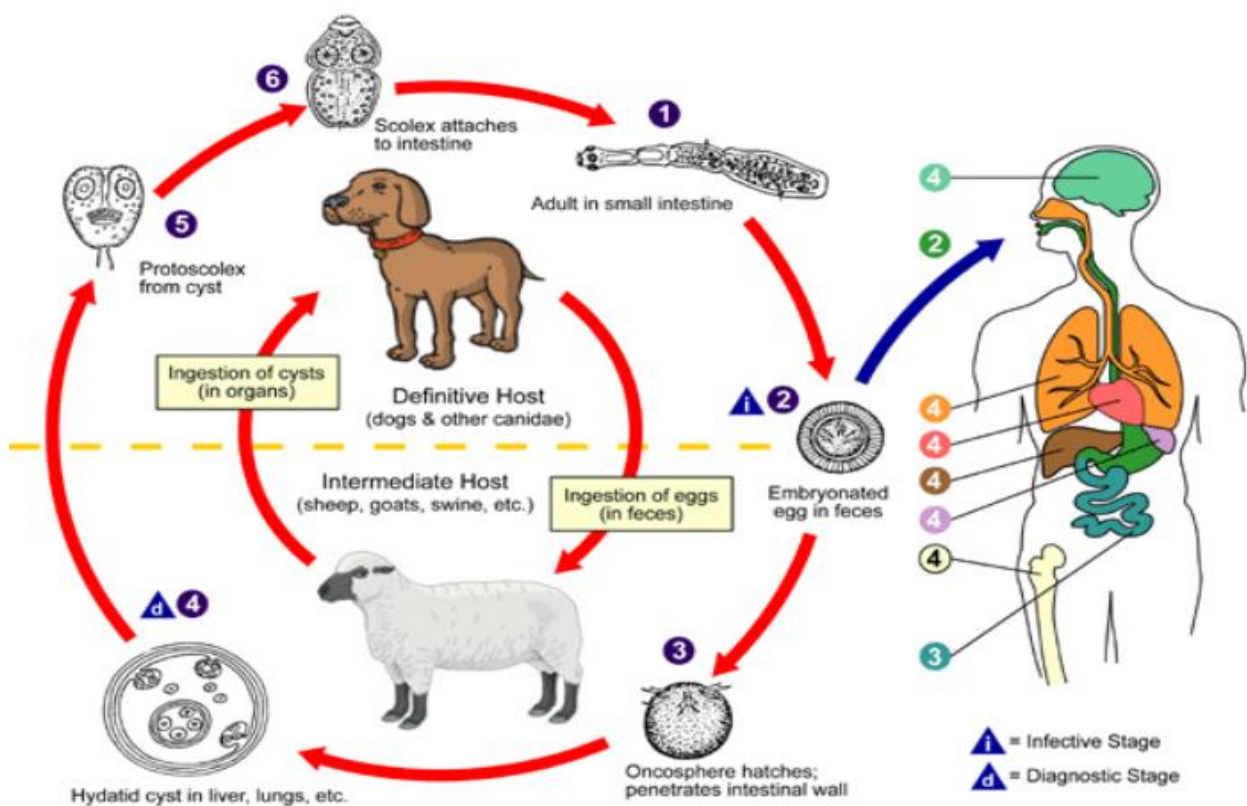


Figura 1.2 Ciclo de vida del *Echinococcus granulosus*. Imagen adaptada de (7).

1.1.2 Estructura de la hidátide

La hidátide está delimitada por una pared, compuesta a su vez por una delgada capa celular interna, denominada capa germinativa, encargada de la síntesis de todos los componentes de la estructura, y una cubierta protectora acelular externa, de grosor variable, denominada capa laminar (CL) (8, 9). Además, la hidátide se encuentra rodeada por una cápsula de

colágeno producida por el hospedero (capa adventicia), o por una zona de reacción inflamatoria local activa con infiltración de leucocitos; existen también diversas situaciones intermedias entre estos extremos, dependiendo del grado de adaptación del parásito al hospedero. La encapsulación con colágeno es indicativo de una buena adaptación parásito-hospedador, y en este contexto en el cual generalmente se desarrollan hidátides fértiles (10, 11). En conjunto la hidátide con las estructuras del hospedero forman el quiste hidático (Figura 1.3).

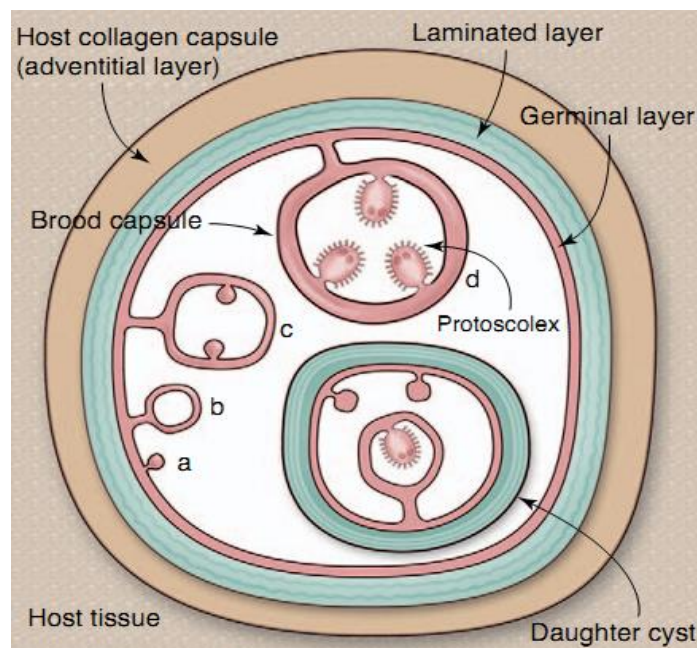


Figura 1.3 Esquema de la estructura del quiste hidático. Se indican: la capsula de colágeno generada por el hospedero (en inglés, *host collagen capsule*), la capa laminar (en inglés, *laminated layer*), la capa germinal (en inglés, *germinal layer*), los protoescólices (en inglés, *protoescólex*) y las hidátides hijas (en inglés, *daughter cyst*). Imagen tomada de (8).

1.1.3 Capa Laminar

La CL es una matriz extracelular extraordinaria, tanto por sus dimensiones (hasta 2-3 mm de espesor) como por su composición, particularmente rica en azúcares. Es una estructura hidrofílica insoluble, mecánicamente resistente y elástica. El nombre CL deriva de las láminas concéntricas que la conforman, visibles al microscopio de luz. Si se utiliza un microscopio electrónico es posible observar que estas laminaciones corresponden a diferentes grados de compactación de un único tipo de ultraestructura, consistente en una red de fibrillas y abundantes cúmulos de gránulos dispersos entre ellas (Figura 1.4) (12, 13).

Nuestro grupo ha caracterizado los gránulos como depósitos de una sal cálcica de *myo*-inositol hexakisfosfato (InsP₆) (14–16). La red fibrilar es el sitio donde se localizan los abundantes azúcares de la CL (17), cuya elucidación estructural también ha sido realizada por nuestro grupo (18, 19). La totalidad de estos glúcidos son O-glicanos mucínicos, lo que confirma evidencias anteriores fragmentarias, en cuanto a que la red fibrilar de la CL está compuesta por mucinas. Principalmente, se trata de O-glicanos basados en los *cores* 1 y 2 convencionales de las mucinas animales, elongados con cadenas de galactosa β 1-3, terminadas en residuos de galactosa α 1-4. Si bien estas cadenas glucídicas se encuentra poco ramificadas, pueden estar decoradas con galactosa α 1-4 galactosa β 1-4 N-acetilglucosamina β 1-6; este último motivo también puede encontrarse decorando, e incorporando a, el residuo de N-acetilglucosamina del *core* 2 (15, 18–20).

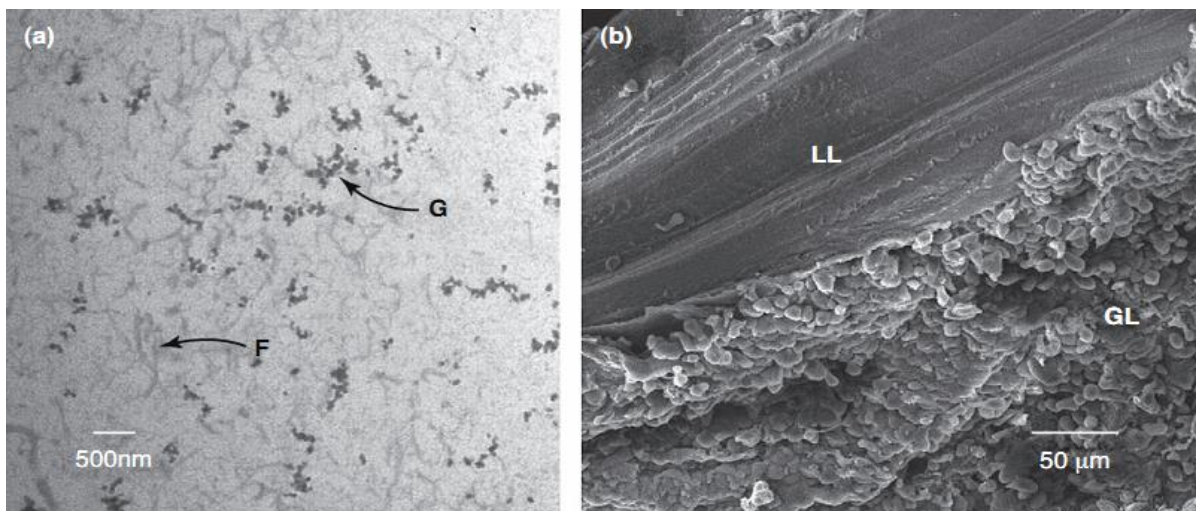


Figura 1.4 Microscopía electrónica de la capa laminar de *E. granulosus*. a- Microscopía electrónica de transmisión. Se indican los gránulos de *myo*-inositol hexakisfosfato (G) y la red fibrilar (F). b- Microscopía electrónica de barrido. Se indican la capa germinativa (GL, del inglés *germinal layer*) y la capa laminar (LL, del inglés *laminated layer*). Imágenes tomadas de (8).

Las mucinas son glicoproteínas en las que el esqueleto peptídico (apomucina) tiene regiones con numerosos puntos de O-glicosilación, sobre residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) (21). Las mucinas de mamífero más estudiadas se dividen en mucinas secretorias, largas y con repeticiones en tándem en la secuencia peptídica, y mucinas de superficie celular, más cortas y con dominios transmembrana (22). Además de los dominios glicosilados, las mucinas suelen tener dominios N- o C-terminales no glicosilados, e incluso globulares.

El relevamiento del transcriptoma de la capa germinativa y otros estadios/tejidos de *E. granulosus*, apoyado en la secuenciación del genoma, mostró que las secuencias más altamente expresadas en la capa germinativa, y que están ausentes de esos otros tejidos/estadios, son apomucinas secretorias cortas (sin repeticiones en tándem) (23–25). Las mucinas correspondientes, en sus formas maduras, constarían cada una de un dominio altamente glicosilado con sólo una corta región no glicosilada en el extremo N-terminal. Puesto que la actividad biosintética-secretoria mayor, específica de la capa germinativa, es la construcción de la CL, estas secuencias seguramente correspondan a las apomucinas principales de la CL. Las 3 apomucinas más altamente expresadas en la capa germinativa son denominadas: EGC00317, EGC02904 y EGC04254 (nomenclatura del transcriptoma (23)). EGC0294 y EGC04254, que se proponen como variantes de *splicing* o alélicas, comparten un péptido N-terminal no glicosilado rico en prolina, que porta el único residuo cisteína presente en la totalidad de las secuencias disponibles de las apomucinas probables que conformen la CL. Los datos genómicos indican que estas apomucinas pertenecen a una familia que incluye más miembros, con y sin cisteínas en sus extremos N-terminales (24). Finalmente, aparece en el transcriptoma (pero aún no en el genoma) una apomucina más larga (EGC05092), cuyo extremo no glicosilado también está relacionado al de EGC02904/4254, careciendo de la cisteína. En la Figura 1.5 se muestran las secuencias de aminoácidos correspondientes a los esqueletos peptídicos de las apomucinas mencionadas. Se observa que dichas secuencias poseen residuos positiva o negativamente cargados intercalados entre grupos de residuos potencialmente glicosilados, lo cual sugiere la posibilidad de un ensamblaje colineal heteromérico, sostenido por interacciones iónicas, para dar las fibrillas de la CL (considerándose la posibilidad adicional de entrecruzamiento por enlaces covalentes de tipo isopeptídico). En estas hipótesis, los extremos N-terminales de EGC00317 y de EGC05092, así como el dímero (sostenido por enlace disulfuro) de extremos N-terminales de dos moléculas de EGC02904/4254, podrían quedar libres para interacciones no estructurales. Resultados bioquímicos (26) y proteómicos iniciales de nuestro grupo sugieren que no hay en la CL proteínas estructurales no mucinas. La proteómica de la CL es muy difícil de estudiar, dado que sus mucinas constituyentes no se separan en sistemas electroforéticos convencionales. Estudios previos de nuestro grupo muestran la presencia de proteínas del hospedero, principalmente inmunoglobulinas, que

se encuentran fuertemente unidas o adsorbidas a la CL. En el transcurso de esta Tesis se profundiza en el conocimiento de las proteínas adsorbidas a la CL.

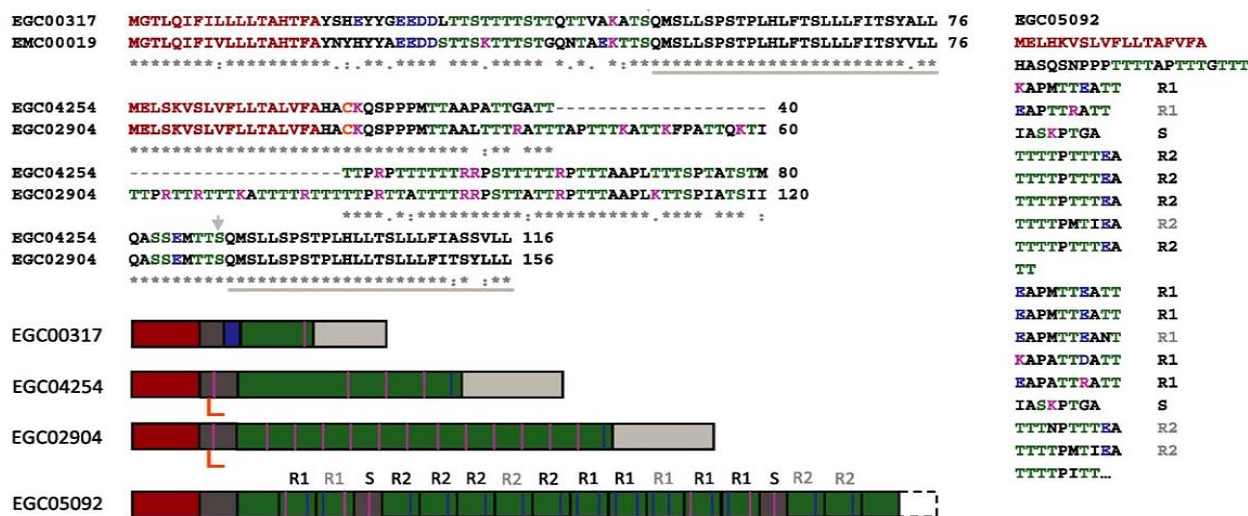


Figura 1.5 Organización molecular de apomucinas expresadas únicamente por la capa germinativa. Se muestran las secuencias predichas de las 4 apomucinas candidatas a constituir la CL: EGC00317, EGC02904, EGC04252 y EGC05092. EGC00317 se muestra alineada con su ortólogo de *E. multilocularis*, EMC00019. EGC04254 y EGC02904, que están muy relacionadas, se muestran alineadas entre sí. EGC05092 (cuya secuencia está incompleta) se muestra de forma de enfatizar los motivos repetidos (R1, S, R2). Los residuos formando los péptidos señal predichos se indican en rojo, y las extensiones C-terminales correspondientes a señales para la adición de anclas a glicosilfosfatidilinositol están marcadas con una línea gris por debajo. Además se indican: los residuos de Ser/Thr posiblemente O-glicosilados en verde, los residuos de Asp/Glu en azul, los residuos de Arg/Lys en magenta y las Cys desapareadas en naranja. Una representación esquemática de las características de estas apomucinas se incluye debajo utilizando los mismos colores. Tomado de (23).

1.2 Inmunobiología de helmintos, con énfasis en células dendríticas

1.2.1 Células dendríticas

La inmunidad se basa en un flujo de información que comienza con el reconocimiento de componentes propios o de otros organismos (comensales, patógenos) por el sistema inmune innato, que se transfiere al sistema inmune adaptativo determinando el tipo de respuesta montada. A grandes rasgos, las respuestas inmunes adaptativas pueden tener diferentes perfiles efectores (Th1, Th2, Th17, etc, especializados en la eliminación de diferentes clases de patógenos), o un perfil regulador. La respuesta reguladora, cuyo elemento central son los linfocitos T reguladores (Tregs), se encarga de controlar que las ramas efectoras de la respuesta no dañen al propio organismo. Normalmente, la respuesta reguladora debe ser inducida por componentes propios, pero también es aprovechada por

diversos patógenos capaces de establecer infecciones crónicas, entre ellos los helmintos (27).

La primera decodificación de los componentes tanto propios como no propios, está a cargo de las células del sistema inmune innato. En particular, son las células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*) las que juegan el papel principal en el manejo y transmisión de información a otras células del sistema inmune innato o adaptativo. En particular, las DCs juegan un papel fundamental en la polarización de la respuesta de linfocitos T. Estas respuestas que abarcan la proliferación y polarización de linfocitos T, y generación de memoria, dependen de tres señales distintas: interacción MHC-péptido (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) con los receptores de linfocitos T (TCR), interacción entre moléculas coestimuladoras (principalmente CD80, CD86 y CD40) y sus receptores en linfocitos T (principalmente CD28 y CTLA4 para CD80/CD86, y CD154 para CD40), y el perfil de citoquinas del microambiente. Las DCs juegan el papel principal en el *priming* de linfocitos T *in vivo* debido a su gran capacidad de presentar antígenos, junto con alta expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas. Estas tres señales mencionadas pueden ser proporcionadas incluso por la misma DC, lo cual hace a estas células capaces de activar linfocitos T vírgenes. Por esto, las DCs son reconocidas como células presentadoras de antígeno profesionales (28). No sólo la presencia de las tres señales, sino los niveles correctos de expresión de cada una de éstas son necesarios para el correcto desarrollo de la respuesta T (29, 30). Por ello, es muy importante determinar el estado de maduración/activación de las DCs para conocer el tipo de respuestas que van a inducir (30, 31). En términos de citoquinas, para la inducción de Th1 se requiere principalmente IL-12p70, mientras que para la inducción de Th17 se requiere principalmente IL-6 y TGFβ; todas estas citoquinas pueden ser producidas por DCs convencionalmente activadas (32). También en términos de citoquinas, TGFβ en ausencia de citoquinas inflamatorias induce Treg. En términos de moléculas de superficie, en general, los mayores niveles de moléculas de coestimulación se asocian a inducción de Th1 y Th17 mientras que niveles bajos de una o más de éstas moléculas se encuentran asociados a respuesta Th2 y Treg (30, 33, 34).

Existen varias subpoblaciones de DCs, que se diferencian en la ontogenia, localización, perfil de citoquinas y función inmunológica (28). Las principalmente de éstas son: DCs

clásicas/convencionales (cDCs), DCs plasmocitoides (pDCs) y DCs derivadas de monocitos (moDCs). A continuación se realiza una breve descripción de estas tres sub-poblaciones.

Las cDCs son células centinelas con alta capacidad fagocítica, que vigilan/sensan continuamente el medio donde se encuentran, e instruyen a las células T para responder. Dentro de las cDCs, específicamente en ratón, podemos encontrar principalmente dos subgrupos: $CD8\alpha^+$ (o $CD103^+$) y $CD11b^+$. Las DCs $CD8\alpha^+$ son residentes de órganos linfoides, mientras que las $CD103^+$ residen en órganos no linfoides, pero funcionalmente son similares (35). Ambas subpoblaciones son buenas presentadoras de antígenos exógenos en moléculas de MHC clase I (presentación cruzada) y buenas productoras de IL-12p70 (citoquina polarizante a respuesta Th1) en respuesta a agonistas de TLRs (del inglés, *Toll Like Receptors*) (36, 37). Por otra parte, las DCs $CD11b^+$ son las cDCs más abundantes en los órganos linfoides (a excepción del timo), aunque también se encuentran en órganos no linfoides. Este grupo de cDCs se encuentra menos caracterizado, principalmente debido a su gran heterogeneidad. Las DCs $CD11b^+$ se definen principalmente de manera funcional, por la ausencia de actividades presentes en cDCs $CD8^+$, es decir son ineficientes en la presentación cruzada de antígenos y en la expresión de IL-12p70 en respuesta a agonistas de TLRs. Sin embargo, son células muy buenas en originar una respuesta inmune celular T $CD4^+$ (28).

Las pDCs se encuentran tanto en sangre como en órganos periféricos. Su principal característica funcional es su capacidad de producir y liberar grandes cantidades de interferón tipo I ($INF-\alpha$ e $INF-\beta$) en presencia de infecciones virales, consecuencia de su expresión constitutiva del factor IRF7 (28, 38, 39).

Finalmente, las moDCs son DCs generadas en tejidos en condiciones de inflamación, a partir de monocitos que trasvasan desde la sangre. También se las conocen como DCs inflamatorias (40, 41). La mayoría de estas células expresan el marcador monocítico Ly6C, que facilita su identificación (42). En la década de 1990 se observó que monocitos humanos cultivados en presencia de GM-CSF (del inglés, *Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e IL-4 originaban células tipo dendríticas capaces de estimular la respuesta de linfocitos T (43). Luego se emparentó a las moDCs con DCs de ratón generadas a partir de precursores de médula ósea (BMDCs, del inglés *Bone Marrow Dendritic Cells*) en presencia de GM-CSF e IL-4, o GM-CSF solamente (28, 44). Tanto mo-DCs como BMDCs son buenas

productoras de citoquinas inflamatorias. En particular, se asocia a las BMDCs a un subtipo de moDCs, que presenta alta expresión de TNF- α y de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), al que se denomina Tip-DCs (del inglés, *TNF and iNOS producing DCs*) (45).

1.2.2 Generalidades sobre respuestas inmunes a parásitos helmintos

La mayoría de las infecciones por parásitos helmintos se caracterizan por ser crónicas. Esto deriva, en parte, de la necesidad biológica de estos patógenos de alcanzar un estadio adulto sexualmente maduro capaz de dejar descendencia (46). En particular, los parásitos helmintos se diferencian de otros patógenos (bacterias, protozoarios, virus, hongos) en su gran tamaño y en el daño tisular que generan a causa de su crecimiento y/o de migración en el hospedero. Para defenderse de este tipo de patógenos aparentemente, los vertebrados desarrollaron evolutivamente la rama de respuesta conocida como Th2 o tipo 2. La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de interleuquina (IL)-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y IL-13, de anticuerpos de isotipos IgG1, IgG4 (en humanos) e IgE, y la estimulación de la respuesta celular mediada por eosinófilos, basófilos, mastocitos y macrófagos alternativamente activados (47). Desde un punto de vista funcional, la respuesta Th2 se caracteriza por 3 grandes componentes: reparación de los tejidos, control de la inflamación Th1 y Th17 (principalmente, a través de la presencia de IL-10) y mecanismos efectores dirigidos contra helmintos (27, 46). Otra respuesta por células Th característica de infecciones con helmintos, principalmente en mucosas, es la respuesta Th9. Los linfocitos Th9 son inducidos principalmente en presencia de las citoquinas IL-4 y TGF- β , y producen altos niveles de IL-9 (aunque también producen IL-10 e IL-21). La IL-9 actúa tanto sobre mastocitos, eosinófilos, y linfocitos B productores de IgE, como sobre células no inmunes, promoviendo la secreción de mucus y la contracción del músculo liso en el intestino, ambas necesarias para la expulsión de parásitos intestinales (48).

La presencia del helminto, como se mencionó anteriormente, produce daño tisular, tanto de forma directa (crecimiento y/o migración) como indirectamente (a través de respuestas inflamatorias). Por ello, la respuesta inmune apropiada debe contener al parásito (a través de la expulsión o la encapsulación) mientras rápidamente repara el tejido dañado (27). Los macrófagos alternativamente activados son el mejor ejemplo del tipo celular encargado de la reparación de tejidos en la respuesta tipo 2. Estos macrófagos expresan altos niveles de

Ym1, RELM- α y Arginasa-1 (Arg-1), proteínas también inducidas en respuesta a daño tisular estéril. En particular, Arg-1 es un buen ejemplo de una molécula de la respuesta inmune tipo 2. La actividad de la Arg-1 produce, a partir del aminoácido L-arginina, el precursor para la síntesis de prolina y poliaminas, importantes a su vez para la producción de colágeno y para el crecimiento celular, respectivamente. La arginina puede también ser metabolizada por iNOS, expresada en macrófagos clásicamente activados, para producir óxido nítrico (NO). Así, a través de la competencia por sustrato, Arg-1 presenta un efecto regulador de la respuesta inflamatoria. Finalmente, Arg-1 es también un importante supresor de la activación de linfocitos T, ya que reduce localmente la L-arginina, aminoácido esencial para la activación de linfocitos T (46).

En las infecciones con parásitos helmintos, en general, la respuesta tipo Th2 se encuentra asociada con respuestas reguladoras. A este tipo de respuesta compuesta se la ha denominado respuesta “tipo 2 modificada”. Se ha propuesto que la respuesta tipo Th2 representa la respuesta inducida por el reconocimiento del helminto por el sistema inmune, mientras que las repuestas anti-inflamatorias/reguladoras corresponden a adaptaciones de los helmintos para evadir la respuesta inmune (27, 46, 49). Lo cierto es que ambas respuestas se generan en infecciones por helmintos crónicas al mismo tiempo, siendo difícil en la práctica separarlas. En algunos casos, el componente regulador de la respuesta tipo 2 modificada puede ser sistémico, y regular la respuesta contra antígenos no relacionados. Se ha observado que algunas infecciones con helmintos protegen a sus hospederos de respuestas efectoras exacerbadas como en las reacciones alérgicas y en las enfermedades autoinmunes. A partir de estas observaciones se generó la hipótesis de la higiene (en su formulación actual), la cual relaciona el importante aumento en la prevalencia de enfermedades autoinmunes y alérgicas de los países desarrollados con la baja prevalencia de las infecciones helmínticas, e inversamente la baja prevalencia de enfermedades inflamatorias en zonas rurales del tercer mundo con las altas tasas de infecciones helmínticas (50, 51). De esta manera, cobra importancia identificar y comprender los mecanismos moleculares que utilizan los distintos parásitos helmintos para regular la respuesta inmune, pensando en posibles aplicaciones para el tratamiento de enfermedades con respuestas inmunes exacerbadas.

1.2.3 Células dendríticas en la respuesta inmune Th2

Aunque no hay duda de la importancia de las DCs para inducir respuestas Th1, Th17 o Treg, el panorama no siempre fue tan claro para las respuestas Th2. Sin embargo, estudios *in vivo* recientes han demostrado que la presencia de DCs es necesaria para el correcto desarrollo de dicha respuesta (52, 53).

Aún no se han identificado los factores que expresan las DCs para polarizar la respuesta hacia un perfil Th2. Una citoquina muy importante para inducir y mantener este tipo de respuesta es la IL-4, que es producida por ILC2 (del inglés, *innate lymphoid cells type 2*), basófilos, mastocitos, y eosinófilos activados, así como por linfocitos Th2 pre-existentes. La IL-4 en general no es producida por DCs, aunque recientemente se ha encontrado un subtipo de DCs, diferenciadas *in vitro* en presencia de antígenos solubles de huevos de *Schistosoma japonica*, que es capaz de producir IL-4 (54). Para la inducción de la respuesta Th2 es importante que la IL-4 se encuentre en ausencia de IL-12p70 (la cual, como ya se dijo, sí es producida por las DCs). Otra citoquina relevante en las infecciones por helmintos es la IL-10. Esta citoquina, asociada a la respuesta Th2 y también a la respuesta reguladora, es capaz de bloquear la maduración convencional de DCs (55). Las DCs productoras de IL-10 son necesarias para inducir una respuesta completa Th2, probablemente a través de la inhibición de la producción de IL-12p70 (55, 56).

Una característica común de las DCs inductoras de una respuesta Th2, compartida con las DCs tolerogénicas, es su estado semi-maduro (30, 33, 34). Esto equivale a decir que estas DCs no presentan de manera completa las tres señales necesarias para la activación y polarización de linfocitos T a fenotipo efector Th1/Th17. Existen diversos fenotipos semi-maduros de DCs. Estos en general comparten una alta expresión de ambas moléculas de MHC (clase I y II), y de algunas moléculas coestimuladoras (por ejemplo: CD80 y CD86), en conjunción con la baja de otras moléculas coestimuladoras (por ejemplo: CD40), y específicamente con la baja producción de citoquinas polarizantes como IL-12p70 (Th1), IL-6 e IL-23 (Th17) (Figura 1.6) (33, 34, 57–59). En concordancia con lo anterior, las señales que inducen fenotipos semi-maduros de DCs, típicamente activan la expresión de un número mucho menor de genes que las señales que causan maduración convencional o completa de DCs (30).

Como ya se mencionó, la ausencia de IL-12p70 es importante para polarizar la respuesta a un tipo Th2. Esto llevó incluso al planteo que simplemente la ausencia de esta citoquina sería necesaria para la polarización a Th2, por un mecanismo de activación por defecto, que hoy está prácticamente descartado (27, 60, 61). Otros estudios indican que la expresión diferencial de ligandos Notch (jagged-1 y jagged-2) en células presentadoras de antígeno es determinante para la polarización de la respuesta (62). Por otro lado, la expresión de OX40L en DCs es necesaria para la correcta inducción de la respuesta Th2 primaria y de memoria (63). Estudios recientes han logrado identificar dos marcadores de superficie que se expresan preferentemente en DCs especializadas en inducir una respuesta Th2. El primero de ellos es la lectina MGL2 (del inglés, *macrophage galactose-type C-type lectin 2*) y el otro es la molécula coinhibitoria (coestimuladora negativa) PD-L2 (del inglés, *programmed death Ligand-2*). Junto con estos marcadores de superficie, dichas DCs expresan un factor de transcripción específico denominado IRF4 (del inglés, *interferon regulatory factor 4*) (64). El IRF4 se une y activa los genes *il10* y *il33*, ambos necesarios para que las DCs polaricen a una respuesta Th2 (64, 65).

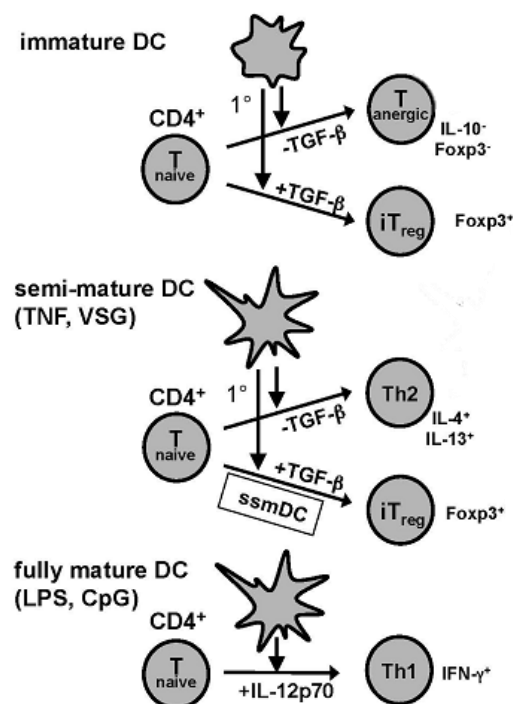


Figura 1.6 Diferentes estados de maduración de DCs se encuentran asociados a diferentes tipos de respuesta T. La inducción de linfocitos T CD4+ anérgicos, de subclases de Treg y de linfocitos T polarizados a respuestas Th1 o Th2 puede ser dirigido por el estado de maduración y las citoquinas producidas por células dendríticas. VSG, del inglés, *variant surface glycoprotein*; *immature DC* (célula dendrítica inmadura); *semi-mature DC* (célula dendrítica semi-maduras); *fully mature DC* (células dendríticas completamente activadas); ssmDC, del inglés, *steady state migratory dendritic cell*. Adaptado de (33).

1.2.4 Células dendríticas tolerogénicas

Las DCs participan centralmente en la inducción de la tolerancia central y periférica. En la tolerancia periférica, las DCs limitan la actividad de células T efectoras y promueven la diferenciación a Tregs (66). Los mecanismos por los cuales las DCs tolerogénicas limitan la actividad de células T efectoras y promueven la diferenciación a Tregs incluyen: la producción de las citoquinas IL-10, IL-27 y TGF β ; la expresión de IDO (del inglés, *indolamine 2,3-dioxygenase*); y el control de los niveles extracelulares de ATP (del inglés, *adenosine triphosphate*) y adenosina (66–71). Por otro lado, la IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria que inhibe, en DCs, la producción de IL-12 y la expresión de moléculas coestimuladoras, como se mencionó anteriormente, necesarias para la polarización de células T a fenotipos Th1 y Th17 (66, 72, 73).

Estudios de la participación de las DCs en cáncer han indicado que los fenotipos de DCs semi-maduros, previamente mencionados, se encuentran asociados a la inducción de tolerancia y células T anérgicas (34). No se han definido marcadores que distingan DC semi-maduras inductoras de respuestas Th2 (sección 1.2.3) o tolerogénicas.

1.2.5 Respuestas de células dendríticas a productos de parásitos helmintos

Si bien no se conoce mucho sobre los mecanismos que disparan la respuesta en infecciones por helmintos, es claro que las células del sistema inmune innato tienen un papel fundamental. En algunos modelos se ha demostrado que la infección con helmintos instruye a las DCs promoviendo tanto una respuesta Th2 como una respuesta reguladora (36, 74).

Se han tratado de identificar PRRs (del inglés, *pattern recognition receptors*) para motivos expresados en helmintos que puedan servir como sensores de la inmunidad innata. Si bien algunos TLRs son activados por productos de helmintos, estos receptores parecen no ser los responsables de desencadenar la polarización hacia respuestas Th2 y reguladoras en infecciones por helmintos.

En general las preparaciones de helmintos inducen en DCs respuestas débiles, con muy pocas o ninguna señal de activación. Por lo anterior, se suelen realizar ensayos en los que se evalúa la capacidad de las preparaciones de helmintos de antagonizar la maduración

convencional inducida por agonistas de TLRs (27). Muchos productos de helmintos inhiben la activación convencional inducida por agonistas de TLRs (61, 75–81). En otras palabras, aunque las DCs deberían polarizar hacia una respuesta Th1, al ser estimuladas con agonistas de TLRs, al coestimularlas con productos de helmintos, presentan bajos niveles de IL-12, altos niveles de IL-10, y en algunos casos alterada la expresión de MHC y/o moléculas coestimuladoras. Estos datos indican que la estimulación con productos de helmintos debe alterar de alguna manera la señalización celular inducida por agonistas de TLRs. Algunos trabajos han mostrado que productos de helmintos alteran la señalización, iniciada a partir de TLRs, de las vías de NFκB o MAPKs (ver secciones 1.3.1 y 1.3.2) (81–85).

El SEA (del inglés, *soluble egg antigen*) de *Schistosoma mansoni* es el inductor de respuesta tipo 2 de helmintos más estudiado. Se ha observado que el tratamiento de oxidación de azúcares con metaperiodato inhibe la capacidad del SEA de polarizar la respuesta a Th2, indicando que los carbohidratos son importantes para inducir dicha polarización (86, 87). En concordancia, la internalización por DCs de componentes presentes en SEA involucra al menos 3 receptores de tipo lectina: DC-SIGN, MGL y el receptor de manosa (75, 76). Omega-1, uno de los componentes de SEA más estudiados, es capaz, en forma purificada, de instruir a las DCs para inducir una respuesta Th2, si bien no es el único componente con actividad inmunoreguladora presente en este material (88).

Estudios realizados con *Echinococcus multilocularis*, cercanamente relacionado con *E. granulosus*, han mostrado la capacidad de los productos de excreción/secreción de este parásito para regular la sobrevivencia y la maduración de DCs *in vitro*. En particular, se observó que productos de excreción/secreción característicos de diferentes estadios del parásito inducen apoptosis, inhiben la maduración en respuesta a agonistas de TLR en términos de moléculas de superficie, así como inhiben la producción de IL-12, y/o inducen la producción de IL-10 en DCs (89).

1.2.6 Respuesta inmune en infecciones por *Echinococcus granulosus*

La “historia natural” de la infección hidática sugiere la presencia de una fuerte respuesta reguladora superpuesta a la respuesta efectora predominante Th2. Usualmente, la hidátide se encuentra rodeada de una capa de colágeno del hospedero, casi sin inflamación local,

pese a ser inmunogénica y a persistir por años en el parénquima de un órgano interno (9). Existen además evidencias crecientes, incluyendo algunas obtenidas para *E. multilocularis*, de inducción de DCs tolerogénicas y expansión de Treg (detectadas como células FoxP3⁺) en la infección (90–92). La respuesta inmune a la infección por *E. granulosus* puede ser dividida en dos etapas: la etapa previa a la generación de la CL (pre-enquistamiento o etapa de establecimiento) y la etapa posterior a la generación de la CL (post-enquistamiento o etapa establecida) (93). La formación de la CL durante el desarrollo de la hidátide coincide con la resolución de la inflamación (94, 95). La respuesta inmune en la etapa de pre-enquistamiento es muy difícil de estudiar en los hospederos naturales. Se ha estudiado en cambio en el modelo de infección de ratones por inoculación intraperitoneal de protoescolices. Los protoescolices, normalmente destinados a transformarse en adultos en intestino del hospedero definitivo, tienen capacidad de desarrollo reverso a hidátides, en lo que se llama infección secundaria. En este modelo, la infección desencadena, en los primeros días una fuerte respuesta inflamatoria, que es capaz de eliminar a la mayoría de los parásitos. Esta respuesta incluye el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos, así como activación del complemento (94). Cinco días luego de la infección, la respuesta inmune en el microambiente del parásito cambia y se genera una respuesta mixta con componentes Th1 (IFN γ) y Th2 (IL-4), junto con altos niveles de IL-10 y la aparición de Treg (94). Una serie de resultados recientes, en infecciones experimentales y naturales, apoyan la idea de que existe una fuerte respuesta reguladora en la equinocosis quística (Figura 1.7) (92, 94, 96–98).

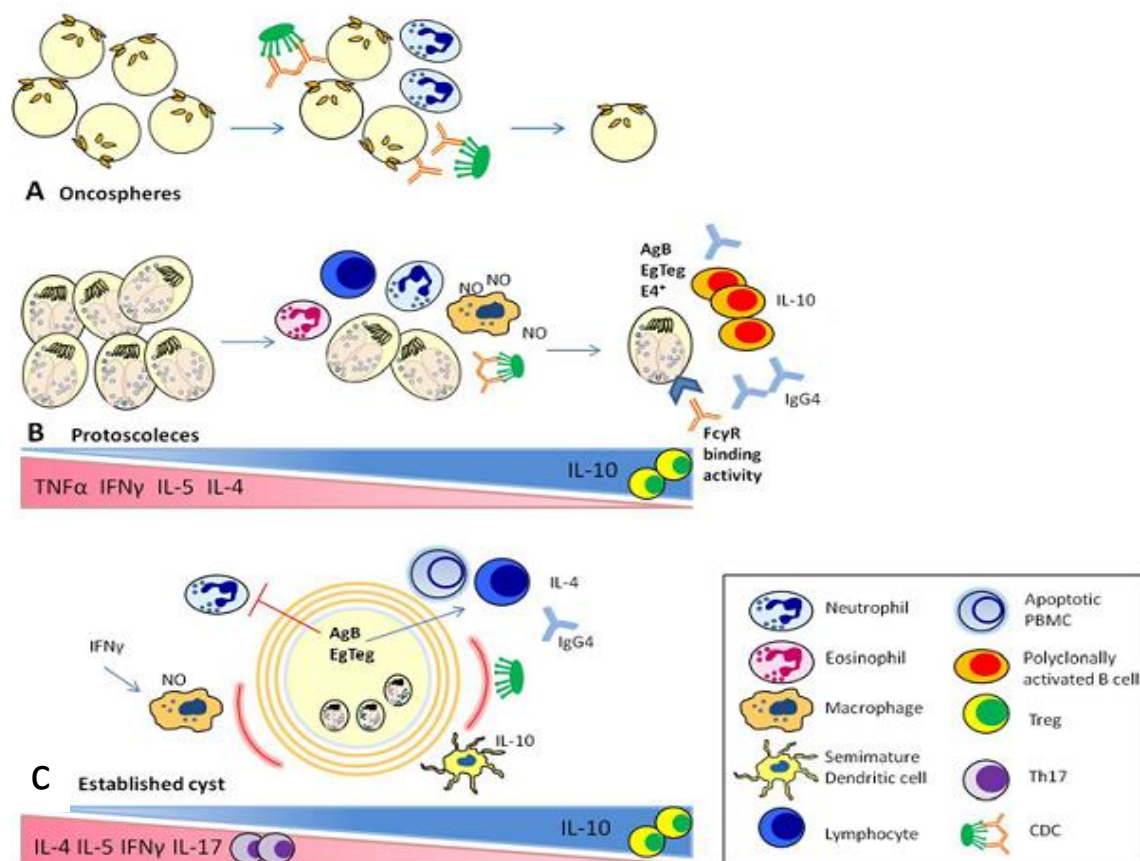


Figura 1.7 Resumen de aspectos de la respuesta inmune a *E. granulosus* en el hospedero intermediario. A- Se muestra la respuesta inmune sobre las oncoesferas mediada por anticuerpos y complemento, a su vez potenciada por la presencia de neutrófilos. Esta respuesta es capaz de eliminar la mayoría de las oncoesferas en hospederos previamente inmunizados. B- Se muestra la respuesta inflamatoria fuerte mediada por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos que rodean a los protoescólex inyectados en un modelo de hidatidosis secundaria. Además se indican la activación policlonal de linfocitos B y la inducción de IL-10 y Tregs en el transcurso del tiempo, mientras se apaga la respuesta inflamatoria bajando los niveles de IFN- γ y TNF- α . C- La hidátide implantada genera una respuesta mixta Th1/Th2 en el perfil de citoquinas. El desarrollo de la capa laminar induce menor producción de óxido nítrico en macrófagos activados, y lo protege del sistema del complemento. Además, se muestra la presencia de *semimature dendritic cells* (DCs semi-maduras), IL-4 e IL-10, y la presencia de Tregs, importantes para el establecimiento del parásito. Adaptado de (94).

1.2.7 La capa laminar y la respuesta reguladora en la hidatidosis

Tenemos fuertes razones para creer que la decodificación por el sistema inmune de componentes estructurales de la CL es un determinante central en la inducción de respuestas reguladoras en la infección por *E. granulosus*. Dado que constituye la interfaz entre el hospedador y el parásito en estado larvario, la CL es la principal fuente de moléculas parasitarias en contacto con el sistema inmune. Por otra parte, además del contacto obvio entre células del hospedero y la superficie de la CL, el crecimiento de la

hidátide implica que los estratos exteriores de la CL se desensamblen, liberando partículas que quedan accesibles para células del sistema inmune en la región peri-parasitaria. Ésto se ha observado experimentalmente en el caso de *E. multilocularis*, y en infección experimental en ratones, también en *E. granulosus* (13, 99). Además, la formación de la CL, que comienza entre la primera y la segunda semana de infección, coincide temporalmente con la resolución de la inflamación inicial (95). Los componentes de la CL parecen ser decodificados en forma no-inflamatoria o anti-inflamatoria por células del sistema inmune innato y tienen efectos regulatorios sobre éstas (99–101). Además, contrariamente a otros materiales del parásito, los componentes de la CL activan pobremente al sistema complemento (102).

Nuestro grupo ha contribuido con los hasta este momento limitados datos sobre interacción entre la CL y las DCs (103). En estos ensayos se expusieron BMDCs *in vitro* a una preparación particulada de la CL, que llamamos pLL (del inglés, *particulate laminated layer*). Esta preparación corresponde a una suspensión de partículas de la CL cruda, enriquecida en las mucinas estructurales por extracción del InsP_6 y de la mayor parte de las proteínas del hospedero adsorbidas, mediante tratamientos con EDTA y alta fuerza iónica, respectivamente. Las BMDCs expuestas a pLL no responden con secreción ni activación transcripcional de citoquinas, ni pierden viabilidad. Cuando se las expone a pLL y luego se las estimula con un agonista de TLR, la respuesta frente a este último estímulo resulta sesgada, entre otros cambios, con una potenciación de secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, observable a nivel de proteína, así como de ARNm. El sesgo de respuesta observado en BMDCs en particular incluye también la inhibición de la respuesta a diferentes agonistas de TLR en términos de IL-12 (p40 y p70). Desde el punto de vista de sus marcadores de superficie, las células expuestas a pLL responden con el aumento en expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80 (aunque esta última de forma más leve que CD86), sin aumentar la expresión de la molécula coestimuladora CD40, ni la de MHC clase II. Cuando se preconditiona con pLL y luego se estimula con agonistas de TLRs, las células muestran una notable inhibición en la inducción de CD40; mientras que CD86 alcanza niveles superiores a los de las células expuestas sólo a agonistas de TLRs (Figura 1.8) (103). Experimentos realizados con insertos porosos (*transwells*) muestran que los efectos de pLL sobre BMDCs requieren de contacto (103). Al inyectar intraperitonealmente en ratón pLL,

un agonista de TLR, o ambos estímulos, y analizar 24 horas después el fenotipo de las DCs peritoneales, se observan diferencias en CD80, CD86 y CD40 similares a las descritas para BMDCs *in vitro*. Nuevamente *in vitro*, la exposición a pLL tiene efectos similares a los ya descritos, pero cuantitativamente más débiles, en BMDM (del inglés, *bone marrow-derived macrophages*). Como se mencionó en las secciones 1.2.3 y 1.2.4, aún no se comprende bien la funcionalidad de los fenotipos de DCs con algunas de las características de maduración clásica (en este caso, CD86) pero ausencia de otras (en este caso, CD40 e IL-12), es decir “semi-maduros”, y se propone que pueden corresponderse con DCs inductoras de respuestas tipo 2 o DCs tolerogénicas (34, 59, 104, 105).

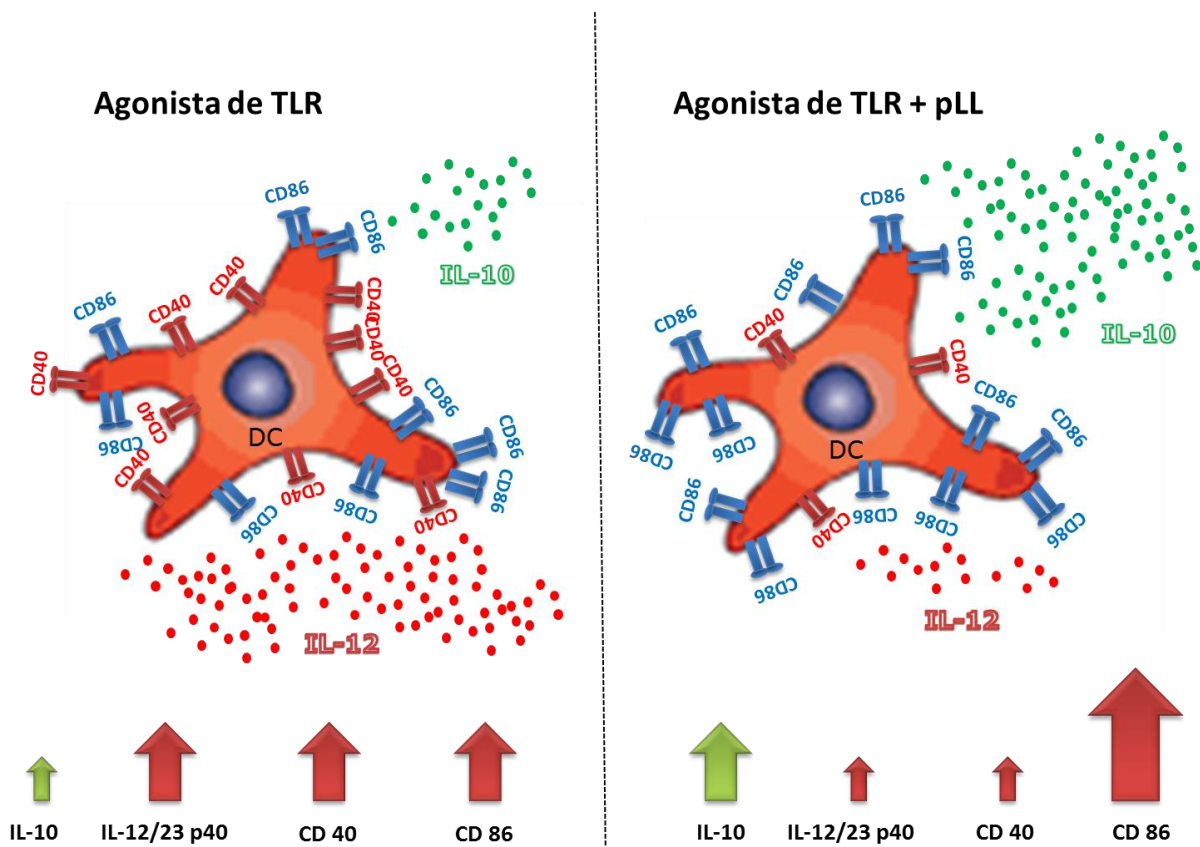


Figura 1.8 Diferencias fenotípicas BMDCs estimuladas con agonista de TLR vs agonista de TLR más pLL. a- Las BMDCs estimuladas solamente con agonistas de TLR expresan altos niveles de IL-12, CD40 y CD86, y bajos niveles de IL-10. b- Las BMDCs estimuladas con agonistas de TLR más pLL expresan altos niveles de IL-10 y CD86, y bajos niveles de IL-12 y CD40.

1.3 Vías de señalización: NFκB, MAPKs, PI3K/Akt

Como se mencionó, nuestro grupo ha caracterizado fenotípicamente BMDCs expuestas a pLL en ausencia como en presencia de agonistas de TLRs (103). Los resultados obtenidos

sugieren que la exposición a pLL como único estímulo desencadena cambios a nivel de las vías de señalización intracelulares, que dan lugar a algunos cambios fenotípicos, como el aumento de CD86. Además sugieren que la exposición a pLL altera por “*cross-talk*” las vías de señalización activadas por agonistas de TLR, sesgando el fenotipo inducido por dichos agonistas. En esta Tesis se explorarán posibles cambios en las vías de señalización de NFκB, MAPKs y PI3K/Akt. Estas vías son centrales en células eucariotas en general, y en particular, en la maduración fenotípica de DCs en respuesta a agonistas de TLRs. Además, se ha observado que muchos productos de helmintos impactan sobre las vías de NFκB y MAPKs para inducir sus efectos en DCs u otras células mieloides.

1.3.1 Vía de NFκB

NFκB es un módulo de señalización central en células del sistema inmune. Sus componentes principales son las 5 subunidades llamadas RelA, c-Rel, Rel-B, p50 y p52 (106). De éstas, las sub-unidades “Rel” son transcripcionalmente activas como heterodímeros (RelA/p50, c-Rel/p50, Rel-B/p52). Las cinco subunidades mencionadas se encuentran ancladas en el citosol por inhibidores denominados IκB (IκBα, IκBβ, IκBγ, etc) y se translocan al núcleo cuando estos IκB son degradados. NFκB comprende tres vías: la canónica, la no canónica y la de p105.

En la vía canónica, el módulo se activa al fosforilarse IκBα, lo que marca a la proteína para la ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma. Una vez que se degrada IκBα, los dímeros RelA/p50 y/o c-Rel/p50 se translocan al núcleo. La activación de esta vía es esencial para los cambios fenotípicos asociados con la maduración convencional de las DCs, inducida en particular por agonistas de TLRs, incluyendo la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias y de las moléculas de superficie MHCII, CD80, CD86 y CD40 (107–110).

La activación de la vía no canónica o alternativa induce la fosforilación de p100 (IκBδ), que basalmente se encuentra asociada a Rel-B. Una vez fosforilada, p100 es degradada de manera incompleta, generando p52. Esto permite que el heterodímero p52/Rel-B se transloque al núcleo, donde actúa como factor de transcripción. Esta es una vía más lenta (horas luego del estímulo) que la canónica (minutos luego del estímulo), y se desencadena

en respuesta a ligandos de la superfamilia de receptores de TNF (CD40, RANK, etc), así como a LPS (111, 112).

La vía de p105 al activarse induce la fosforilación de la proteína p105 ($I\kappa B\gamma$), la cual posteriormente es ubiquitinilada y procesada por el proteosoma para dar p50. La subunidad p105, a diferencia de p100, es procesada por proteosoma de forma constitutiva, para generar un nivel basal de p50, que es retenida en el citosol por su precursor p105. Sin embargo, la activación de la vía lleva a que toda la p105 disponible se procese a p50, ocasionando, por ausencia de una $I\kappa B$ para p50, la translocación al núcleo de p50 y de las subunidades asociadas, que pueden ser RelA o c-Rel. Así, la activación de esta vía causa translocación nuclear de los heterodímeros transcripcionalmente activos p50/RelA y p50/c-Rel. Sin embargo, también causa la translocación de homodímeros p-50/p-50, que tendrían un efecto regulador de la vía, al competir con los heterodímeros transcripcionalmente activos. En particular en macrófagos, la translocación de homodímeros de p50 inhibe la activación de las otras vías de NF κ B (113–116). Además, al activarse la vía de p105 se activa TPL2, induciendo la activación de la vía de ERK1/2 (Ver 1.3.2) (117–119).

1.3.2 Vías de las MAPKs

Las MAPKs (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*) constituyen uno de los mecanismos principales de transducción de señales externas desde la membrana al núcleo en células eucariotas en general (120). Los módulos de señalización de las MAPKs se caracterizan por la asociación, sobre una proteína de andamiaje, de una quinasa quinasa quinasa, una quinasa quinasa y una quinasa. Las 3 principales vías de las MAPKs, que participan en la respuesta inmune innata, son: ERK1/2, p38 y JNK, (121). En la vía de ERK1/2, las quinasas involucradas son secuencialmente TPL-2 (pero existen otras), MEK1/2, y las propias ERK1/2. En las vías de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ) y JNK (JNK1, JNK2 y JNK3), actúa como primera quinasa TAK1, seguida por MKK3/6 para p38 y de MKK4/7 para JNK (120).

Varios de los PRRs expresados en DCs, incluyendo los TLRs, utilizan estas vías de señalización para activar y/o modular la respuesta inmune contra patógenos (122). Para el caso de ERK1/2, se ha reportado en BMDCs y en macrófagos que la vía se activa en presencia de

agonistas de TLRs en forma dependiente de TPL-2 y regula la producción de citoquinas. En particular, en respuesta a LPS y a CpG (agonistas de TLR4 y TLR9, respectivamente) la vía aumenta la producción de IL-10, mientras que inhibe la de IL-12 (123). Para p38, se ha observado que en respuesta a LPS existe una activación temprana mediada por MyD88, y una tardía mediada por TRIF. La vía de p38 es necesaria para la expresión de citoquinas, tanto inflamatorias como anti-inflamatorias, en respuesta a agonistas de TLRs, teniendo cada isoforma de p38 un papel específico (124–126). En cuanto a la vía de JNK, se sabe que JNK1 y JNK2 tienen papeles pro-inflamatorios tanto en macrófagos como en DCs (124, 127).

1.3.3 Vía de PI3K/Akt

La vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) es una vía de señalización altamente conservada y central en la supervivencia y proliferación de todas las células animales, que a su vez regula diversos eventos en la respuesta inflamatoria contra daño e infección. Las PI3K son quinasas que fosforilan al lípido fosfatidilinositol, y sus derivados, en la posición 3 del anillo de inositol (128, 129). Existen cuatro isoformas catalíticas de PI3K de clase I (PI3K α , β , γ , δ), tres isoformas de PI3K de clase II (PI3K $C2\alpha$, $C2\beta$, $C2\gamma$) y una única PI3K de clase III (VPS34) (130).

1.3.3.1 PI3K de clase I

Las PI3K de clase I son heterodímeros formados por 2 subunidades, una reguladora y una catalítica. Dentro de las PI3K de clase I encontramos dos subclases, IA y IB. La subclase IA se encuentra formada por las subunidades catalíticas p110 α , p110 β y p110 δ , unidas a la subunidad reguladora del tipo p85, de la cual existen 5 isoformas. Estas subunidades reguladoras contienen dominios SH2 (del inglés, *SRC homology 2*), a través de los cuales pueden reconocer y unirse a tirosinas fosforiladas. Así, las PI3K clase IA son activadas por receptores que son tirosina quinasas o se asocian a tirosina quinasas. La subclase IB está compuesta por la subunidad catalítica p110 γ unida a una subunidad reguladora (de las cuales existen 2, denominadas p101 o p84). Las PI3K de clase IB interactúan con subunidades $\beta\gamma$ generadas por la activación de proteínas G en la membrana plasmática, y por lo tanto son activadas por receptores acoplados a proteína G (131–133).

Todas las PI3K de clase I catalizan la fosforilación del lípido fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (PI(4,5)P₂) a fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP₃) (131–134). El PIP₃ así generado recluta a la membrana plasmática a diversas proteínas con dominios PH (dominio con homología a pleckstrina), que entonces actúan como efectores de la vía de PI3K.

Es importante aclarar que en cualquier contexto específico de regulación celular, la activación de la vía de PI3K de clase I siempre ocurre junto a la activación de otras vías de señalización, interactuando con ellas para generar una respuesta específica única. Esto genera que el efecto de activar la vía de PI3K no sea siempre el mismo en diferentes tipos celulares o en el contexto de diferentes estímulos. Entre las principales vías con las que interactúa PI3K se encuentran las de las MAPK y de NFκB (130).

Uno de los principales efectores de la vía de PI3K es Akt, quinasa con un dominio PH que resulta fosforilada y activada al ser reclutada a membrana plasmática por PIP₃ (y/o PI(3,4)P₂, ver sección 1.3.3.3). Existen tres isoformas de Akt: Akt1, Akt2 y Akt3 (135, 136). La activación total de Akt requiere la fosforilación en dos sitios distintos: Thr308 (catalizado por PDK1) y Ser473 (catalizado por el complejo mTORC2, del inglés, *mammalian Target of Rapamycin Complex 2*) (137). Una vez activada, Akt media muchas funciones, entre ellas la supervivencia celular, el control de la síntesis proteica y de la transcripción génica. Los blancos directos de Akt más estudiados son la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3, del inglés *glycogen synthase kinase 3*), el complejo TSC1/TSC2 (del inglés *tuberous sclerosis complex*, que a su vez regula el complejo mTORC1), la proteína pro-apoptótica BAD (del inglés *Bcl-2-associated death promoter*), y los factores de transcripción FOXO (del inglés *Forkhead Box O*, que regulan la proliferación celular) (128, 138, 139). De ahora en más, nos referiremos a la vía de PI3K/Akt para hacer referencia a los efectos de la activación de Akt dependiente de PI3K de clase I. Cabe mencionar que Akt también puede ser fosforilado/activado en células mieloides estimuladas por LPS de manera dependiente de TBK1 e IKKε y quizás independiente de PI3K (aunque existen datos contradictorios) (Figura 1.9) (140–143). Las quinasas TBK1 e IKKε son IKK (IκB quinasas) no convencionales, que se activan por un pequeño subgrupo de señales inflamatorias, y son más conocidas por ser críticas para la respuesta antiviral, mediante la fosforilación de IRF3, IRF7 y STAT1, promoviendo la respuesta de interferones tipo 1 (144).

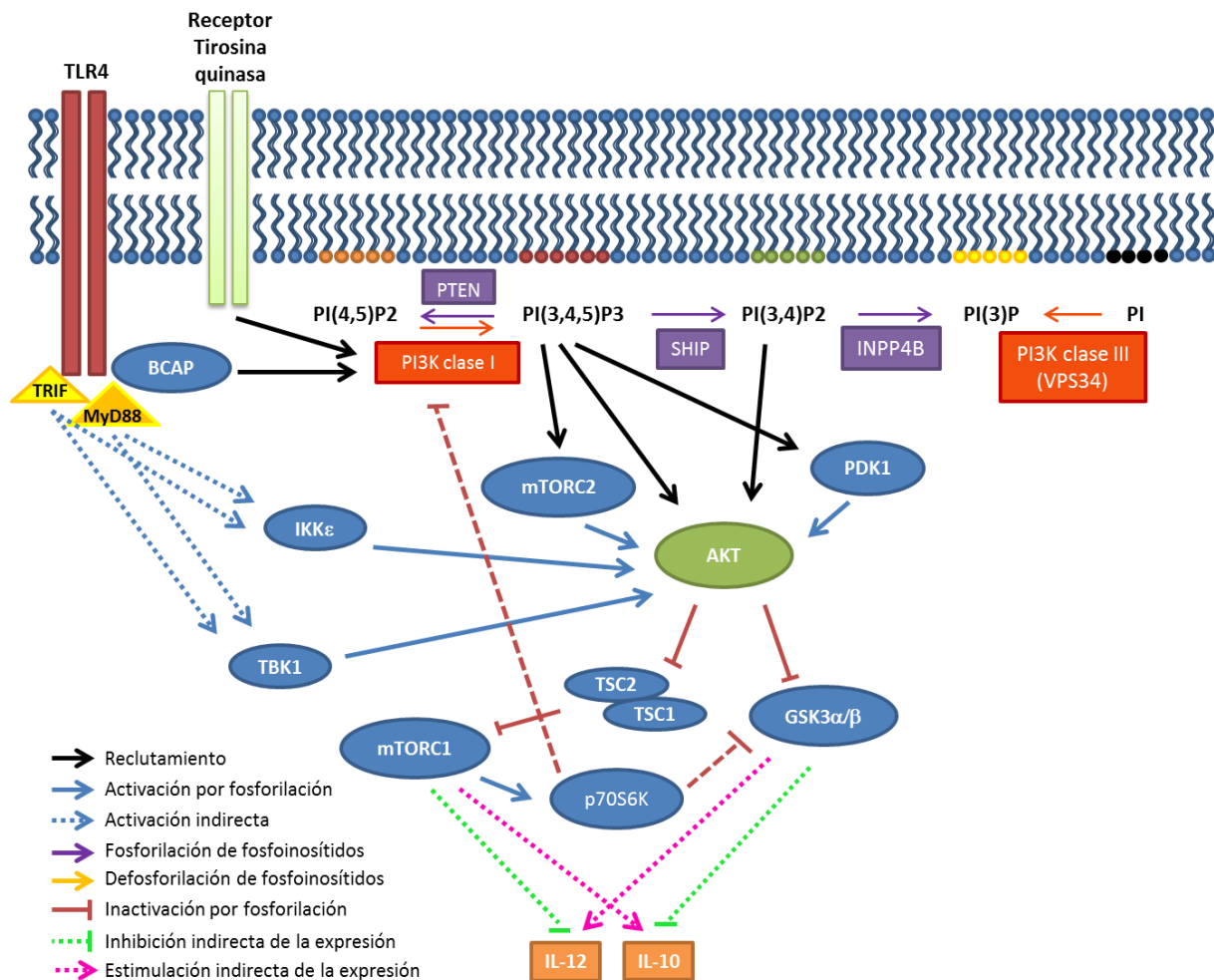


Figura 1.9 Esquema de señalización de la vía PI3K/Akt. PI3K es reclutada a membrana por diferentes receptores tirosina quinasa o a través de adaptadores como BCAP. Una vez activa, cataliza la fosforilación de PI(4,5)2P a PI(3,4,5)3P. PI(3,4,5)3P recluta a Akt, PDK1 y mTORC2 a la membrana plasmática, donde PDK1 y mTORC2 fosforilan y activan a Akt en las posición Thr308 y Ser473, respectivamente. Una vez fosforilado Akt induce la inhibición de GSK-3 y la activación indirecta de mTORC1. Este último a su vez fosforila diversos blancos entre ellos la quinasa p70S6K. A través de la activación de p70S6K mTORC1 es capaz de regular negativamente la actividad de PI3K, generándose un bucle de retroalimentación negativa del eje PI3K/Akt/mTORC1. Además, p70S6K es capaz de regular negativamente GSK-3 reforzando la inhibición mediada por Akt. Los ejes PI3K/Akt/GSK-3 y PI3K/Akt/mTORC1 son capaces de regular la expresión de IL-12 e IL-10 (201).

En células mieloides (DCs, monocitos, macrófagos, y otras células relacionadas) específicamente, la vía de PI3K/Akt es central en la supervivencia, proliferación, metabolismo y determinación de la función inmune de las mismas (145–149). Esta vía puede ser estimulada por factores de crecimiento (como en todos los tipos celulares), y por una variedad de estímulos inmunológicos (endógenos o exógenos), incluyendo agonistas de TLRs, citoquinas y quimioquinas. La señalización a partir de TLR4, receptor para LPS, activa PI3K por medio del adaptador BCAP (del inglés, *B cell adaptor for PI3K*) (136, 145, 150–152). PI3K junto a Akt y junto a dos de los blancos de Akt mencionados, forman dos de los

principales ejes de señalización que determinan el fenotipo de células mieloides en respuesta a estímulos: PI3K/Akt/GSK-3 y PI3K/Akt/mTORC1 (153, 154). Además PI3K, no necesariamente junto a Akt, es importante en los procesos de endocitosis mediada por receptores y fagocitosis (145–149).

La literatura actual sobre cómo la activación de la vía de PI3K/Akt afecta la respuesta de células del sistema inmune innato es controversial, encontrándose información que apoya tanto un papel pro-inflamatorio como uno anti-inflamatorio (155). Apoyando el papel pro-inflamatorio, la activación de la vía en respuesta a LPS aumenta la sobrevivencia de DCs y regula positivamente la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD40, potenciando la capacidad de estas células de inducir una respuesta adaptativa (136). Además en BMDM, inhibidores de PI3K, disminuyen la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , IL-6 e IL-1 β en respuesta a LPS (156). En el mismo sentido, varios grupos de investigación han reportado una asociación positiva entre la activación de la vía de PI3K/Akt y la activación de la vía canónica de NF κ B (56, 146, 157–160), aunque esto parece ser dependiente del tipo celular (161). Además, se ha reportado que GSK-3 es capaz de regular negativamente en DCs la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 (162); como la activación de la vía PI3K/Akt conduce a la inhibición de GSK-3, esto sugiere que esta vía también favorece la expresión de moléculas coestimuladoras. Por otra parte, apoyando un papel anti-inflamatorio, la inhibición de PI3K en monocitos y DCs estimulados con LPS aumenta la expresión de TNF α y IL-12, respectivamente (163, 164). En BMDCs, en particular, se encuentra muy bien estudiado que la activación del eje PI3K/Akt/GSK-3 (el cual como se dijo finaliza con la inhibición de la actividad de GSK-3) en respuesta a LPS inhibe la expresión de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 y potencia la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (155, 165). También en DCs, la activación del eje PI3K/Akt/mTORC1 regula negativamente la expresión de IL-12 y positivamente la expresión de IL-10 (166–168). Finalmente, un trabajo ha propuesto que el eje PI3K/Akt/mTORC1 y el eje PI3K/Akt/GSK-3 convergen modulando la respuesta de las citoquinas IL-12 e IL-10 en respuesta a LPS; esta convergencia se debe a que mTORC1 es capaz de fosforilar/activar p70S6K el cual una vez activo fosforila/inactiva GSK-3 (169).

1.3.3.2 Regulación de la vía de PI3K/Akt

La vía de PI3K/Akt se encuentra regulada a diferentes niveles. Para comenzar, puede ser regulada por el nivel de proteína total de PI3K de clase I. Se ha reportado que tanto la subunidad reguladora como la subunidad catalítica de algunas PI3K de clase I pueden ser específicamente ubiquitiniladas y posteriormente degradadas por el proteosoma, lo que regula de manera negativa la vía (170, 171). El mecanismo de regulación de la vía más estudiado es la degradación del producto generado por la actividad de las PI3K de clase I (PIP3) (Figura 1.9). El PIP3 es hidrolizado por las fosfatasas PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) y SHIP (del inglés, *SH2-containing inositol 5'-phosphatase*). PTEN desfosforila a PIP3 en la posición 3 para generar nuevamente el sustrato de las PI3K de clase I, PI(4,5)P2. En otras palabras, PTEN realiza el paso opuesto a la actividad de PI3K de clase I. PTEN es un regulador clave en el crecimiento celular y la apoptosis (172). Las mutaciones en PTEN generalmente se encuentran asociadas a diferentes tipos de cáncer (173), y la actividad supresora de tumores de PTEN se asocia a su capacidad de desfosforilar a PIP3 y consiguiente inhibición de la fosforilación de Akt (174). Por otro lado, SHIP desfosforila PIP3 en la posición 5, formando PI(3,4)P2. Varias proteínas efectoras con dominios PH, entre ellas Akt, son capaces de unirse a PI(3,4)P2 tan bien como a PIP3, por lo cual la actividad de SHIP no necesariamente inhibiría la vía de PI3K/Akt (ver sección 1.3.3.3) (130, 175). Sin embargo, una vez que se generó PI(3,4)P2, éste puede ser desfosforilado en su posición 4, por la fosfatasa InsPP4A/B, para formar PI3P (fosfatidilinositol 3-fosfato). Entonces, SHIP junto a InsPP4A/B sí regula negativamente la vía (176, 177). Las únicas proteínas caracterizadas con unión específica a PI(3,4)P2 son TAPP1 y TAPP2. Estudios sobre estas proteínas sugieren que regulan negativamente la fosforilación de Akt, por mecanismo desconocidos (175, 178, 179). Esto indica que PIP3 y PI(3,4)P2 tienen funciones diferentes, lo cual también sugiere para SHIP un rol importante como inhibidor de la respuesta específica de PIP3, mientras activa una respuesta específica de PI(3,4)P2 (180).

La vía de PI3K/Akt puede además ser regulada por los niveles totales de la proteína Akt. La quinasa puede ser tanto ubiquitinilada y degradada en el proteosoma, como degradada por caspasas en respuesta al factor VEGF (del inglés, *vascular endothelial growth factor*) o estímulos proapoptóticos (incluyendo TNF- α) (128). En células no inmunes, la actividad de

Akt puede estar regulada a través de su desfosforilación directa en la posición Ser473 por fosfatasa de la familia PHLPP (128, 181). En células mieloides, la única enzima que se ha propuesto que desfosforila Akt es PP2A. PP2A es una fosfatasa de serina/treonina compuesta por una subunidad estructural (PP2A/A), una subunidad reguladora (PP2A/B, de las cuales existen varias) y una subunidad catalítica (PP2A/C), que cataliza la desfosforilación de Akt en la posición Thr308 (184, 185). En macrófagos infectados con el parásito *Leishmania*, se observó que la activación de PP2A lleva a la desfosforilación de Akt e inhibición de secreción de citoquinas pro-inflamatorias (184, 185).

Se ha reportado en macrófagos que la activación exacerbada de mTORC1 inhibe la vía de PI3K/Akt a través de un bucle de retroalimentación negativa (186). No se conocen bien los mecanismos de este bucle, pero se cree que funcionan a nivel de los adaptadores que reclutan PI3K a membrana plasmática.

1.3.3.3 SHIP

SHIP se introduce en una sección aparte porque si bien, como ya se mencionó, puede regular la vía de PI3K/Akt, se cree que tiene funciones más allá de esta capacidad, y además es importante para el desarrollo de esta Tesis (187). Existen dos parálogos de SHIP, denominados SHIP1 y SHIP2. SHIP2 se expresa en un amplio rango de tejidos, y preferentemente en corazón, hígado, músculo esquelético y cerebro. Su función más estudiada es como regulador negativo de la síntesis de glucógeno inducida por insulina. En cambio, SHIP1 se expresa preferentemente en células hematopoyéticas (130). SHIP1 posee en su región central un dominio fosfatasa de fosfoinositol, que como se mencionó hidroliza selectivamente PIP3 generando PI(3,4)P2, y en sus extremos N- y C-terminales posee regiones de interacción con otras proteínas (188). Esto incluye, en el extremo N-terminal, un dominio SH2 que media la interacción con proteínas que poseen tirosinas fosforiladas incluyendo ITIM e ITAM (187, 189, 190). Además incluye, en el extremo C-terminal una región rica en prolina, que media la interacción con proteínas que posean dominios SH3, y que también puede participar en el reclutamiento de la proteína a membrana plasmática (173, 187, 191). El proceso de activación de SHIP1 no se encuentra totalmente descrito aún, aunque existe el consenso de que el reclutamiento a membrana plasmática, donde se encuentra con su blanco, PIP3, es crucial para la actividad fosfatasa. En otras palabras, el

reclutamiento a membrana de la proteína actuaría como mecanismo de regulación positiva por accesibilidad a sustrato (192). En el caso de TLR4, se sabe que la activación de este receptor, a través de MyD88, puede inducir la fosforilación (y presumiblemente, el reclutamiento a membrana) de SHIP1 por mecanismos desconocidos (193, 194). Además de lo anterior, SHIP1 es regulada por la cantidad de proteína total, a través de fosforilación y posterior degradación en el proteosoma (195). La cantidad de proteína total también es regulada transcripcionalmente en sentido positivo (156, 173, 196).

En células mieloides, SHIP1 es un regulador negativo de la proliferación inducida por citoquinas (187). Además, es necesaria para la tolerancia a endotoxinas en macrófagos, siendo en este contexto inducida por TGF- β autócrino, y a su vez disminuyendo la producción de citoquinas (156). También se ha observado que SHIP1 es un regulador negativo de la formación del complejo entre MyD88 y TLR4 (197). Las BMDCs SHIP1 $-/-$ muestran menor expresión de las citoquinas IL-12 e IL-10, y de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 que las BMDCs de tipo silvestre en respuesta a LPS (Figura 1.10) (145). En conjunto estos datos sugieren para SHIP1 un papel como regulador negativo de la señalización por TLR-4.

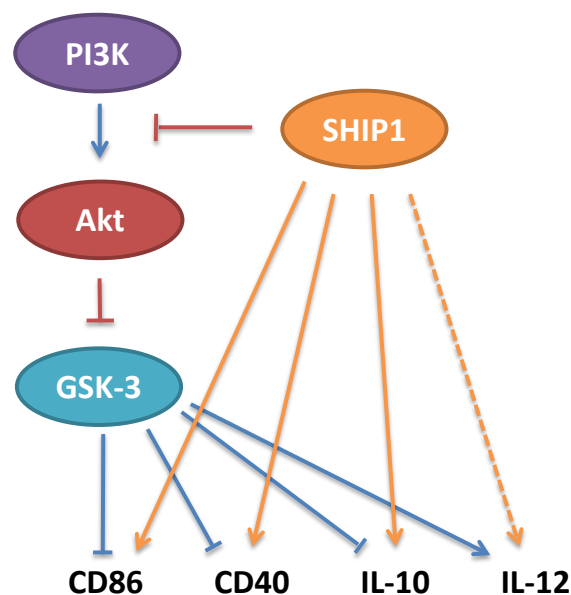


Figura 1.10 Resumen de los efectos sobre los parámetros estudiados en esta Tesis del eje PI3K/Akt/GSK-3 y de la fosfatasa SHIP1. La activación de PI3K recluta Akt a membrana plasmática, donde es activada. Una vez activa Akt fosforila a GSK-3 de forma inhibitoria. Se ha reportado que GSK-3 regula negativamente la expresión de CD40, CD86 y IL-10, y positivamente la expresión de IL-12 en células mieloides (162, 165). Los datos obtenidos utilizando BMDCs SHIP1 $-/-$ indican que SHIP1 es un regulador positivo de la expresión de CD40, CD86, IL10 y posiblemente de IL-12, lo cual concuerda con datos publicados (145).

Si bien en varios trabajos se parte de la base que los efectos celulares de SHIP1 se deben a la inhibición de la vía de PI3K/Akt, esto no debe ser necesariamente así en todos los casos, debido a: i) que los efectos de la ausencia de SHIP1 suelen ser los opuestos a los de una sobre-activación de PI3K/Akt, ii) que, como se mencionó, la generación de PI(3,4)P2 puede tener sus propios efectos de señalización y iii) las actividades de SHIP1 independientes de fosfatasa, como también se mencionó.

1.3.3.4 PI3K de clase II y III

Las PI3K de clase II han sido las menos estudiadas de las PI3K. En mamíferos, consisten de tres subunidades catalíticas (PI3KC2 α , C2 β , C2 γ), que a diferencia de las de clase I, no necesitan asociarse a subunidades reguladoras, ya que en sus regiones C-terminales presentan cada una un dominio C2 y un dominio PX (del inglés, *Phox homology*) que les permiten anclarse a membrana plasmática o a membrana de endosomas (130, 198). Las PI3K de clase II sintetizan PI3P y PI(3,4)P2, y se las ha relacionado principalmente con la regulación de la endocitosis y el tráfico vesicular (199). También otros estudios las han relacionado con la migración celular, el metabolismo de la glucosa, la contracción de células del músculo liso y la apoptosis (200).

Existe una única PI3K de clase III, denominada VPS34, la cual fosforila al fosfatidilinositol para formar PI3P, en endosomas y estructuras tempranas del proceso de autofagia (130, 199). VPS34 forma parte de más de un complejo cada uno con una localización celular específica, participando así en diferentes procesos celulares (201). Estos procesos incluyen el tráfico vesicular (en particular, en la vía endocítica), la formación del autofagosoma y el flujo de la autofagia, y la detección de aminoácidos extracelulares (200, 202, 203). El papel que juega VPS34 en la respuesta inmune no ha sido bien estudiado debido a la falta, hasta hace muy poco, de inhibidores específicos de esta quinasa, y a la dificultad de generar ratones VPS34 $-/-$. En particular, un estudio muestra que las PI3K de clase I y III juegan roles diferentes en la señalización por TLR. En este estudio, la actividad de las PI3K de clase III es necesaria para la señalización por TLRs intracelulares, probablemente a través de la internalización de sus ligandos, mientras que no es necesaria para la respuesta través de TLR4 (204). En los 2 últimos años se han desarrollado inhibidores específicos de VPS34, incluyendo los llamados VPS34IN-1 y SAR405 (205, 206).

1.3.3.5 Cambios en la vía de PI3K/Akt y metabólicos asociados con la maduración de DCs

Al ser estimuladas con agonistas de TLRs, las DCs sufren una transición metabólica de fosforilación oxidativa a glicólisis aeróbica. Esta transición se observa en términos del aumento del consumo de glucosa y de la producción de lactato (un metabolito final de la glicólisis aeróbica), así como de una disminución del consumo de oxígeno dependiente de la β -oxidación de ácidos grasos (207). Las DCs no son las únicas células del sistema inmune que al activarse sufren este cambio metabólico: los macrófagos y linfocitos T al activarse también presentan inducción de glicólisis aeróbica (208, 209). En las DCs, la inducción de la glicólisis aeróbica es necesaria para el proceso de activación convencional en respuesta a agonistas de TLRs (207). Si la transición metabólica falla, la maduración de la DC resulta inhibida a nivel post-transcripcional. Se propone que este cambio a metabolismo glicolítico asegura recursos metabólicos, en particular lípidos utilizados para aumentar el área del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, de forma de poder sustentar un alto nivel de expresión de proteínas secretorias y de membrana (143).

El cambio metabólico a glicólisis aeróbica ocurre en dos etapas. La primera, que tiene lugar en una escala de decenas de minutos a pocas horas, depende de la activación de Akt, y es contrarrestada por la quinasa AMPK (proteína quinasa activada por AMP). Al estimular DCs con agonistas de TLRs se activa Akt, y se inactiva la AMPK, desencadenando el cambio metabólico mencionado. Este cambio está ausente en DCs deficientes genéticamente en Akt1 (la isoforma de Akt más expresada en DCs) o DCs tratadas con inhibidores químicos de Akt (tricitiribina, Akt I/II) (143, 207, 210). Sin embargo, la inhibición de PI3K no afecta la inducción de la glicólisis al inicio de la respuesta. Esto lleva a la idea que, en este contexto, la activación de Akt sería promovida en forma independiente de PI3K. El mecanismo propuesto para la fosforilación de Akt, en este contexto, involucra a las IKK no convencionales TBK-1 y/o IKK ϵ (ver sección 1.3.3.1) (143). En suma, la fase rápida del cambio a glicólisis aeróbica depende de la fosforilación de Akt a través de una vía no canónica, dependiente de las quinasas TBK1/IKK ϵ (143).

La fase tardía del cambio a glicólisis aeróbica comienza a partir de las 9 horas de la estimulación con agonistas de TLRs. Esta fase ocurre específicamente en DCs productoras de

óxido nítrico (NO), como las BMDs, ya que depende de este metabolito. El NO bloquea el transporte de electrones mitocondrial, inhibiendo la fosforilación oxidativa y la producción de ATP por esta vía. En consecuencia, la célula cambia a un metabolismo de glicólisis aeróbica para poder contar con producción de ATP (211). El cambio a glicólisis aeróbica evaluado a las 24 horas es bloqueado por el inhibidor de PI3K LY294002. Si bien no se conoce el mecanismo subyacente, se propone que la actividad de PI3K es necesaria para la máxima actividad de la enzima iNOS (212).

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis es avanzar en la comprensión de los mecanismos a través de los cuales el material particulado de la CL condiciona DCs. Esto comprendió dos grandes aspectos. El primero, fue evaluar qué componentes presentes en pLL eran responsables de inducir los cambios observados en DCs, y el segundo fue identificar los mecanismos moleculares a nivel de señalización subyacentes a dichos cambios.

Para el conjunto de los objetivos, definimos la actividad de pLL, como la capacidad de inducir la molécula coestimuladora CD86 en BMDCs, y la capacidad de inhibir, en las mismas células coestimuladas con LPS, la producción de IL-12 y la expresión de CD40, así como de potenciar la producción de IL-10 y expresión de CD86; resumimos estos cambios como “sesgo fenotípico” o “inducción de fenotipo semi-maduro”.

La Tesis comprende un tercer aspecto, no conectado al objetivo inicial y surgido de resultados obtenidos, que procura entender la participación de PI3Ks de diferentes clases en la regulación de la producción de citoquinas en BMDCs estimuladas con agonistas de TLRs.

2.2 Objetivos específicos

Primera parte:

1. Evaluar si la actividad de pLL sobre BMDCs está presente en otras presentaciones físicas de la CL.
2. Evaluar la contribución de proteínas del hospedero a la actividad de pLL.
3. Evaluar la contribución de los componentes glucídicos y proteicos a la actividad de pLL.

Segunda parte:

4. Identificar posibles cambios en las vías de señalización intracelular NF- κ B, MAPKs y PI3K/Akt inducidos por pLL en BMDCs.
5. Evaluar la participación de la vía de PI3K/Akt en la actividad inmunoreguladora de pLL en BMDCs.
6. Explorar la forma de interacción y el mecanismo que gatilla la respuesta a pLL en BMDCs.
7. Evaluar posibles efectos de pLL sobre el metabolismo energético de BMDCs.

Tercera parte:

8. Evaluar separadamente los efectos de la inhibición de PI3K de clase I y de clase III sobre la producción de citoquinas inducidas por agonistas de TLRs en BMDCs.

3 Materiales y métodos

3.1 Muestras de origen biológico

3.1.1 Obtención de paredes de hidátides de *E. granulosus*

Para el desarrollo de esta tesis se trabajó con paredes de hidátides obtenidas de infecciones naturales (muestras de pulmón bovino, cedidas por Urexpert, Montevideo) o experimentales (modelo de infección intraperitoneal de ratones, cedidas por el Dr. Gustavo Mourglia). Las hidátides se abrieron con bisturí y se retiró el líquido hidático. Las paredes colapsadas se extrajeron, se lavaron con una solución salina fisiológica (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*), y se congelaron en PBS a -20°C hasta ser utilizadas. No se separó la capa germinativa, ya que su contribución cuantitativa a la pared es muy pequeña (103).

3.1.2 Producción de una suspensión de partículas de la capa laminar: pLL

Se descongelaron las paredes de las hidátides descritas en la sección anterior y se realizaron varios lavados rápidos con PBS. Se escurrieron sobre papel de filtro y se determinó su masa húmeda. Se realizaron dos lavados más con PBS en una relación 10 mL/g de masa húmeda durante 3 y 24 horas a 4°C, respectivamente. Posteriormente se lavaron con una solución de alta fuerza iónica, NaCl 2M, en las mismas condiciones. Con estos lavados se buscó minimizar la presencia de proteínas no estructurales en la muestra. Se realizaron varios lavados rápidos con agua destilada para remover las sales introducidas en el paso anterior y se mantuvo en un volumen pequeño. Las muestras así procesadas se congelaron a -80°C y se deshidrataron por liofilización (a no ser que se indique otro método). El material deshidratado se molió con un mortero y posteriormente entre dos vidrios esmerilados (porfirinización). Los pasos subsiguientes se realizaron en cámara de flujo laminar. Se resuspendió el pulverizado en PBS, EDTA 30 mM, pH 7.2, apirógeno, a razón de 2 mg de masa húmeda/mL, utilizando un homogenizador tipo Potter (previamente autoclavado). Se tuvo especial cuidado en hidratar todo el material lentamente sin generar grumos o apelmazados. El tratamiento con EDTA busca enriquecer la muestra en los componentes mucínicos de la CL mediante la eliminación de los depósitos de la sal cálcica de myo-inositol hexakisfosfato (InsP6Ca) (8). La suspensión obtenida se filtró secuencialmente por mallas de

serigrafía de tamaño de corte aproximado 85 y 23 μm , respectivamente. La preparación se lavó 10 veces con PBS apirógeno (con cociente de volúmenes 10:1), centrifugando 5 minutos a 3000 g cada vez. Luego se llevó a un volumen escogido y para determinar la concentración en masa seca de esta suspensión madre se tomaron alícuotas de la misma, prestando atención de homogenizar bien antes de cada toma, en tubos previamente masados. Las alícuotas se lavaron con agua destilada varias veces y se liofilizaron. Se determinó entonces la masa seca de material en cada alícuota y con ella la concentración de la suspensión madre en mg de masa seca/mL. La suspensión madre se llevó a una concentración de 10 mg de masa seca/mL en PBS apirógeno conteniendo una mezcla de antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomina) y antimicótico (0.25 $\mu\text{g/mL}$ anfotericina B), y se conservó a 4°C hasta su utilización. A la suspensión así obtenida la denominamos pLL (del inglés, *particulate Laminated Layer*). La puesta a punto inicial de esta preparación realizada por la Dra. Casaravilla, incluyó una verificación de que el método genera materiales libres de endotoxinas, por el ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL) (103).

3.1.3 Generación de nuevas preparaciones de la capa laminar: modificaciones físicas

Si bien pLL (específicamente preparado empleando un paso de deshidratación por liofilización) es el material modelo de esta tesis, se utilizaron diferentes materiales generados a partir de modificaciones de pLL o de la CL. A continuación se describen los diferentes procesos empleados para la obtención de dichos materiales:

3.1.3.1 pLL generado a partir de deshidratación por alcohol/acetona

Este material se generó siguiendo los pasos detallados para pLL, a excepción del paso de deshidratación. En vez de liofilizar, el material se deshidrató con alcohol 95% (2 incubaciones de 1 hora cada una) y acetona (2 incubaciones de 1 hora cada una). La acetona se eliminó por evaporación a 37°C.

3.1.3.2 Partículas de CL de tamaño mayor a 85 µm

Este material se generó siguiendo los pasos planteados para pLL, a excepción que en el paso de filtrado por mallas de serigrafía se colectó el material retenido por la malla de 85 µm de corte. Se realizaron 2 lavados con 5 mL de PBS de este material mientras se lo filtraba por la malla de 85 µm para asegurarnos que no quedaran partículas pequeñas ocluidas.

3.1.3.3 Partículas de CL obtenidas por procesamiento con *Tissue-Ruptor*

Para generar un material particulado de la CL evitando los pasos de deshidratación se utilizó un homogenizador de tejidos llamado *Tissue-ruptor* (Qiagen). Se trató a la CL de igual manera que para la preparación de pLL pero en vez de deshidratarla, se procesó en fresco con el equipo *Tissue-ruptor* hasta obtener una mezcla homogénea de partículas (por observación al microscopio de campo claro). De esta manera se generó un material particulado de gran tamaño.

Además, se buscó generar un material de tamaño de partícula similar a pLL sin usar un paso de deshidratación. Para esto se le realizó a la CL el procesamiento mencionado en el párrafo anterior, se la sometió a una leve sonicación (controlándose por microscopía de campo claro el tamaño de las partículas), y se la filtró por mallas de serigrafía de tamaño de corte de 23 µm. Para los pasos finales se prosiguió como indica el protocolo de preparación de pLL.

Finalmente, se buscó generar un material similar al descrito en el párrafo anterior pero que hubiera sufrido un paso de deshidratación. Para esto una vez obtenido el material filtrado por 23 µm según el párrafo anterior se lo congeló a -80°C y posteriormente se lo liofilizó. Luego se lo rehidrató con PBS por pipeteo y se lo filtró nuevamente por 23 µm. Luego se prosiguió como indica el protocolo de preparación de pLL.

3.1.3.4 Capa laminar “soluble”

Denominamos sLL (del inglés, *soluble laminar layer*) a la preparación “soluble” de las partículas de pLL. Para la obtención de sLL, se sonicó pLL durante 3 ciclos de 1 minuto a 60 W de potencia, utilizando el *Ultrasonic homogenizer* (4710 series; *Cole Parmer Instruments*). Los vástagos se lavaron con EtOH y se autoclavaron previamente. Luego el material se centrifugó a 15000 g durante 20 minutos y se conservó el sobrenadante. Para el cálculo de

masa seca se tomaron alícuotas de esta suspensión madre, en tubos previamente masados, se congelaron a -80°C y liofilizaron. Se determinó entonces la masa seca de material biológico en cada alícuota (teniendo en cuenta la masa aportada por las sales del PBS) y con ella la concentración de la suspensión madre en mg de masa seca/mL. A este material lo denominamos “soluble” porque la preparación fue sometida a centrifugación convencional, pero no fue sometida a ultracentrifugación, por lo que es concebible que contenga partículas de tamaño coloidal.

3.1.4 Generación de nuevas preparaciones de la capa laminar: modificaciones químicas o enzimáticas

3.1.4.1 Tratamiento proteolítico

Se realizaron diferentes tratamientos proteolíticos a pLL utilizando pronasa (Sigma, #P5147), tripsina (Worthington, #LS02122) o endoproteinasa GluC (Worthington, #LS02126). Las proteasas pronasa y tripsina primero se incubaron 1 hora a 37°C en solución tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8 para eliminar actividades enzimáticas contaminantes. Luego a las suspensiones de pLL (llevadas a solución tampón Tris-HCl 20 mM pH 8, a una concentración final de 5 mg/mL) se les agregó pronasa o tripsina a una concentración final de 0.125 mg/mL. Las mezclas se incubaron durante toda la noche a 37°C , con agitación. Luego se lavó 10 veces por centrifugación (3000 g durante 5 minutos) con PBS apirógeno para eliminar las proteasas. En el caso de la pronasa, en el décimo lavado se evaluó su eliminación determinando la ausencia de actividad proeolítica sobre un sustrato cromogénico (Suc-AAPF-AMC, Sigma-Aldrich). Para el tratamiento con endoproteinasa GluC, se incubó una suspensión de pLL (llevada a solución tampón PBS pH 8 CaCl 0.1 M, a una concentración de 5 mg/mL) con la enzima (concentración final de 0.5 mg/mL durante toda la noche a 37°C , con agitación. Luego se lavó 10 veces por centrifugación (3000 g durante 5 minutos) con PBS apirógeno. Finalmente las suspensiones se almacenaron en PBS apirógeno conteniendo una mezcla de antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina) y antimicótico (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anfotericina B) a 4°C .

3.1.4.2 Tratamiento de oxidación de azúcares con metaperiodato de sodio

Se llevó una suspensión de pLL a solución tampón acetato de sodio 50 mM pH 4.5 (concentración final de pLL 5 mg/mL). Se agregó un volumen igual de una solución de metaperiodato de sodio 20 mM preparado en la misma solución tampón (concentración final 10 mM) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Luego, se agregó un volumen igual de una solución acuosa de borohidruro de sodio 200 mM (sin ajustar el pH). El agente reductor borohidruro de sodio se emplea para reducir a alcoholes primarios los grupos aldehído (reactivos) generados por la oxidación de dioles vecinales por el periodato. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación. Luego la suspensión se lavó 10 veces en PBS apirógeno mediante centrifugación (3000 g durante 5 minutos). Además, se realizó un tratamiento control en cual se incubó pLL con el tampón acetato, luego se le agregó el borohidruro de sodio, y se lavó 10 veces en PBS apirógeno. Finalmente las suspensiones se almacenaron en PBS apirógeno conteniendo una mezcla de antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina) y antimicótico (0.25 µg/mL anfotericina B) a 4°C.

3.1.4.3 Tratamiento de reducción de enlaces disulfuros con ditioneitol

Se llevó una suspensión de pLL a solución tampón Tris-HCl 50 mM pH8 (concentración final de pLL de 5 mg/mL). Se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos y se resuspendió en una solución tampón Tris-HCl 50 mM pH8 ditioneitol (DTT) 50 mM (en un volumen 10 veces mayor al residuo generado por las partículas de pLL, cociente de volúmenes 10:1) durante 1 hora a 37°C, con agitación. Luego se lavó 2 veces con una solución Tris-HCl 50 mM pH8 (con cociente de volúmenes 10:1) y se incubó la suspensión con Tris-HCl 50 mM pH8 iodoacetamida (IAA) 100 mM durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación, en oscuridad. La IAA se emplea para alquilar los tioles generados por la reducción de los disulfuros. Finalmente se lavó 10 veces por centrifugación (3000 g durante 5 minutos) con PBS apirógeno. Las suspensiones se almacenaron en PBS apirógeno conteniendo una mezcla de antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina) y antimicótico (0.25 µg/mL anfotericina B) a 4°C.

3.1.5 Extracción e identificación de proteínas del hospedero adsorbidas a pLL

Para la identificación de las proteínas del hospedero adsorbidas a la capa laminar se incubó 1 mg de masa seca de pLL con una solución tampón muestra de SDS-PAGE 6X (ver sección 3.5.2) durante 1 hora a 37°C. Luego se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y se realizó una electroforesis en un gel de 10 % m/v de poliacrilamida en condiciones reductoras (ver sección 3.5.2). La tinción con azul brillante de Coomassie permitió observar en el gel a las proteínas no estructurales de la CL, ya que las mucinas no migran en este sistema (26). Se recortaron las bandas más intensas del gel y se identificaron mediante espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*) en la unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo. Brevemente, las bandas recortadas se digirieron con tripsina (Sequencing-grade, Promega) durante toda la noche a 37°C, se extrajeron los péptidos generados del gel, se concentraron por secado al vacío (eliminandose el exceso de sales), y se analizaron. La elución peptídica se analizó usando el equipo 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Las proteínas se identificaron usando la base de datos NCBI nr y el *software* Mascot para las búsquedas.

Para extraer las proteínas del hospedero adsorbidas a pLL, y verificar dicha extracción, se realizaron incubaciones con diferentes soluciones de lavado, detalladas al final de esta sección. Se resuspendió 1 mg de masa seca de pLL en la solución de lavado correspondiente y se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante se incubó el material insoluble (pLL) con la solución de lavado seleccionada en un volumen 10 veces mayor al volumen del *pellet*. Posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos y se separó el sobrenadante y el residuo para su análisis. Para eliminar las sales de los sobrenadantes se realizaron 2 diálisis consecutivas en agua destilada con una relación de volumen 100:1, utilizando membranas de diálisis con un tamaño de corte de 12 KDa (Sigma-Aldrich, #D9777-100FT). Luego se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA, del inglés *trichloroacetic acid*, ver sección 3.5.1) y se resuspendieron en tampón muestra de SDS-PAGE 6X. Finalmente, se analizó por electroforesis en un gel de 10 % m/v de poliacrilamida en condiciones reductoras. Luego de la tinción con azul brillante de Coomassie fue posible observar en el gel a las proteínas extraídas de pLL con cada método de lavado. Por otra parte, al remanente insoluble separado en el paso de precipitado generado por la centrifugación luego de la incubación con la solución de lavado se lo lavó 2

veces con un volumen 10 veces mayor de PBS, y se lo incubó con tampón muestra de SDS-PAGE 6X durante 1 hora a 37°C. Se centrifugó a 5000 g durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante (conteniendo las proteínas no extraídas por el método de lavado analizado) y se analizó por electroforesis en paralelo al análisis ya mencionado de las proteínas extraídas.

Las soluciones y métodos de lavado (extracción) usados fueron:

- Solución de KCN a saturación en PBS (aproximadamente 12 M). Se incubó a pLL durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación.
- Solución 6 M de Urea en PBS. Se incubó pLL durante 2 horas a 37°C, con agitación.
- Solución tampón glicina-HCl 0.2 M, pH2. Se incubó pLL durante 2 horas a 50°C, con agitación.
- Soluciones de cloruro de guanidinio; 1 M, 2 M y 3 M, en 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 50 mM Tris-HCl pH 8. Se incubó pLL en cada una de estas soluciones durante 1 hora a 37°C, con agitación.

3.2 Materiales sintéticos: Sephadex-G100, Lx BSA y Lx IgG

Los materiales particulados sintéticos empleados fueron partículas de látex (de poliestireno, 0.8 µm de diámetro) adsorbidas con albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) o inmunoglobulina G (IgG) humana, y Sephadex G-100 (100-300 µm, GE #17-0060-01). Los particulados de látex fueron preparados por la Dra. Iris Miraballes (Laboratorio de Biotecnología, Polo Tecnológico de Pando). Los látex se lavaron por centrifugación 10 veces a 10000 g por 10 minutos con PBS apirógeno, y se llevaron a un volumen conocido. Se tomaron alícuotas de la suspensión madre para liofilizar y determinar su masa seca. Por otra parte, las partículas de Sephadex G-100 se hidrataron con PBS apirógeno y se lavaron 10 veces con la misma solución, centrifugando a 5000 g durante 5 minutos cada vez. A diferencia de lo que ocurre con pLL o de los particulados de látex, las partículas de Sephadex G100 decantan rápidamente y se forma un *pellet* fácilmente. Por esta razón, se supuso que no hubo pérdida de masa durante los lavados, y no se liofilizó para determinar la concentración. Finalmente los tres materiales particulados se almacenaron en PBS apirógeno conteniendo una mezcla de antibióticos (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL

estreptomycin) y antimicótico (0.25 µg/mL anfotericina B) a 4°C hasta su utilización. Se verificó la ausencia de endotoxinas en los materiales porque al estimular con ellos BMDCs no indujeron la expresión de citoquinas, en particular IL-12/23p40 o IL-12p70.

3.3 Técnicas para la visualización de pLL

3.3.1 Marcado de pLL con isotiocianato de fluoresceína

Se resuspendió 1 mg de masa seca de pLL en una solución de K₂CO₃ 0.1 M (sin ajustar el pH). Luego, se agregó al *pellet* escurrido de pLL con 1 mL de una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC) 50 µg/mL en 0.1 M K₂CO₃, a 4°C durante toda la noche en oscuridad, con agitación. Finalmente, se lavó 10 veces por centrifugación con 1 mL de PBS apirógeno. A la suspensión se le agregó la mezcla de penicilina, estreptomycin y anfotericina B, y se almacenó a 4°C. El marcado de las partículas se controló por microscopía de fluorescencia, utilizando el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nikon DS-Ri1 y el procesador de imágenes Nis-Elements BR3.0.

3.3.2 Marcado de pLL con la lectina PNA

Para la visualización de las partículas de pLL, así como para la verificación de la integridad de los azúcares presentes en pLL, se empleó PNA (del inglés, *peanut agglutinin*) una lectina que se une a acetilgalactosa-β(1-3)-N-acetilgalactosamina-α-Ser/Thr, conjugada a biotina o FITC (*Vector Laboratories*).

Para la visualización y evaluación de la presentación física de la suspensión de pLL o de las partículas modificadas mediante diferentes tratamientos, se utilizó PNA conjugada a FITC (PNA-FITC). Se incubaron las suspensiones de pLL (concentración 10 mg/mL) con PNA-FITC a una concentración final de 5 µg/mL durante 1 hora a 37°C, en oscuridad. Luego se lavaron las suspensiones 5 veces con PBS y se almacenaron en oscuridad a a 4°C.

Para evaluar la integridad de los azúcares luego del tratamiento con metaperiodato de sodio/borohidruro de sodio se realizaron *dot blots* sobre membranas de PVDF. Se sembraron 5 µg de las distintas muestras de pLL previamente solubilizadas por sonicación en un volumen de 5 µL. Luego las membranas se bloquearon con PBS 0.1% v/v Tween durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron, y se incubaron con 0.5 µg/ml PNA-

biotinilada, en PBS 0.05% v/v Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron 4 veces y se incubaron 1 hora con 1 µg/ml de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Calbiochem) en PBS 0.05% v/v Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 5 lavados y se reveló utilizando una solución tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.2 0.06 % m/v DAB 0.03% v/v de H₂O₂. La reacción cromogénica se detuvo mediante lavados con agua destilada. Para los lavados se utilizó PBS 0.05% v/v Tween durante 10 minutos con agitación.

3.4 Métodos generales de cultivo celular

Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera conteniendo 5 % v/v de CO₂, a no ser que se indique otra cosa. Los ensayos se realizaron en placas de cultivo celular, en general de 96 pocillos (NUNC, #167008), a menos que se indique otra cosa.

3.4.1 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea: BMDC

Para la generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs, del inglés *bone marrow-derived dendritic cells*) se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad, provenientes del bioterio del Instituto Pasteur de Montevideo. El protocolo descrito a continuación fue reportado por Lutz et al. (44) y fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), N° 241000-001186-12. Los ratones se sacrificaron por inhalado del anestésico isofluorano (Abbott #B506). Se realizó una disección para exponer las patas traseras y extraer fémures y tibias. Los huesos obtenidos se limpiaron de tejido circundante y se sumergieron en alcohol al 70 % v/v durante 3 a 5 minutos. Los pasos siguientes se realizaron en cámara de flujo laminar con material estéril. Los huesos se lavaron 3 veces con PBS apirógeno frío y se cortaron las epífisis de cada uno, exponiendo la médula. Los huesos se perfundieron con PBS apirógeno (2 ml por cada par de huesos, utilizando una aguja 24G), expulsándose la médula ósea hacia una placa de Petri. Una vez obtenida la médula de cada hueso, se disgregaron los cúmulos de células por repetidos pasajes por la aguja (aspirado y liberación, no más de cuatro veces). Se tomó una alícuota y se determinó el número de células presentes en la suspensión utilizando una Cámara de Neubauer. Se llevó la suspensión a una concentración de 3.5×10^6 células/400 µL PBS apirógeno centrifugando a 1200 rpm durante 5 minutos cuando fue necesario. Se

dispensaron 3.5×10^6 células por placa de Petri conteniendo 10 mL medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma #R6504) suplementado con 10 mM HEPES (Sigma #H4034), antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B, Sigma #P3539), 10% v/v suero fetal bovino (SFB, ProBioMont) y 20 ng/mL del factor de diferenciación de células dendríticas GM-CSF (PeproTech #315-03). A esta solución se la denominó “medio completo”. Se tuvo especial cuidado al dispensar la suspensión celular en cada placa de Petri, haciéndolo por goteo, formando una “nube” de células compacta en el centro de la placa. Al día 3 se agregaron 10 mL de medio completo y a los días 6 y 8 se extrajeron 9 mL de medio de cada placa y se agregaron 10 mL de medio completo fresco. La manipulación se realizó de forma delicada, procurando no agitar la “nube” de células. Al día 10 se descartaron 8 mL de líquido de cada placa y se recolectaron las células en los 12 mL de líquido restante. Con este método de preparación de BMDC se obtuvieron entre 7 y 10 millones de BMDCs por placa correspondientes a la fracción de células menos adherentes presentes. El cultivo al día 10 se evaluó por citometría de flujo, obteniéndose entre un 75 y un 95 % de eventos positivos para CD11c (marcador de células dendríticas), entre un 10 y un 30 % de eventos altos para CD86 alto (molécula co-estimuladora que refleja el estado de activación de las células), y entre 5 y un 10 % eventos correspondientes a células muertas (determinado por marcado con To-Pro-3, sección 3.5.7). Como se mencionó en la Introducción, estudios recientes publicados durante el transcurso de esta Tesis indican que la generación de BMDCs por un protocolo similar si bien no idéntico al utilizado aquí, genera una población celular heterogénea, con presencia de células dendríticas y macrófagos CD11c⁺ (213, 214). No se intentó obtener resultados que discriminaran entre estas dos poblaciones potencialmente presentes en los cultivos.

3.4.2 Generación de macrófagos derivados de médula ósea: BMDM

Para la generación de macrófagos derivadas de médula ósea (BMDMs, del inglés *bone marrow-derived macrophages*) se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad, provenientes del bioterio Anne Walker, Universidad de Edimburgo. Para la preparación de las células se utilizó el protocolo descrito a continuación, el cual cumple con los requisitos de la *Animal (Scientific procedures) Act*, de la Universidad de Edimburgo, y era el utilizado en el laboratorio de la Dra. Judith Allen (en ese momento Instituto de Inmunología e Infección, Universidad de Edimburgo, Reino Unido) para la generación de BMDMs. Se procedió en la

forma descrita para la generación de BMDCs hasta el paso de perfusión de los huesos (ver sección 3.4.1), que se hizo con DMEM sin SFB. Una vez obtenida la médula de cada hueso, se disgregaron los cúmulos de células por repetidos pasajes por la aguja (aspirado y liberación). Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos y se volvieron a suspender en una solución de lisis de eritrocitos por 5 minutos (2.5 mL por ratón). Luego se lavaron 3 veces por centrifugación y se volvieron a suspender en medio DMEM completo (3.7 g/L de bicarbonato de sodio, L-glutamina 2mM, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B, HEPES 10 mM, y SFB 10 % v/v). Se contó el número de células en cámara de Neubauer y se diluyeron en DMEM completo suplementado con SFB 25 % v/v y sobrenadante de células L929 (productoras de G-CSF) al 25 % v/v, de forma de obtener una concentración de 7.5×10^6 células/15 mL de medio, volumen que se dispensó por placa de Petri. De esta manera se incubó durante 7 días, realizándose un cambio de medio en el día 4 ó 5. Luego, las células se cosecharon retirando el medio e incubándolas con 10 mL/placa de una solución de despegado (PBS, glucosa 0.18 g/L y EDTA 3 mM). Se dejó durante 10 minutos a 37 °C y las células se recolectaron por pipeteo, luego de agregar medio completo. Las células se lavaron por centrifugación a 300 g durante 5 minutos, se contaron, y por último se volvieron a suspender en medio DMEM completo suplementado con SFB 10 % v/v. Previo a cada ensayo se dejó que las células se adhirieran a las placas al menos durante 3 horas.

3.4.3 Obtención de macrófagos peritoneales provenientes de estimulación con medio tioglicolato

Para la obtención de macrófagos peritoneales provenientes de estimulación con medio tioglicolato (Tio-Mac) se utilizaron ratones hembras C57BL/6 de al menos 8 semanas de edad, provenientes del bioterio de la División de Laboratorios Veterinarios del MGAP (DILAVE). El protocolo descrito a continuación fue aprobado por la CHEA, N° 101900-001384-14. Se preparó medio tioglicolato 4% m/v (Sigma-Aldrich, #B-2551) y se autoclavó. Se mantuvo en oscuridad durante al menos 3 meses y se utilizó para inyectar intraperitonealmente 450 µL/ratón. Al día 3 postinyección se sacrificó al animal por inhalación del anestésico isofluorano y se realizó dos lavados de 3 mL cada uno y uno final de 4 mL con medio RPMI 0.2 % SFB. Las células recuperadas se contaron con cámara de Neubauer. Se sembraron 5×10^5 células por pocillo en placas de 96 pozos y se mantuvieron

en incubador toda la noche antes de seguir con la manipulación. Este método permitió obtener aproximadamente entre 8 y 15 millones de células peritoneales por ratón, de las cuales entre el 75 y 90 % correspondían a macrófagos, según expresión de los marcadores CD11b y F4/80, evaluados por citometría de flujo.

3.4.4 Ensayos de la actividad de pLL sobre BMDCs

Se sembraron 4×10^5 BMDCs en 100 μ L de medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma #R6504) suplementado con 10 mM HEPES (Sigma #H4034), antibiótico/antimicótico, 10% v/v SFB y 5 ng/mL de GM-CSF en placas de 96 pocillos. A este medio lo llamaremos “medio de incubación”. Se dejó sedimentar a las células durante 1 hora y luego se agregó 10 μ g por pocillo de pLL (o el estímulo seleccionado), en 50 μ L de medio de incubación, junto con 50 μ L de LPS 40 ng/mL (para una concentración final de 10 ng/mL). Dieciocho horas más tarde se cuantificó la producción de citoquinas en el sobrenadante mediante ensayos de ELISA. Además, a este tiempo se evaluó por citometría de flujo la expresión de CD40 y CD86 en las células CD11c⁺ y To-Pro3 negativas (Figura 7.1, Anexo 1). La viabilidad celular luego de los diferentes estímulos se indica en la Tabla 7.1 de Anexo 1.

3.4.5 Ensayos de la actividad de pLL sobre Tio-Mac

Se sembraron en placas de 96 pocillos 5×10^5 Tio-Mac en 100 μ L de medio DMEM *low glucose* (Sigma-Aldrich #D5523) suplementado con 10 mM HEPES y antibiótico/antimicótico, y SFB 10 % v/v (a este medio lo denominamos medio completo para Tio-Mac). El cultivo se mantuvo en el incubador al menos 4 horas antes de seguir con la manipulación. Se lavó, para eliminar las células no adherentes con 100 μ L de medio DMEM *low glucose*, y se agregaron 100 μ L de medio completo para Tio-Mac. Luego se agregaron, en 50 μ L del medio completo para Tio-Mac, 50 μ g de pLL/pozo junto con 50 μ L de LPS 40 ng/mL (para una concentración final de 10 ng/mL). Estas células se utilizaron para ensayos cortos, en los que donde se evaluó por *Western-blot* la fosforilación de Akt en la posición Ser473, y para ensayos de citometría, 18 horas luego de la estimulación, para analizar la expresión de CD40.

3.4.6 Adsorción de sLL a placas de cultivo, y evaluación de la actividad sobre BMDCs

Se incubaron placas de cultivo de 96 pocillos durante toda la noche con 100 μ L de diferentes concentraciones de sLL (diluciones al medio a partir de 1 mg/mL). Se lavó y se bloqueó con 200 μ L de *Carbo-Free Blocking Solution* (Vector, #SP-5040) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavó y se incubó con 100 μ L de PNA-biotina 1 μ g/mL en PBS 0.05% Tween durante 90 minutos a 37°C. Luego se lavó y se incubó con el conjugado estreptavidina-peroxidasa (MP Biomedicals, #623441) en una dilución 1:1000 durante 40 minutos a 37°C. Finalmente, se lavó y reveló agregando 100 μ L de una solución tetrametilbencidina (TMB, Applichem #A3840). El desarrollo de color se detuvo por agregado de 50 μ L de H₂SO₄ 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Todos los lavados se realizaron con PBS 0.05% v/v Tween-20.

A partir del ensayo detallado en la sección anterior se eligió la concentración de 200 μ g/mL para adsorber sLL a las placas de cultivo para los ensayos con BMDCs. Se incubaron las placas con 100 μ L por pocillo de una solución de sLL en PBS a esta concentración durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó 3 veces con PBS apirógeno. Posteriormente se sembraron 4x10⁵ BMDCs/pozo en 100 μ L de medio de incubación. Se dejó que las células sedimentaran durante 1 hora, se agregó 100 μ L LPS 20 ng/mL, y 18 horas más tarde se cuantificó en el sobrenadante IL-10 e IL-12/23p40.

3.4.7 Ensayo de bloqueo de Fc γ RII/III en BMDCs

Se sembraron 4x10⁵ BMDCs/pocillo en 100 μ L de medio de incubación en placas de 96 pocillos. Treinta minutos más tarde, las células se preincubaron con 50 μ L de medio de incubación conteniendo el anticuerpo anti-Fc γ RII/III (BD Pharmingen, #553140) a una concentración final de 5 μ g/mL, o su control isotípico (BD Pharmingen, #553985) a la misma concentración, durante 30 minutos. Luego las BMDCs se estimularon con pLL (10 μ g/pocillo), o medio como control, en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL concentración final) durante 18 horas, y se cuantificó la expresión de IL-10, IL-12/23p40, CD40 y CD86.

3.4.8 Evaluación de la actividad de un péptido sintético sobre BMDCs

A partir de resultados obtenidos durante el transcurso de esta tesis surge como candidato de la actividad inmunoreguladora de pLL sobre BMDCs la región N-terminal de las apomucinas EGC0002904/4254 (secuencia: HA**C**KQSPPPM). Para probar si este péptido es responsable de la actividad de pLL sobre BMDCs se mandó sintetizar el péptido a Peptron, junto con un péptido control con la misma composición aminoacídica pero con diferente secuencia (SP**C**PQPKHAM), en la que únicamente se mantuvo en la posición al residuo de cisteína. Ambos péptidos se encuentran formados por dímeros unidos por disulfuro y metilados en sus extremos carboxilos.

Se sembraron 4×10^5 BMDCs/pocillo en 100 μ L de medio de incubación en placas de 96 pocillos, y se dejaron decantar durante 1 hora. Luego se estimularon con 90 μ L del péptido candidato o el péptido control (en concentraciones finales 150 μ M, 15 μ M, 1.5 μ M, y 150 nM), y en presencia o ausencia de pLL (10 μ g/por pocillo), y de LPS (concentración final 10 ng/mL), agregados en 10 μ L de medio de incubación. Tanto los péptidos, como pLL y el LPS se agregaron al mismo tiempo. Luego de 18 horas se cuantificó la expresión de IL-10 y IL-12p70, CD40 y CD86. De esta manera, se exploró la capacidad del péptido de modular la respuesta de las BMDCs tanto en presencia o ausencia de pLL, como en presencia o ausencia de LPS. Este ensayo además nos permitió verificar si pLL y el péptido sintético compiten o colaboran entre ellos en la modulación de la respuesta de las BMDCs.

3.4.9 Evaluación de fagocitosis en BMDCs expuestas a pLL

Se sembraron 4×10^5 BMDCs/pocillo en 100 μ L de medio de incubación en placas de 96 pocillos. Se dejaron sedimentar las células 1 hora y se estimularon en ausencia o presencia de pLL (10 μ g/por pocillo) en 50 μ L de medio de incubación durante 1 hora. Luego se agregaron microesferas de 5.24 μ m, con el fluoróforo *Flash Red* incorporado (MS, Bangs Laboratories, #FA06F) a una razón de 2 microesferas por célula en 50 μ L, y 1 hora más tarde se evaluó por citometría de flujo la fagocitosis de microesferas. Se realizaron controles incubando las BMDCs en hielo, condición en que la fagocitosis se encuentra inhibida por la baja temperatura.

3.4.10 Estudios de la actividad de pLL sobre BMDCs empleando inhibidores químicos

Se sembraron 4×10^5 BMDCs/pocillo en 100 μ L de medio de incubación en placas de 96 pocillos. Treinta minutos más tarde se preincubaron las células con 50 μ L del inhibidor o del vehículo correspondiente (Tabla 3.1) durante 30 minutos. Luego se estimularon las BMDCs en ausencia o presencia de pLL (10 μ g/por pocillo), en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL concentración final) durante 18 horas y se cuantificaron moléculas de superficie por citometría de flujo (ver sección 3.5.6), viabilidad por exclusión de To-Pro3 (ver sección 3.5.7) y citoquinas en el sobrenadante por ELISA (ver sección 3.5.8). En la Tabla 3.1 se indican los nombres, blancos, concentraciones finales utilizadas en los ensayos, y proveedores de todos los inhibidores químicos utilizados.

Tabla 3.1. Inhibidores utilizados en los estudios de la actividad de pLL sobre vías de señalización intracelular.

Nombre	Blanco	[] _{final} utilizada	Proveedor
Citocalasina D	Polimerización de actina	5 μ M	Sigma-Aldrich
UO126	Inhibidor de MEK1 y MEK2	5 μ M	Cell Signaling Technology
Wortmanina	Inhibidor general de PI3K	100 nM	Sigma-Aldrich
VPS34-IN1	Inhibidor de VPS34	1 μ M	Division of Signal Transduction Therapy Unit, University of Dundee
SAR405	Inhibidor de VPS34	1 μ M	Division of Signal Transduction Therapy Unit University of Dundee
GSK650394	Inhibidor de SGK1, SGK2	10 μ M	APExBio
EMD638683	Inhibidor genreal de SGKs	30 μ M	APExBio
GDC-0941	Inhibidor de PI3K de clase I	5 μ M	APExBio
3 α -Aminocolestano	Inhibidor de SHIP	20 μ M	EchelonBiosciences
Triciribina	Inhibidor de Akt	1.5 μ M	Calbiochem
Akt VIII	Inhibidor de Akt	10 μ M	Merck-Millipore
Amlexanox	Inhibidor de TBK1 y IKK ϵ	200 μ M	Sigma-Aldrich
Rapamicina	Inhibidor de mTORC	10 nM	Cell Signaling Technology
Torin1	Inhibidor de mTORC	10 nM	Cell Signaling Technology
SB216763	Inhibidor de GSK3	10 μ M	ApexBio
Piceatanol	Inhibidor de Syk	25 μ M	Santa Cruz Biotechnology

3.4.11 Generación de lisados celulares

Para el análisis de las vías de señalización, se estimularon las células a 37°C durante diferentes tiempos, se detuvo el proceso por pasaje a hielo, y se lavó por centrifugación con PBS frío (350 g durante 4 minutos, a 4°C). Luego se retiró el PBS y se agregaron 30 µL por pocillo (de placa de 96 pocillos) de solución de lisis (PBS 1% v/v Tritón X-100, conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa, Santa Cruz Biotechnology #SC-29130 y #SC-45045, respectivamente, usados a las concentraciones recomendadas). Las muestras lisadas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de ser analizadas por *Western blot*. Previó al paso de SDS-PAGE, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos y se retiró el precipitado (principalmente ADN celular). Luego se agregó 10 µL de solución tampón muestra 4X.

3.5 Técnicas generales de análisis

3.5.1 Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

En experimentos específicos, las muestras se concentraron por precipitación con TCA (del inglés, *trichloroacetic acid*) previo a la corrida electroforética. Para ello se agregó TCA al 10 % v/v final durante 30 minutos en hielo. Luego, se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos a 4°C. El material precipitado se lavó con acetona fría y luego se disolvió en el tampón muestra 6X para el SDS-PAGE.

3.5.2 SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, del inglés *SDS-polyacrylamide gel electroforesis*) se realizó de acuerdo a lo descrito por Laemmli et al. (215). Se emplearon geles de poliacrilamida concentradores al 4% m/v y geles separadores al 10% m/v, todos de 1.5 mm de espesor. Previó a la corrida, las muestras se mezclaron con una solución tampón muestra 6X (Tris/HCl 0.35M pH 6.8 con 10% m/v SDS 30% m/v glicerol y 0.12 mg/mL azul de bromofenol) y se redujeron los enlaces disulfuro mediante agregado de ditioneitol (DTT, concentración final 20 mM). En algunos experimentos se utilizó una solución tampón muestra 4X (NuPAGE LDS Sample Buffer, # NP0007). Las muestras se desnaturalizaron por incubación en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Junto a las

muestras se corrió un marcador de peso molecular de rango 6.5 a 200 kDa (SigmaMarker Wide Range, Sigma #S8445) y/o marcador de peso molecular preteñido de rango 27 a 180 kDa (Prestained Molecular Marker, Sigma #SDS7B2). Las corridas electroforéticas se realizaron en el sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad, a intensidad de corriente constante (25-35 mA/gel) a temperatura ambiente. Como solución de corrida se utilizó una solución tampón Tris-glicina (Tris al 0.3 % m/v, glicina 1.44 % m/v, SDS 0.1 % m/v).

3.5.3 Tinción con azul brillante de Coomassie (CBB)

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con solución de azul brillante de Coomassie (CBB) R-250 (CBB R-250 al 0.1% m/v en ácido acético al 10% v/v y metanol al 25% v/v) durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Solución de teñido: Los geles se decoloraron utilizando la solución de desteñido: ácido acético al 7.5% v/v y metanol al 5% v/v. Se realizaron varios cambios de la solución de desteñido, incubando a 37°C con agitación.

3.5.4 Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Las membranas de PVDF (Millipore #IPVH00010) se lavaron con metanol durante 3 a 5 minutos. Luego se equilibraron los geles de poliacrilamida a transferir y las membranas en solución de transferencia (0.025 M Tris base 0.2 M glicina y metanol 20% v/v en agua destilada) y se dispusieron en el *cassette* de transferencia junto a papeles de filtro y esponjas también embebidos en la misma solución (en el orden: ánodo/esponja/dos papeles de filtro/gel/membrana de PVDF/dos papeles de filtro/esponja/cátodo). Las transferencias se realizaron a 56 V constante, a 4°C, durante toda la noche.

3.5.5 Western blot

Finalizada la transferencia, las membranas se lavaron con PBS 0.05% v/v Tween-20 (solución de lavado) durante 5 minutos. Luego, se tiñeron con una solución de Rojo Ponceau al 0.2 % m/v (tinción reversible de proteínas) para verificar si la transferencia se realizó de manera exitosa. La tinción se eliminó con solución de lavado y las membranas se incubaron en solución de bloqueo [PBS 0.1% v/v Tween-20 0.2% m/v seroalbúmina bovina (BSA, del inglés

Bovine Serum Albumin]], durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Luego las membranas se incubaron con una dilución apropiada del primer anticuerpo, en PBS 0.1% v/v Tween-20 0.5% m/v BSA 0.1% m/v azida de sodio (solución de incubación), a 4°C durante toda la noche. Luego se realizaron 3 lavados de 10 minutos, con solución de lavado, y se incubó con una dilución apropiada del anticuerpo de detección (segundo anticuerpo) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) en solución de incubación sin azida de sodio, durante 2 horas a temperatura ambiente, con agitación. Luego de 3 lavados de 10 minutos, con solución de lavado, se reveló la presencia de las proteínas de interés utilizando un sustrato quimioluminiscente de HRP (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo #34080). Los *blots* se visualizaron en el transiluminador asociado al software Quantity One (versión 4.6.2) dentro del equipo Universal Hood II de Bio-Rad. Se realizó la cuantificación de la densidad de señal sobre área de las bandas obtenidas con el *software* ImageJ (versión 1.47). Los anticuerpos utilizados para *Western blot*, junto con las diluciones correspondientes, se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados para Western blot. En la tabla se especifican los blancos específicos de cada anticuerpo (primario y secundario), la dilución final utilizada para cada anticuerpo, el proveedor y número de catálogo de cada anticuerpo.

Blanco 1 ^{er} anticuerpo	Dilución	Proveedor, # de catálogo	Blanco 2 ^{do} anticuerpo	Dilución	Proveedor, # de catálogo
α -I κ B α	1/1000	Cell Signaling Technologies, #9242	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α - α -tubulina	1/250	Santa Cruz Biotechnology, #sc-8035	α -IgM, ratón	1/2000	Invitrogen, #M31507
α -P-p105 (Ser933)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #4806	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α -p105	1/1000	Cell Signaling Technologies, #3035	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α -P-Akt (Ser473)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #4060	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α -Akt	1/1000	Cell Signaling Technologies, #9272	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α -P-JNK/SAPK (Thr183/Tyr185)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #4668	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α - P-p38 (Thr180/Tyr182)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #4511	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α - P-ERK (Thr202/Tyr204)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #4370	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α -P-SGK (Ser422)	1/200	Santa Cruz Biotechnology, #sc-16745	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α -P-PTEN (Ser380)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #9551	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α - P-TBK1 (Ser172)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #5483	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α -P-IK κ (Ser172)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #8766	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α - β -actina	1/1000	Cell Signaling Technologies, #4967	α -IgG, conejo	1/2000	Calbiochem #401353
α - P-p70S6K (Ser371)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #9234	α -IgG, conejo	1/2000	Cell Signaling Technologies #7074p2
α -P-GSK-3 α / β (Ser21/Ser9)	1/1000	Cell Signaling Technologies, #8566	α -IgG, conejo	1/2000	Cell Signaling Technologies #7074p2
α -GSK-3 β	1/1000	Cell Signaling Technologies, #12456P	α -IgG, conejo	1/2000	Cell Signaling Technologies #7074p2

3.5.6 Citometría de flujo

Una vez finalizado el tiempo de incubación con los diferentes estímulos, se transfirieron las células a una placa de 96 pocillos de fondo en V, y se lavaron dos veces con 100 μ L por pocillo de PBS 0.1% m/v seroalbúmina bovina, 2 mM EDTA, pH 7.2 (solución FACS), centrifugando cada vez a 350 g durante 5 minutos a 4°C. Luego de cada centrifugación, se descartó el sobrenadante por inversión de la placa y se separaron las células por pasaje de la placa por un agitador tipo vórtice. Luego las células se incubaron con 25 μ L de solución FACS con 10% v/v de suero normal de rata, durante 25 minutos sobre hielo. Si bien este paso es un bloqueo general, también es necesario para bloquear los receptores Fc presentes en las células. Seguidamente, las células se incubaron con 25 μ L de una mezcla de anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para los antígenos de interés, diluidos en solución FACS como se especifica en la Tabla 3.3, durante 40 minutos, sobre hielo y protegidas de la luz. En paralelo se realizaron los marcados con los controles isotípicos (mismo isotipo, especie de origen y fluorocromo que los anticuerpos de interés, pero específicos para un antígeno irrelevante) y los marcados simples (incubación con un único anticuerpo, necesario para la compensación de colores en el citómetro). Finalmente, se realizaron 2 lavados con 150 μ L de la solución FACS por pocillo, centrifugando a 350 g durante 5 minutos, a 4°C. Las células se mantuvieron en 100 μ L por pocillo de solución de FACS sobre hielo hasta ser analizadas en el citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences).

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el *software* FlowJo versión 7.6.4. Para BMDCs, se analizaron eventos CD11C⁺/To-Pro3⁻, mientras que para Tio-Mac se analizaron eventos F4/80⁺/CD11b⁺/To-Pro3⁻. En la figura 7.2 (Anexo 1) se muestra la estrategia de *gating* utilizada para la selección de células Tio-Mac.

Tabla 3.3. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo. En la tabla se especifican los antígenos específicos a detectar, el fluorocromo, la dilución final de trabajo, la marca y número de catálogo de cada anticuerpo utilizado.

Antígeno	Fluorocromo	Dilución final	Proveedor, # de catálogo
CD11c	PE/Cy7	1/200	BioLegend #117318
CD40	FITC	1/100	BD Biosciences #553801
CD86	PE	1/100	eBioscience #12-0862-85
CD11b	PerCP-Cy5.5	1/200	BD Biosciences #550993
F4/80	PE-Cy7	1/200	eBioscience # 25-4801-82

3.5.7 Determinación de la viabilidad por To-Pro3

To-Pro3 (Invitrogen #T3605) es una sonda incapaz de penetrar la membrana celular que fluoresce al unirse a ADN de doble cadena. To-Pro3 marca células cuya integridad de membrana se encuentra comprometida, como es el caso de las células muertas. Antes de medir en el citómetro, se incubaron las células con 24 nM To-Pro3 en solución FACS durante 5 minutos. Las células positivas se consideran células muertas. En la Tabla 7.1 (Anexo 1) se muestra el % de BMDCs vivas para las diferentes condiciones utilizadas en esta Tesis.

3.5.8 Cuantificación de citoquinas por ELISA

Para la cuantificación de citoquinas en los sobrenadante de cultivo se empleó ELISA (del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay), utilizándose los siguientes *kits* comerciales (BD Biosciences): IL-10 (#555252), IL-12/23p40 (#555165), IL-12p70 (#555256), IL-1 β (#559603), IL-6 (#555240), y TNF- α (#555268). Se utilizaron placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp (Thermo, #442404). En forma general, siguiendo las instrucciones del proveedor, se sensibilizó la placa con 50 μ L de una dilución apropiada del anticuerpo de captura en la solución tampón correspondiente, durante toda la noche a 4°C. Luego, se lavó y bloqueó con 150 μ L de una solución de bloqueo PBS 10% v/v SFB durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó la solución de bloqueo y se incubó con 50 μ L de la muestra o de la dilución seriada del estándar. Luego, se lavó e incubó con 50 μ L de una dilución apropiada del anticuerpo de detección conjugado a biotina en el la solución tampón correspondiente, y posteriormente con 50 μ L de una dilución apropiada de estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa. Los lavados se realizaron con una solución PBS 0.05% v/v Tween-20. Finalmente, se reveló agregando 100 μ L de una solución de tetrametilbencidina (TMB, Applichem #A3840), H₂O₂ 0.01 % v/v en una solución de tampón citrato-fosfato 0.5 M, pH5. El desarrollo de color se detuvo por agregado de 50 μ L de H₂SO₄ 1M. Se midió la absorbancia a 450 nm. Las concentraciones de las citoquinas presentes en los sobrenadantes se obtuvieron mediante la utilización de una curva estándar de concentración conocida realizada en cada placa.

3.5.9 Cuantificación de nitritos. Ensayo de Griess

Este ensayo mide la presencia de nitritos en la muestra mediante la formación de un compuesto coloreado. El nitrito es el producto de oxidación estable del óxido nítrico (NO), de cuya producción por las células es entonces indicador. El ensayo se basa en la reacción entre nitrito y ácido sulfanílico en condiciones ácidas, con el acople del ion diazonio resultante a α -naftilamina para dar un producto coloreado. Se preparó el reactivo de Griess (1.45 mL H₃PO₄ al 85% v/v, 0.25 g sulfanilamida, 0.025 naftileno en 25 mL total) y una solución de nitrito para utilizar como estándar. Se mezclaron volúmenes iguales del reactivo de Griess con la muestra o estándar en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La placa se mantuvo en oscuridad durante 5 minutos y luego se midió la absorbancia a 540 nm.

3.5.10 Medidas de la tasa de consumo de O₂ y de la velocidad de acidificación extracelular

Se determinó el consumo de O₂ (OCR, del inglés oxygen consumption rate) y la velocidad de acidificación extracelular (ECAR, del inglés extracellular acidification rate) empleando el equipo *Seahorse XF-24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse)* en colaboración con la Dra. Celia Quijano (Universidad de la República, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y CEINBIO).

Previo al ensayo se incubaron los cartuchos para la medida de la velocidad ECAR y OCR con 1 mL de solución de calibración *Seahorse* a 37°C en una estufa sin CO₂ y se dejó encendido el equipo durante toda la noche.

Se sembraron 2x10⁵ BMDCs en 100 μ L de medio de incubación (ver sección 3.4.1) en placas XF-24. Luego se centrifugó a 300 g durante 1 minuto para generar una monocapa de células rápidamente, y luego se agregaron, según corresponda, 10 μ g/pocillo de pLL, con o sin de 10 ng/ml de LPS, en un volumen final de 200 μ L. Se incubaron las BMDCs durante 2, 18 o 22 horas. Luego se lavaron las células 2 veces con 1 mL de medio de incubación sin NaHCO₃ ni HEPES, termosatizado a 37°C, que es un medio no tamponado, que se utiliza para las medidas de pH en el equipo, que le llamaremos “medio *Seahorse*”. Finalmente se agregaron 600 μ L de medio *Seahorse* y se incubaron las células 1 hora a 37°C en un incubador sin CO₂. Luego se realizaron las medidas de ECAR y OCR en el equipo.

Para las medidas de ECAR se establecieron 3 ciclos de 3 minutos de mezcla, 2 minutos de espera y 3 minutos de medida. Además, se utilizó oxamato, inhibidor de la lactato deshidrogenasa, para determinar la contribución de la glucólisis a las medidas de ECAR.

Para el estudio de la función mitocondrial empleando medidas de OCR, se establecieron 4 inyecciones con inhibidores/desacoplantes de la fosforilación oxidativa y sus respectivos ciclos de medida (Tabla 4). Primero se realizaron 4 ciclos de 3 minutos de mezcla, 2 minutos de espera y 3 minutos de medida, para medir el consumo de oxígeno en cada una de las condiciones iniciales. Luego se programó una inyección de oligomicina (Sigma-Aldrich), concentración final 1 μM , seguida de 3 ciclos de 3 minutos de mezcla, 2 minutos de espera y 3 minutos de medida. Luego se programaron 2 inyecciones de FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona, Sigma-Aldrich) concentración final 2 μM , seguidas de 3 ciclos de 3 minutos de mezcla, 2 minutos de espera y 3 minutos de medida cada una. Finalmente, se programó una inyección de antimicina A y rotenona (Sigma-Aldrich), ambas a una concentración final de 1 μM , seguida de 3 ciclos de 3 minutos de mezcla, 2 minutos de espera y 3 minutos de medida. Las 4 soluciones a inyectar fueron preparadas en 75 μL cada una, con las concentraciones según el orden de inyección del inhibidor/desacoplante de la fosforilación oxidativa de 9X, 10X, 11X y 12X, respectivamente. La primera inyección, de oligomicina (inhibidor de la síntesis de ATP por el bloqueo del canal de protones de la porción F_0 de la ATP sintasa), permite analizar el porcentaje de consumo de O_2 por la síntesis de ATP del consumo total de O_2 en la célula. La segunda inyección, de FCCP (ionóforo de protones), desacopla el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial. Este colapso del potencial de membrana mitocondrial permite analizar la máxima capacidad de consumo de oxígeno por la mitocondria. La tercera inyección, la rotenona y la antimicina A (inhibidores del Complejo I y III de la fosforilación oxidativa, respectivamente), inhibe la respiración mitocondrial y permite analizar la contribución del OCR mitocondrial y no mitocondrial (Figura 3.1) (216).

Tabla 3.4. Inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa. Se indican los inhibidores con sus respectivos blancos y el proveedor. Esta combinación de inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa permite evaluar las diferentes etapas de la respiración mitocondrial (212).

Nombre	Blanco	Proveedor
Oligomicina	Bloquea el canal de protones de la porción F_0 de la ATP Sintasa (Complejo V)	Sigma-Aldrich
FCCP	Es un ionóforo que transporta protones a través de la membrana mitocondrial (agente desacoplante).	Sigma-Aldrich
Antimicina A	Inhibidor del complejo III de la fosforilación oxidativa	Sigma-Aldrich
Rotenona	Inhibidor del complejo I de la fosforilación oxidativa	Sigma-Aldrich

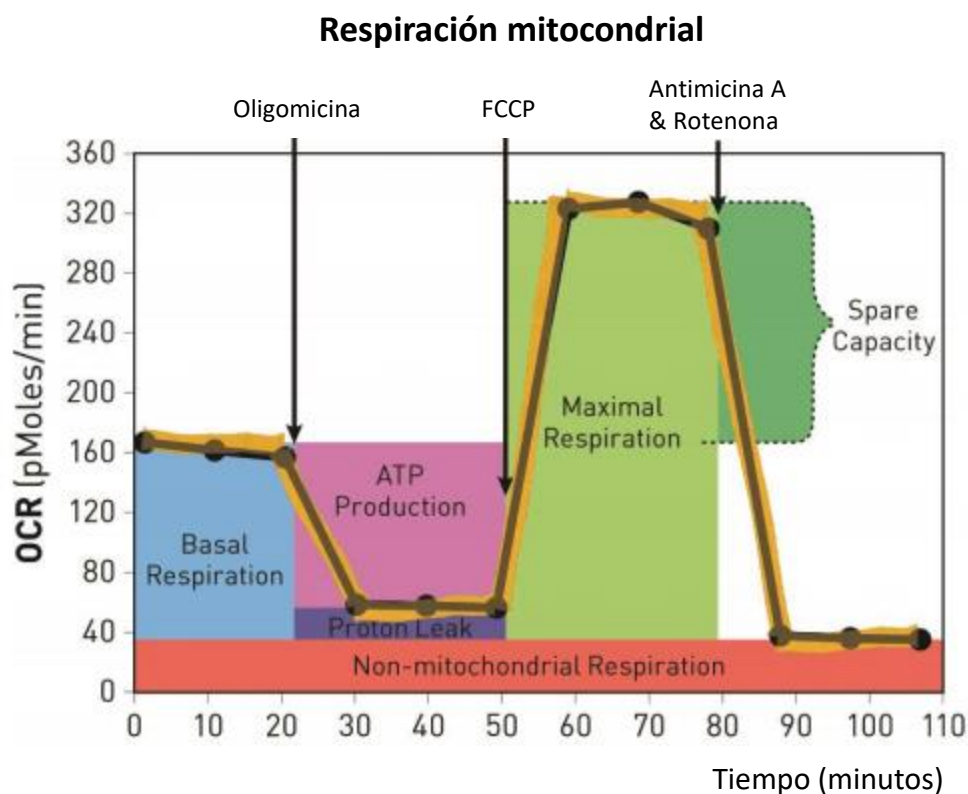


Figura 3.1. Esquema de los parámetros de respiración mitocondrial cuantificables por medidas de consumo de oxígeno (OCR) utilizando inhibidores y un desacoplante de la fosforilación oxidativa. La inyección secuencial de los compuestos indicados permite medir la respiración basal (*Basal Respiration*), producción de ATP (*ATP Production*), fuga de protones (*Proton Leak*), respiración máxima (*Maximal Respiration*), capacidad respiratoria de reserva (*Spare Respiratory capacity*), y respiración no mitocondrial (*Non-mitochondrial Respiration*) (278).

3.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el *software* GraphPad Prism versión 6. Primero se verificó que las varianzas de los grupos analizados (correspondientes en todos los casos a pocillos repetidos, de diferentes condiciones dentro de un experimento), no fueran estadísticamente diferentes entre sí, utilizando el test Brown-Forsythe. En ninguno de los casos analizados con el test Brown-Forsythe surgieron diferencias significativas entre las varianzas, si bien con el número de tres repeticiones usualmente hecho la fuerza del test no es muy alta. Se compararon medias por el test ANOVA de una vía, con post test de Tukey. Los niveles de significancia según este test se indican en cada figura. Normalmente se hicieron tres experimentos independientes para cada tipo de ensayo, y se verificó que las significancias estadísticas de los resultados importantes se repitieran en los tres experimentos. No se intentó integrar los experimentos independientes a nivel de estadística.

4 Resultados

4.1 Exploración de si la actividad de pLL sobre BMDCs está presente en otras presentaciones físicas de la CL

La estructura parasitaria en estudio, denominada CL, es un gel acuoso insoluble muy difícil de manejar. En esta sección se probarán diferentes presentaciones físicas de materiales derivados de esta estructura, seleccionándose la presentación a utilizar para el resto del trabajo. Se apuntará a materiales solubles o en forma de suspensión de partículas microscópicas, por la facilidad de manejo experimental. La evaluación consistirá en determinar la capacidad de los materiales de inducir el sesgo fenotípico en BMDCs observado previamente por la Dra. Casaravilla empleando una suspensión de partículas obtenidas por deshidratación, seguida por trituración y filtrado (pLL). Este sesgo fenotípico incluye potenciación de IL-10, inhibición de IL-12/23p40 y de CD40 en presencia de LPS, e inducción de CD86 *per se* o su potenciación en presencia de LPS (103).

La generación de materiales particulados finos a partir de la CL requiere un paso de deshidratación inicial, que hace más eficiente la trituración mediante fuerza mecánica. En el caso del material estudiado antes de esta Tesis, ese paso de deshidratación se realizaba mediante tratamiento con etanol y acetona (103). Esto da lugar a algunas preguntas a considerar: ¿El material es capaz de conservar su actividad luego de ser deshidratado de diferentes formas?, ¿La deshidratación del material, por disolventes orgánicos en particular, introduce algún artefacto que sea el causante de la actividad observada?, ¿Existe alguna diferencia entre particulados de diferente tamaño?, ¿La actividad de pLL es intrínseca a cualquier material particulado?, ¿El material soluble, sometido a una fuerte sonicación, conserva su actividad? Esta primera sección trata de contestar estas preguntas.

Primero se consideraron diferentes métodos de deshidratación, es decir se comparó el método por alcohol/acetona con la liofilización. En la Figura 4.1a y 4.1b se muestran microscopías de fluorescencia de los materiales generados, marcados con PNA conjugado a FITC. Se observa que el particulado generado por liofilización presenta una serie de estriaciones que no se observan en el material generado por alcohol/acetona. Además, el material producido por el método de liofilización tiene un tamaño de partícula en general

mayor. Hasta el momento solamente se había probado la actividad del material producido utilizando el método de deshidratación con alcohol/acetona, por lo que se probó la actividad en paralelo de esta preparación y la obtenida luego de liofilización. Se observa (Figura 4.1c) que tanto pLL generado mediante liofilización como por deshidratación mediante alcohol/acetona potencian de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-10 en presencia de LPS. Además, ambos materiales inhiben de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-12/23p40 en presencia de LPS. Asimismo, ambos materiales inhiben de manera estadísticamente significativa la expresión de CD40 inducida por LPS. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de ambos materiales sobre IL-10, IL-12/23p40 o CD40. Para CD86, ambos materiales aumentaron la expresión de esta molécula coestimuladora tanto en ausencia como en presencia de LPS. Sin embargo, el material producido por deshidratación mediante alcohol/acetona indujo un aumento significativamente mayor de la expresión de CD86 en presencia de LPS que el material producido por liofilización. Cabe mencionar que en las réplicas de experimentos independientes se observa una tendencia, para los cuatro parámetros estudiados, a que el material generado mediante deshidratación por alcohol/acetona tenga mayor actividad, lo cual se puede deber a que mediante este método de deshidratación se generan particulados más finos, favoreciéndose la relación superficie/masa.

En suma, ambos métodos de deshidratación produjeron materiales con actividad similar sobre BMDCs. Se seleccionó para el resto del trabajo el método de deshidratación por liofilización, ya que no implica desnaturalización de las proteínas convencionales (no mucinas) presentes en el material.

El hecho que las preparaciones de pLL no induzcan las citoquinas en estudio en ausencia de LPS (Figura 4.1 y datos previos del grupo), se utilizó a lo largo del trabajo para controlar que los sucesivos lotes de materiales no contengan cantidades significativas de endotoxinas. Además, en cada experimento se evaluó la sobrevivencia de las BMDCs mediante la utilización del reactivo TO-PRO®-3. En la Tabla 7.1 (Anexo 1) se presenta el porcentaje de viabilidad de BMDCs bajo los diferentes estímulos utilizados (materiales particulados, inhibidores, agonistas, etc.), demostrando que a las concentraciones utilizadas dichos estímulos no presentan citotoxicidad significativa.

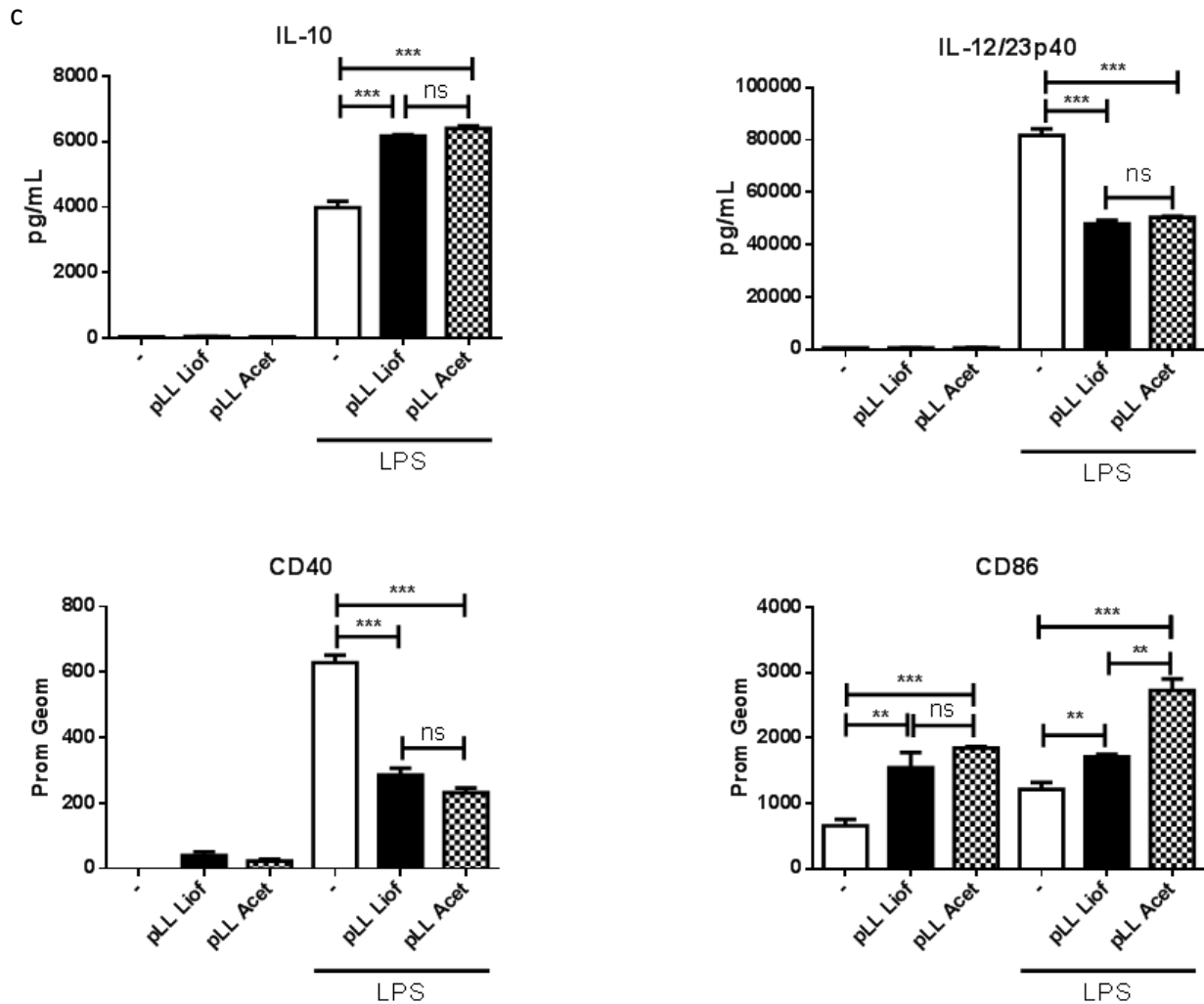
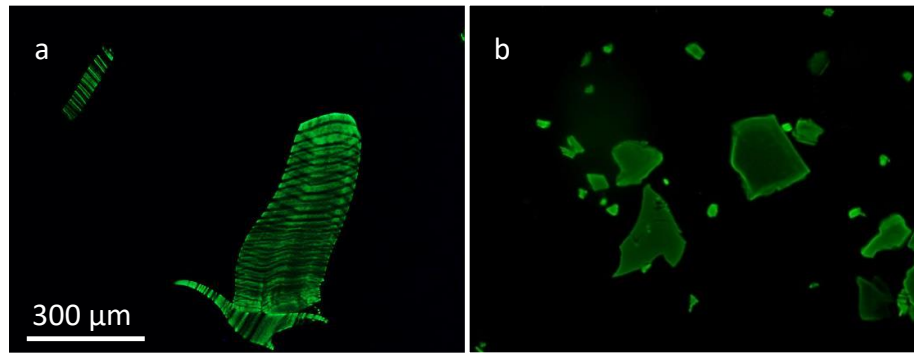


Figura 4.1. La actividad de pLL no depende de los métodos de deshidratación utilizados para su generación. Imágenes de microscopía de fluorescencia de pLL producidos por diferentes métodos de deshidratación: liofilización (a) o alcohol/acetona (b), marcados con PNA conjugada a FITC para su mejor visualización. c- Se utilizó para condicionar BMDCs materiales generados mediante deshidratación por liofilización (pLL Liof) o alcohol/acetona (pLL Acet). Se estimularon BMDCs con 10 μ g de cada material en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación, por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados para la cuantificación de citoquinas y duplicados para la expresión de marcadores de superficie. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo). Prom geom, promedio geométrico.

Una vez seleccionado el método de deshidratación del material, se analizó si la actividad del mismo dependía del tamaño de partícula. Para esto se generaron dos preparaciones: una constituida por partículas que quedaron retenidas por un filtro de 80 μm ($\text{pLL} > 80 \mu\text{m}$) y otra que se pasó por un filtro de 23 μm ($\text{pLL} < 23 \mu\text{m}$). En la Figura 4.2a y 4.2b se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de los materiales generados, marcados con PNA-FITC, donde se observa la diferencia de tamaño entre ambos particulados. La comparación de la actividad de ambas preparaciones se realizó sólo en términos de efectos sobre las citoquinas IL-10 e IL-12/23p40. Los resultados (Figura 4.2c) muestran que ambos materiales potencian de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-10 e inhiben de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-12/23p40, en presencia de LPS. Sin embargo, la potenciación de IL-10 generada fue significativamente mayor en el caso del material enriquecido en partículas pequeñas. Si bien la diferencia en la inhibición de IL-12/23p40 no es significativa, se observa una tendencia hacia mayor actividad a menor tamaño. Además, en la misma dirección que estos resultados, el pLL generado mediante deshidratación con alcohol/acetona presenta una tendencia a tener mayor actividad (y parece tener un menor tamaño de partícula) que el pLL generado mediante liofilización, como ya se mencionó. Por último, y como se mostrará más adelante, los materiales particulados macroscópicos de la CL presentan muy baja o nula actividad sobre DC. De aquí en más se continuará trabajando con materiales filtrados por 23 μm .

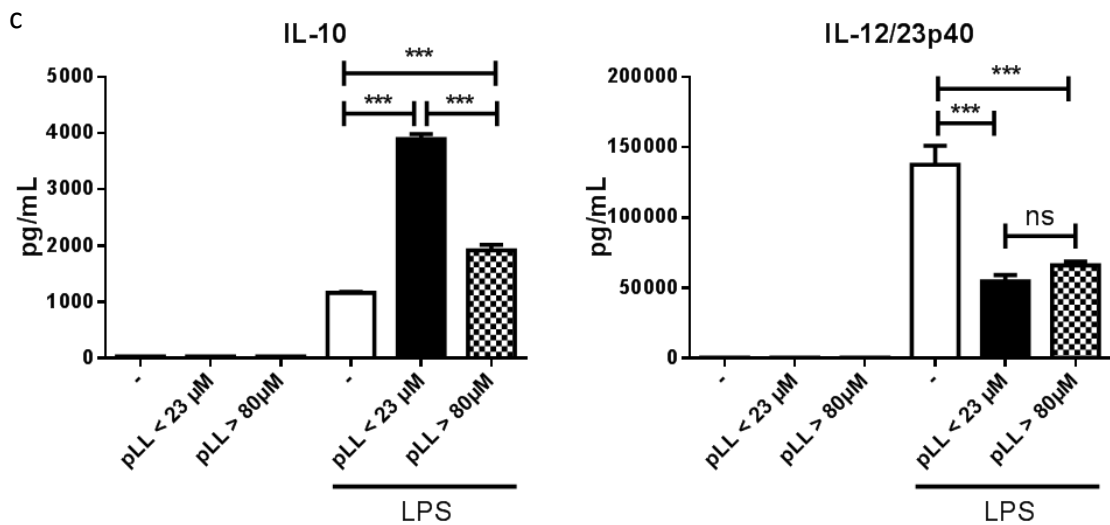
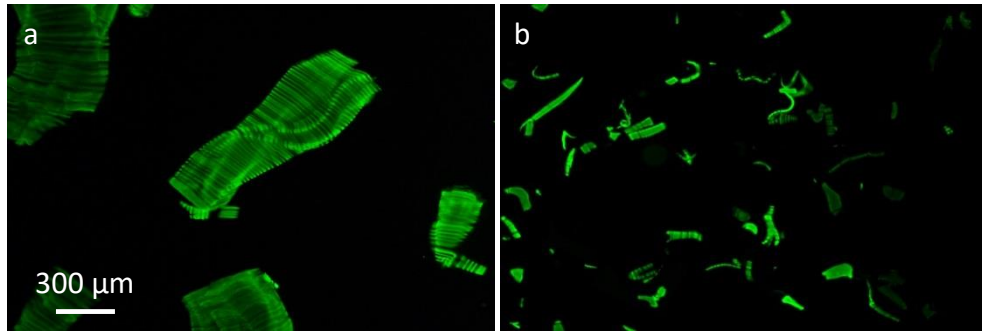


Figura 4.2. La actividad de pLL depende del tamaño de partícula. (a y b)- Imágenes por microscopía de fluorescencia de CL procesada de igual manera que pLL pero retenida por un filtro de 80 µm (a), y pLL (b, material filtrado por el filtro de 23 µm), marcados con PNA conjugada a FITC. c- Se utilizaron para condicionar BMDCs material retenido por un filtro de 80 µm (pLL > 80µm), y material filtrado por el filtro de 23 µm (pLL < 23µm). Se estimularon BMDCs con 10 µg de cada material en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación, por ELISA. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, P < 0.001; **, P < 0.01; * P < 0.05; ns, no significativo).

Posteriormente se verificó que el proceso de deshidratación en sí no generara ningún artefacto del cual se desprendiera la actividad de nuestro material. Para esto se trabajó con un material sin deshidratar, homogeneizado en suspensión mediante el equipo llamado “*Tissue-Ruptor*” (T-R), diseñado para homogeneizar tejidos. Como este proceso da lugar a una suspensión de partículas macroscópicas, para poder generar un particulado lo suficientemente fino para ser filtrado, se sometió al material a una leve sonicación. En las Figuras 4.3a-d se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de los materiales generados, marcados con PNA-FITC. Se observa que los materiales triturados únicamente por T-R se componen de partículas con un tamaño muy superior al del resto de los materiales. Además, se observa que el paso de sonicación disminuye de manera importante el tamaño de las partículas en la suspensión, y el filtrado permite separar de la suspensión a las partículas grandes remanentes.

Se analizó la actividad sobre la producción de las citoquinas IL-10 y IL-12/23p40 de los siguientes materiales: CL homogenizada con T-R (material macroscópico, CL T-R); CL homogenizada con T-R, sonicada y filtrada por 23 μm (CL T-R/S/F); CL homogenizada con T-R, sonicada, filtrada por 23 μm , deshidratada, rehidratada y nuevamente filtrada por 23 μm (CL T-R/S/F/D/H/F). Como punto de comparación se incluyó a pLL. Los resultados (Figura 4.3e) muestran que el material CL T-R, macroscópico, presenta muy poca actividad. Específicamente, muestra una tendencia a potenciar IL-10 y una pequeña inhibición significativa de la expresión de IL-12/23p40, ambas en presencia de LPS. Esto está de acuerdo con lo anteriormente mencionado en cuanto a la relación entre el tamaño de partícula y la actividad. Por otra parte, los materiales CL T-R/S/F y CL T-R/S/F/D/H/F (los cuales se diferencian entre sí únicamente por un paso de deshidratación y rehidratación) sí potencian de manera estadísticamente significativa la producción de IL-10, así como inhiben de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-12/23p40 en presencia de LPS. Si bien el material CL T-R/S/F/D/H/F posee menor capacidad que el material CL T-R/S/F de potenciar la IL-10 en presencia de LPS, es posible afirmar que ambos materiales poseen una actividad similar. Por otra parte, se evaluó la actividad sobre la expresión de CD40 y CD86 del material CL T-R/S/F: como punto de comparación se incluyó pLL. Los resultados (Figura 4.3e) muestran que el material sin deshidratar CL T-R/S/F inhibe significativamente la expresión de CD40 inducida por LPS, y presenta una tendencia a inducir la expresión de

CD86 *per se*. De estos resultados se concluye que la actividad sobre células dendríticas observada en pLL es independiente del paso de deshidratación que sufre el material.

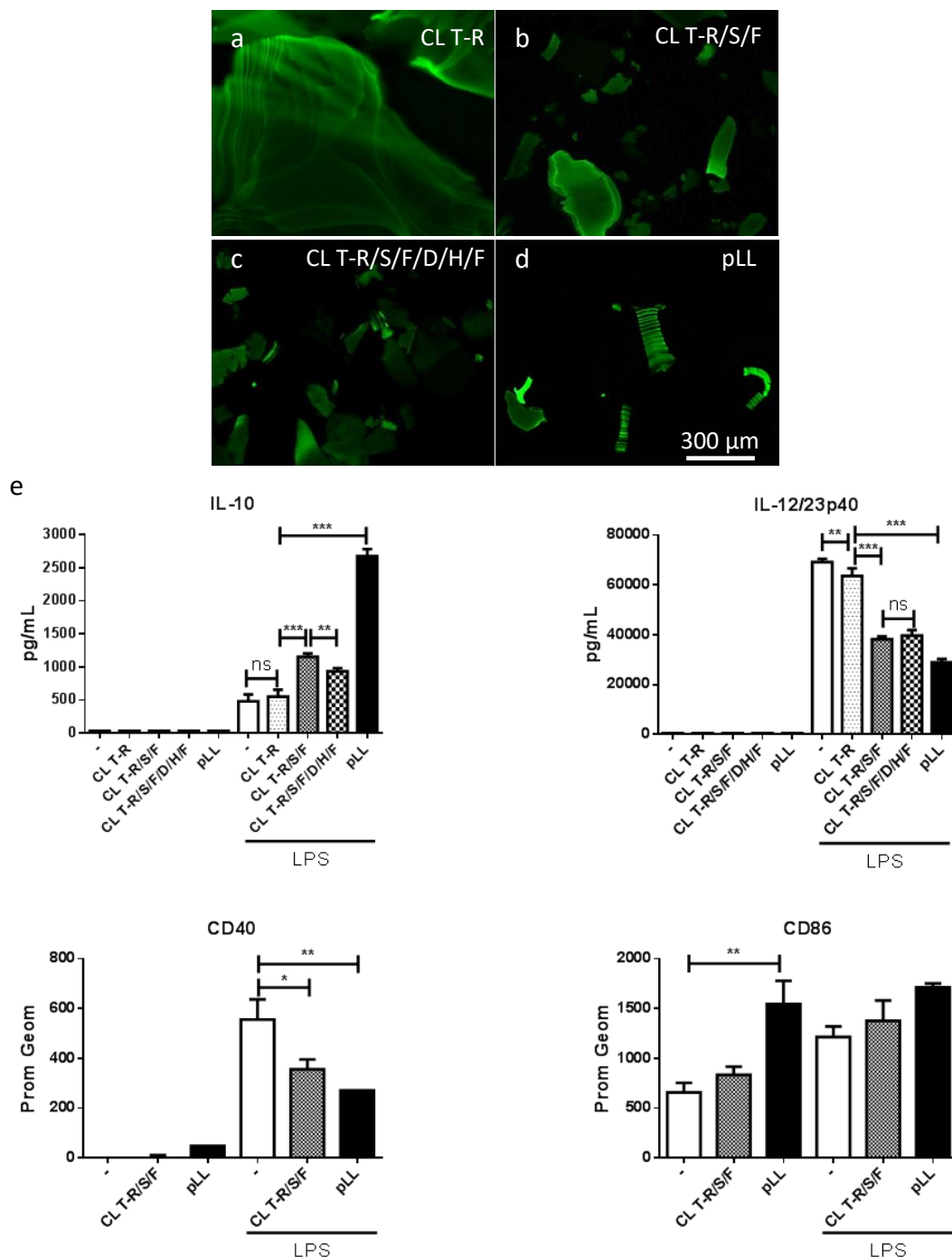


Figura 4.3. La CL presenta actividad independientemente de su deshidratación. (a-d)- Imágenes por microscopía de fluorescencia de CL sin deshidratar, homogeneizada con el T-R (CL T-R); material homogeneizado con el T-R, sonicado y filtrado por 23 μ m (CL T-R/S/F); material homogeneizado con T-R, sonicado, filtrado por 23 μ m, deshidratado, rehidratado y nuevamente filtrado por 23 μ m (CL T-R/S/F/D/H/F) y pLL, marcados con PNA conjugada a FITC. e- Se utilizaron para condicionar BMDCs diferentes materiales: CL T-R, CL T-R/S/F, CL T-R/S/F/D/H/F y pLL. Se incubaron BMDCs con 10 μ g de cada material por pocillo en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo).

Por otra parte, se verificó que la actividad observada en pLL no fuera una propiedad presente en cualquier particulado. Para esto se trabajó con materiales particulados de diferentes tamaños, fagocitables (partículas de látex (Lx) de poliestireno de 0.8 μm de diámetro con BSA adsorbido a su superficie; "Lx BSA") y no fagocitables (Sephadex® G-100; "G100"). Los resultados (Figura 4.4) muestran que los materiales particulados control, Lx BSA y G100, no presentan actividad significativa sobre la expresión de IL-10 o IL-12/23p40 sobre BMDCs *per se*, o en presencia de LPS. Tampoco se observó inducción de la expresión de CD40 o CD86 por Lx BSA ni G100 como únicos estímulos. Sin embargo, de manera similar a pLL, el material G100 sí potenció de manera significativa la expresión de CD86 en presencia de LPS. Además, contrariamente a pLL, en lugar de inhibir, potencia también la expresión de CD40 en presencia de LPS. Estos resultados muestran que las actividades observadas en pLL sobre BMDCs en su conjunto no están presentes en materiales particulados en general.

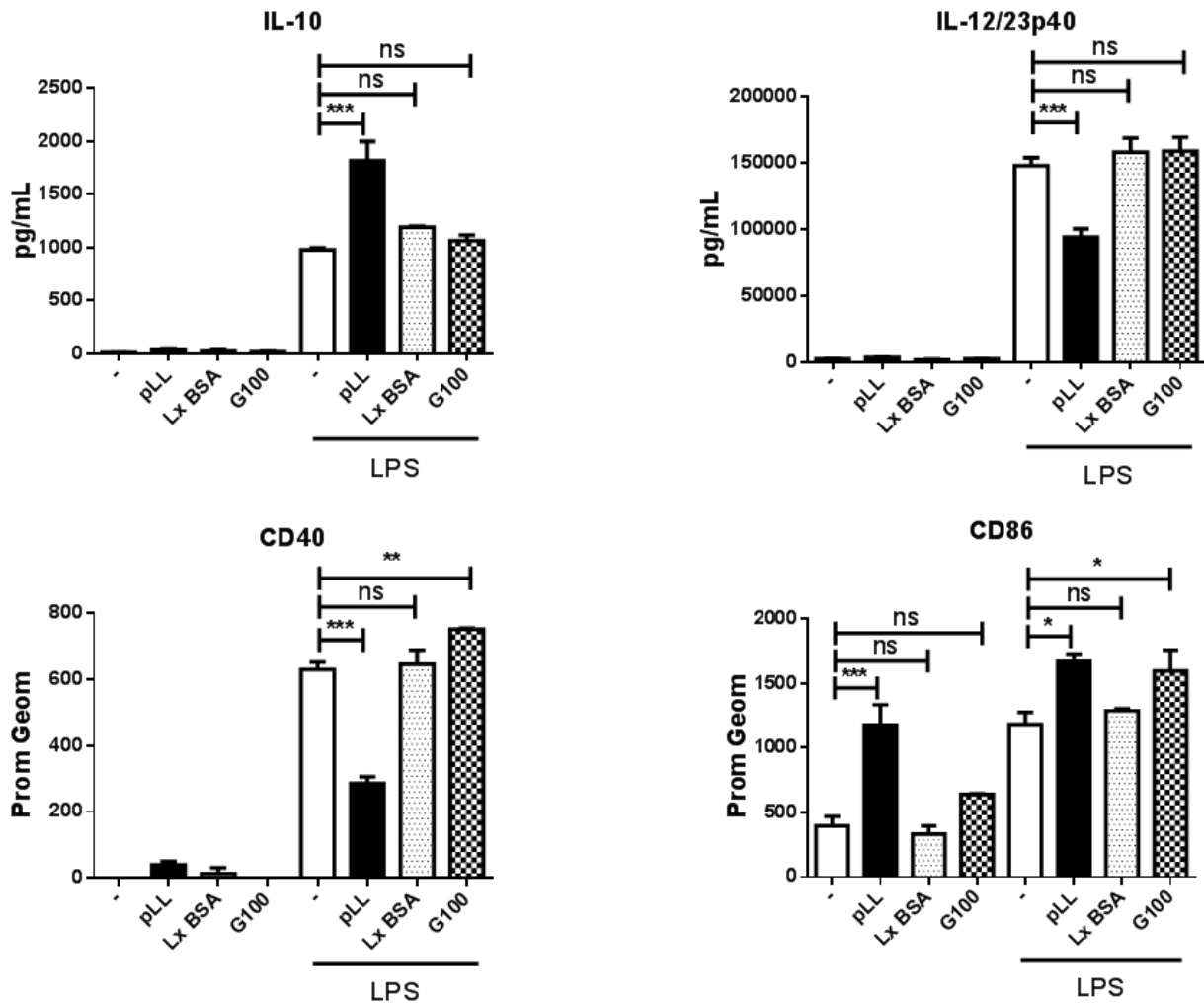


Figura 4.4. La actividad de pLL no es intrínseca de materiales particulados en general. Se utilizaron para condicionar BMDCs diferentes materiales: pLL, un látex de 0.8 μm adsorbido con BSA (Lx BSA) y Sephadex G100 (G100). Se estimularon BMDCs con 10 μg de pLL y 30 μg de los otros particulados por pocillo, en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados para la cuantificación de citoquinas, y duplicados para la expresión de los marcadores de superficie. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativo).

Finalmente, se evaluó la actividad de una preparación “soluble” de la CL (sLL), generada mediante sonicación fuerte. Se escribe “soluble” porque la preparación fue sometida a centrifugación convencional, pero no fue sometida a ultracentrifugación, por lo que es concebible que contenga partículas de tamaño coloidal. Nuevamente se utilizó como control positivo a pLL. Además, se analizó si la preparación “soluble” era capaz de competir con la actividad de pLL sobre BMDCs. Los resultados (Figura 4.5a) muestran que las actividades de la CL sobre la producción de citoquinas se afectan en diferente grado al ser sometidas al paso de sonicación. En efecto, el material sLL no potencia IL-10 en presencia de LPS, pero en cambio inhibe IL-12/23p40 al mismo nivel que pLL. Además, los resultados muestran que la actividad de pLL sobre IL-10 e IL-12/23p40 no se ve afectada por la presencia de sLL, sugiriendo que no existe competencia entre ambos materiales por receptores específicos. Una de las posibles causas de que el material “soluble” no tenga capacidad de potenciar IL-10 es que al ser solubilizado pierda una presentación polivalente de motivos moleculares hipotéticos presentes en el particulado. Para evaluar esto, se procedió a adsorber el material “soluble” a una placa de cultivo donde luego se estimularían BMDCs, permitiendo de esta manera la presentación polivalente posiblemente perdida al sonicar. Los resultados (Figura 4.5b) muestran que el sLL es capaz de adherirse a la placa de cultivo de forma dependiente de la concentración y saturable en el entorno de los 200 µg/mL. Luego se evaluó si BMDCs sembradas en placas de cultivo con sLL adsorbida presentaban cambios en los niveles de expresión de las citoquinas IL-10 e IL-12/23p40 respecto a BMDCs sembradas en placas control, tanto en ausencia como en presencia de LPS. Los resultados (Figura 4.5c) muestran que el sLL adherido a la placa no fue capaz condicionar BMDCs, *per se* o en presencia de LPS, en términos de las citoquinas presentes en los sobrenadantes.

Globalmente, los resultados de esta sección muestran que el conjunto de actividades descrito para pLL está presente en la CL pulverizada de diferentes maneras, y no está presente de la misma forma en cualquier material particulado. También muestran que al menos parte de las actividades se pierden al ser solubilizado el material, y que el material solubilizado no parece ser capaz de actuar como inhibidor competitivo del material insoluble.

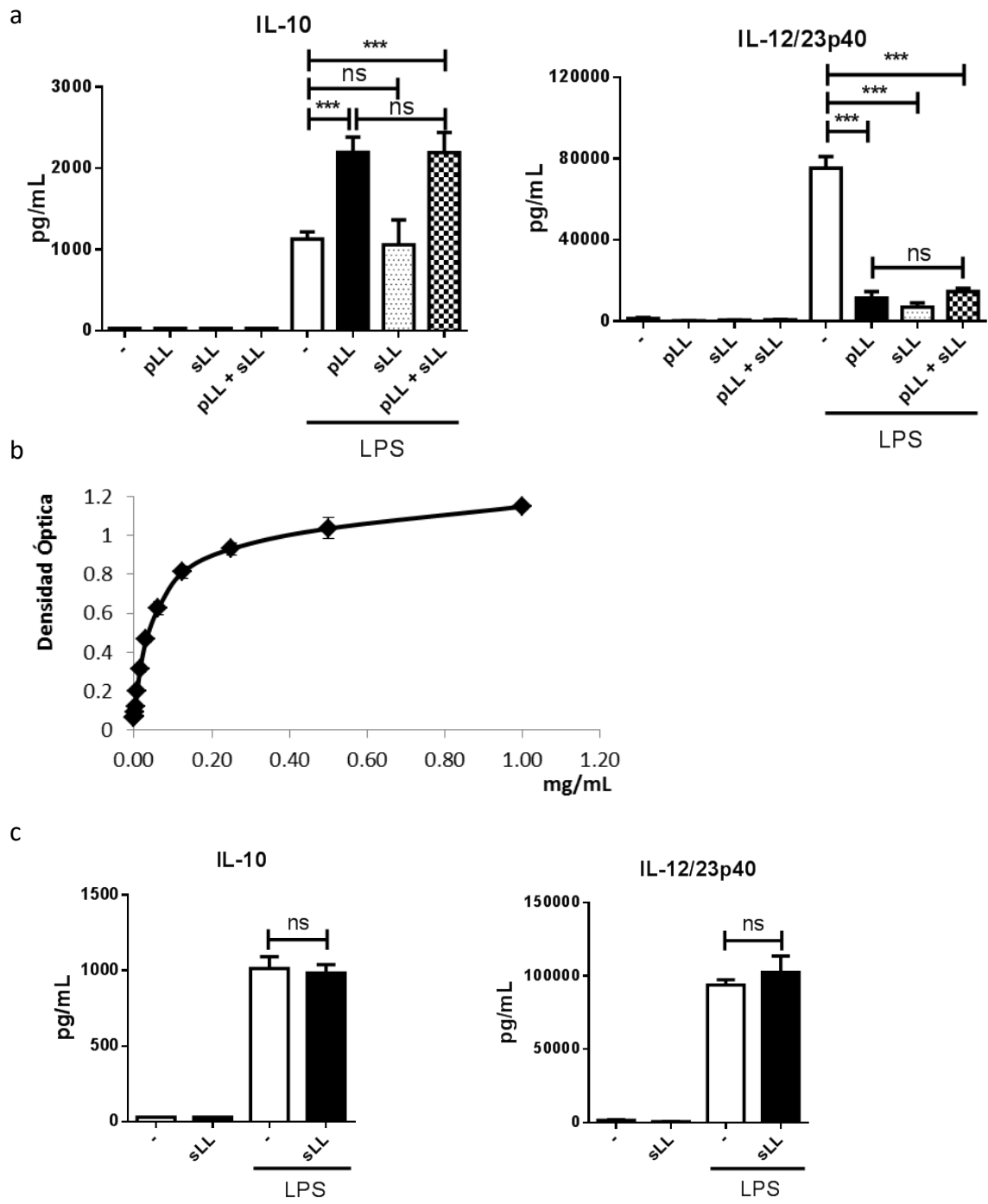


Figura 4.5. La "solubilización" de la CL causa la pérdida de la actividad sobre la IL-10 pero no sobre la IL-12 p40. Se utilizaron para condicionar BMDCs: pLL y material de la CL "soluble" generado por fuerte sonicación (sLL). a- Se estimularon BMDCs con 10 µg de pLL, sLL [100 µg/mL concentración final] o ambos, en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. b- Se sensibilizó una placa de cultivo con diferentes concentraciones de sLL durante 18 horas, se lavó exhaustivamente con PBS, y se evaluó la sLL adsorbida a la placa utilizando PNA conjugada a peroxidasa. c- Se sensibilizó durante 18 horas una placa de cultivo con 200 µg/mL de sLL, se lavó con PBS libre de endotoxinas y se estimularon BMDCs sobre la misma, en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 (a) o 2 (b y c) experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimental (***, P < 0.001; **, P < 0.01; * P < 0.05; ns, no significativo).

4.2 Identificación de proteínas del hospedero presentes en pLL, y evaluación de la contribución de las mismas a la actividad observada sobre BMDCs

La CL es la capa más externa del parásito, por lo que se encuentra en contacto directo con proteínas del hospedero, ya sea presentes en el suero o secretadas por células circundantes. Los pasos iniciales para la preparación de pLL incluyen una serie de lavados con soluciones de alta fuerza iónica y de una solución de PBS conteniendo EDTA (ambas soluciones libres de endotoxinas), los cuales sirven para limpiar parte de las proteínas adsorbidas al material (103). A pesar de los lavados mencionados, pLL conserva proteínas del hospedero unidas fuertemente, es decir que la preparación se encuentra constituida tanto por moléculas de origen parasitario como del hospedero. En una primera instancia, se buscó identificar las proteínas mayoritarias de origen del hospedero presentes en pLL. Para ésto se incubó 1 mg de masa seca de pLL en una solución tampón de muestra de SDS-PAGE conteniendo DTT 20 mM, durante 1 hora a 37 grados. Como muestra la Figura 4.6a, las proteínas extraídas de esta manera dan lugar a un patrón de bandas bien definidas. Las bandas más abundantes se analizaron mediante espectrometría de masas (realizado por la unidad de Proteómica del Instituto Pasteur de Montevideo). Las principales bandas que se identificaron fueron cadenas de pesadas y livianas de IgG, y con menor abundancia proteínas del complejo terminal del complemento (C6, C7 y C9). Debido a que se conoce que las inmunoglobulinas pueden sesgar respuestas de DCs y macrófagos (217–219), se ensayaron diferentes métodos de extracción con el fin de producir un material libre de inmunoglobulinas. Estos procedimientos incluyeron el uso de un agente caotrópico (KCN a saturación) y agentes disociantes (cloruro de guanidinio 3M, 2M y 1M, urea 6M y tampón glicina 0.2M pH 2). Para el caso de las extracciones con KCN, cloruro de guanidinio y urea, se dializaron los extractos solubles obtenidos, para extraer las altas concentraciones de sales, seguido por concentración por precipitación con ácido tricloroacético, previo a su análisis por SDS-PAGE. Como muestran los resultados (Figura 4.6b y 4.6c), los lavados con urea, con tampón glicina 0.2 M pH2 y con cloruro de guanidinio fueron efectivos, lográndose una buena extracción de las proteínas del hospedero. El método de extracción de proteínas del hospedero elegido para trabajar de aquí en más (debido a no ser *a priori* disociante para la red mucínica) fue la solución tampón glicina 0.2 M pH2, durante 2 horas a 50°C, el cual fue capaz de extraer las inmunoglobulinas en un alto porcentaje. Cabe mencionar que este tratamiento no extrajo

de manera significativa los componentes terminales del complemento. Se probaron además lavados secuenciales en tampón glicina 0.2 M pH2, pero los resultados (Figura 4.6d) no mostraron diferencias apreciables respecto al procedimiento realizado en un solo paso.

Por otra parte se estudiaron las proteínas adsorbidas a pLL generado a partir de CL de origen de ratón. Lo anterior se realizó debido a que las CL de estas hidátides, macroscópicamente, se las observa más limpias (con menos contaminación de tejido del huésped). Como muestran los resultados (Figura 4.6e) el pLL de origen de ratón presenta menos bandas en SDS-PAGE y las principales de estas corresponden con los pesos moleculares de las cadenas livianas y pesada de inmunoglobulinas. En este material, el lavado con tampón glicina 0.2 M pH2, extrajo la mayor parte de las inmunoglobulinas. La presentación física del material, evaluada por microscopía de fluorescencia usando PNA-FITC, no fue alterada por el tratamiento (Figura 4.6f).

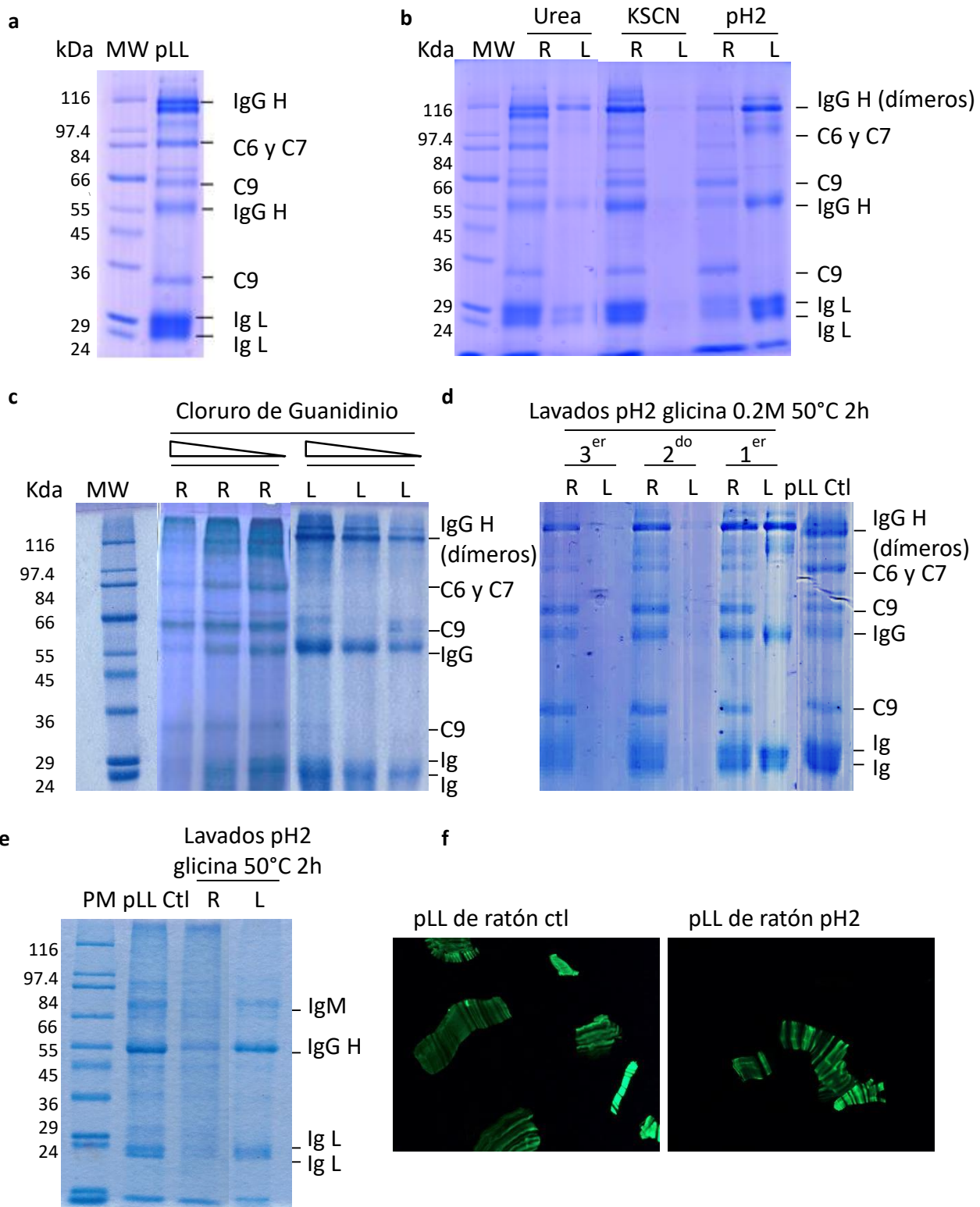


Figura 4.6. Identificación y extracción de proteínas del hospedero adsorbidas a pLL. a- Se incubó pLL con tampón muestra de electroforesis 1 hora a 37°C, se centrifugó y se analizó el sobrenadante (pLL Ctl) por SDS-PAGE. Se identificaron las proteínas correspondientes a cada banda mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF. b- Se lavó pLL con soluciones de urea 6M, KSCN a saturación y tampón glicina 0.2M pH2. Se analizaron los remanentes (R) de proteínas en pLL y los lavados (L) realizados. c- Se lavó pLL con 3 soluciones de cloruro de guanidinio (3M, 2M y 1M). Se analizaron los remanentes (R) y los lavados (L) correspondientes. d- Se realizaron 3 lavados secuenciales con tampón glicina 0.2M pH2 y se analizaron los remanentes (R) y los lavados (L) correspondientes; además se analizó pLL Ctl. e- Se lavó pLL (generado a partir de CL de hidátides de origen de ratón) con una solución tampón glicina 0.2M pH2 y se analizaron el remanente (R) y el lavado (L) correspondiente; además se analizó pLL Ctl (generado a partir de hidátides de origen de ratón). Todos los carriles están cargados con la cantidad de proteínas correspondiente a 1 mg de masa seca de pLL inicial. Los SDS-PAGE corresponden a 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras. f- Imágenes por microscopía de fluorescencia de pLL control (de origen de ratón, pLL de ratón Ctl) y pLL (de origen de ratón) incubado 2 horas a 50°C en tampón glicina 0.2M pH2, marcados con PNA conjugada a FITC.

Una vez determinada la presencia de proteínas del hospedero en pLL, y explorados métodos para extraerlas, se buscó determinar si éstas eran responsables de la actividad observada sobre BMDCs. En caso de que la actividad derivase de las proteínas adsorbidas, la misma debería variar según la especie del hospedero. Se exploró entonces en primer lugar si pLL producido a partir de la CL originada en dos especies diferentes difería en la actividad sobre BMDCs. Los resultados (Figura 4.7) muestran que tanto el pLL producido a partir de la CL de origen bovino (pLL bov) o de ratón (pLL ratón) potencian de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-10 en presencia de LPS. Además, ambos materiales inhiben de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-12/23p40 y CD40 inducidas por LPS. También, ambos materiales inducen de manera estadísticamente significativa la expresión de CD86, así como potencian la expresión de CD86 inducida por LPS. De esta manera, los resultados muestran que el pLL producido a partir de la CL originada en dos especies diferentes tiene similar actividad sobre BMDCs, lo que argumenta en contra de que la actividad provenga de las proteínas del hospedero.

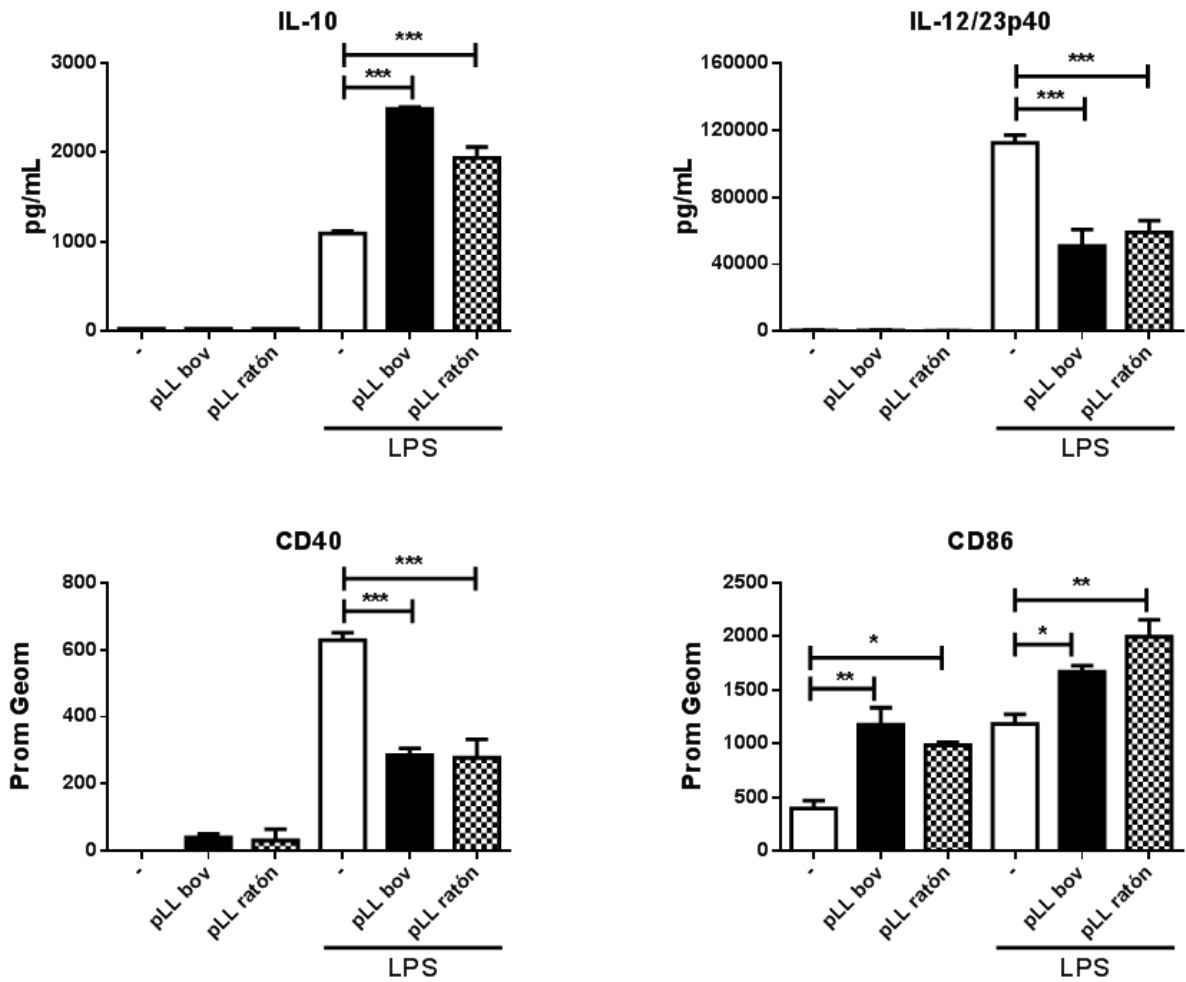


Figura 4.7. Actividad sobre BMDCs de pLL generado a partir de CL de origen bovino o ratón. Se utilizaron para condicionar BMDCs pLL generado a partir de CL de origen bovino (pLL bov) y pLL generado a partir de CL de origen de ratón (pLL ratón). Se estimularon BMDCs con 10 μ g de pLL bov y pLL ratón, en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados para la cuantificación de citoquinas y duplicados para los marcadores de superficie. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos independientes. Se muestra la estadística intraexperimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativo).

Debido a que se sabe que las IgG unidas a partículas pueden potenciar la producción de IL-10 por macrófagos estimulados con agonistas de TLRs (220), y modificar la maduración de DCs (221), se propuso evaluar específicamente si las Igs unidas a pLL están involucradas en la actividad del material sobre BMDCs. Como primera aproximación, se evaluó si partículas de poliestireno de 0.8 μm de diámetro adsorbido con IgG humana (Lx IgG) eran capaces de modificar la expresión de IL-10, IL-12/23p40, CD40 o CD86, tanto en ausencia como en presencia de LPS. Los resultados (Figura 4.8) muestran que el Lx IgG potencia de manera estadísticamente significativa la expresión de IL-10 en BMDCs estimuladas con LPS, obteniéndose un resultado similar en magnitud al obtenido con pLL. Además, el material Lx IgG inhibe de manera estadísticamente significativa, si bien leve, la expresión de IL-12/23p40 en BMDCs estimuladas con LPS. Además, el Lx IgG no induce *per se* la expresión de IL-12/23p40, lo cual es un indicio de que el material no contiene concentraciones significativas de endotoxinas. Para CD40, en dos experimentos se obtuvieron resultados de inhibición leve de la expresión inducida por LPS (Figura 4.8), y en otros dos, resultados en los que no existió inhibición (ver Figura 4.9). Además, Lx IgG indujo *per se* la expresión de CD40, aunque en niveles bajos. Para CD86, el Lx IgG indujo de manera estadísticamente significativa la expresión de la molécula *per se*, al igual que pLL, pero no potenció la expresión de CD86 en presencia de LPS. Es importante recordar que el material Lx BSA no presentó ninguna de estas actividades (Figura 4.4), lo cual indica que la actividad del material Lx IgG deriva de la presencia de las inmunoglobulinas. Entonces, las IgG adsorbidas en el material Lx IgG presentan la capacidad de potenciar la producción de IL-10 y de inhibir (levemente) la expresión de IL-12/23p40 y CD40 en presencia de LPS, así como de inducir la expresión de CD86 *per se*.

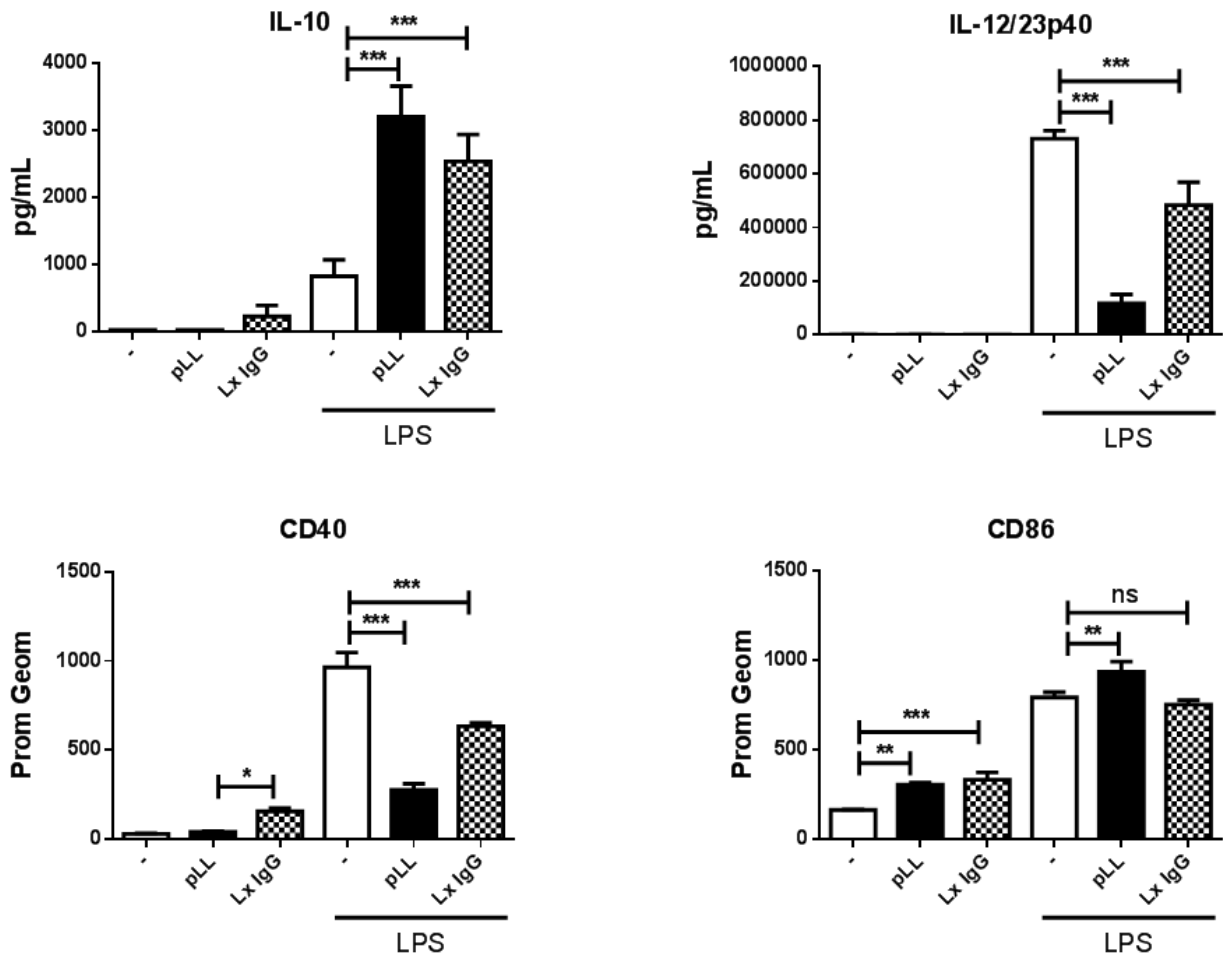


Figura 4.8. La actividad sobre BMDCs de un látex con IgG adsorbida es similar a la observada en pLL. Se utilizaron para condicionar BMDCs: pLL y un látex con IgG humana adsorbida (LX IgG). Se estimularon BMDCs con 10 μ g de pLL y 30 μ g de Lx IgG en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISAs. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos independientes, si bien el efecto sobre CD40 se observó sólo en 2 de los 4 experimentos. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

Debido a que varias de las actividades inmunoregulatoras observadas en pLL fueron imitadas por el material Lx IgG, se procedió a realizar un estudio más profundo para determinar si la actividad de pLL sobre las BMDCs deriva de las inmunoglobulinas asociadas. Para esto se utilizó un anticuerpo bloqueante de los receptores Fc γ RII y Fc γ RIII (CD16 y CD32) (α -Fc γ RII/III). Se preincubaron 30 minutos BMDCs con α -Fc γ RII/III o su control isotópico, y luego se las estimularon con pLL o Lx IgG en ausencia o presencia de LPS. Los resultados (Figura 4.9) muestran que el anticuerpo bloqueante inhibió de manera estadísticamente significativa la potenciación de IL-10 por Lx IgG en presencia de LPS, mientras que no fue capaz de revertir la potenciación de IL-10 causada por pLL. De manera similar, el anticuerpo bloqueante de Fc γ RII/III inhibió de manera significativa la inducción de CD86 por Lx IgG pero no fue capaz de inhibir la expresión de CD86 inducida por pLL. Para el caso de IL-12/23p40 no se observaron diferencias significativas entre las BMDCs preincubadas con el anticuerpo α -Fc γ RII/III y con su control isotópico, para Lx IgG ni para pLL. Por otra parte, para CD40, como ya se mencionó, en este experimento el Lx IgG no inhibió la inducción del marcador. En este parámetro, el anticuerpo α -Fc γ RII/III se comportó de forma difícil de explicar, disminuyendo la expresión del marcador en presencia de LPS solamente, o de LPS y Lx IgG, pero no de pLL y LPS. Globalmente, estos resultados sugieren que el grueso de la actividad de pLL no depende del reconocimiento a través de los receptores Fc γ RII/III. También sugieren que la actividad del Lx IgG sobre IL-10 y CD86 sí depende de reconocimiento por los receptores Fc γ RII/III. Adicionalmente sugieren, junto con los resultados para Lx-BSA (Figura 4.4) que la inhibición de IL-12/23p40 depende de las IgG pero no depende de los receptores Fc γ RII ni Fc γ RIII.

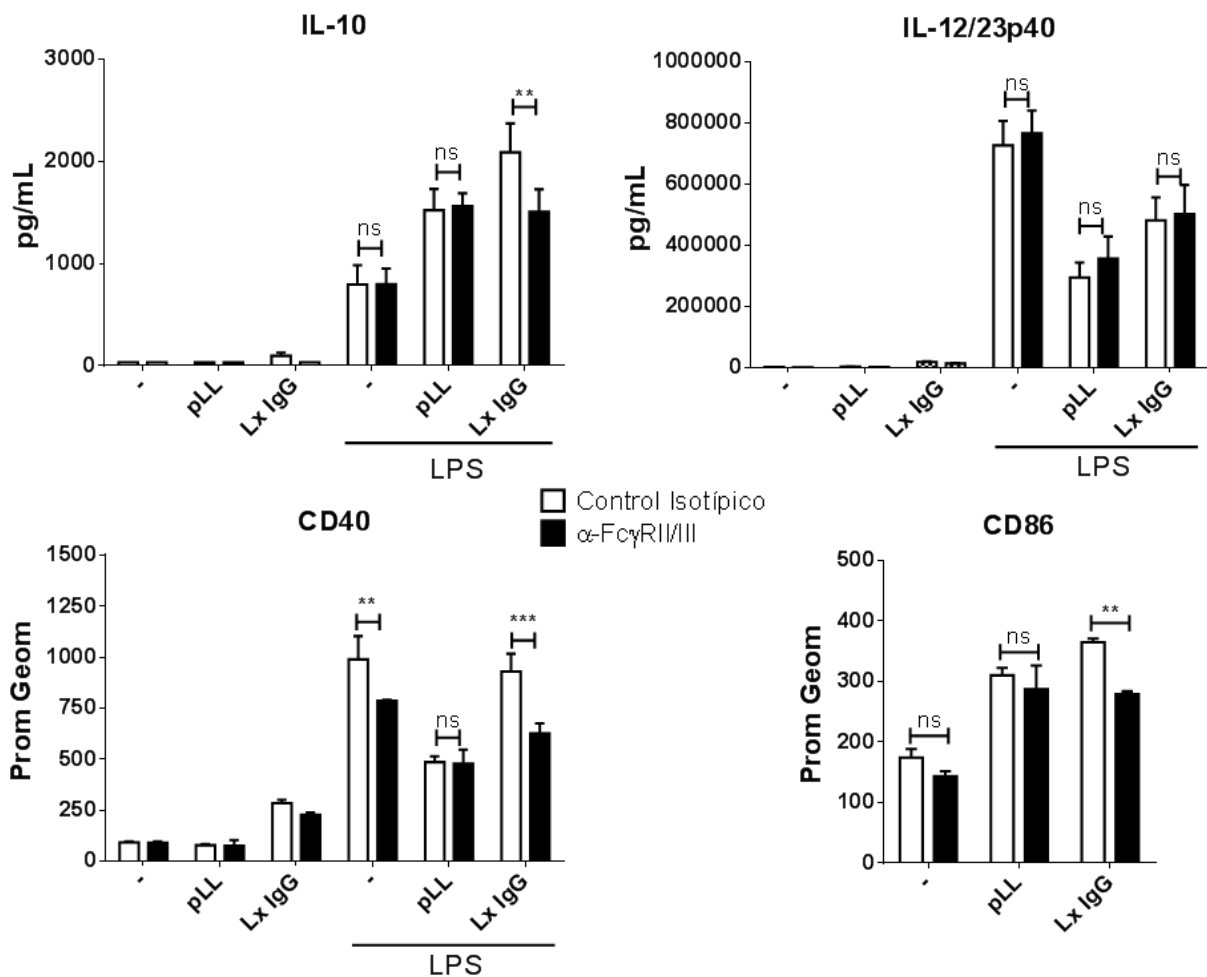


Figura 4.9. Efecto de un anticuerpo bloqueante de FcγRII/III sobre la actividad de pLL y Lx IgG en BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs durante 30 minutos con un anticuerpo bloqueante anti-FcγRII/III (α - FcγRII/III) en concentración 5 μ g/mL (barras negras) o su control isotípico (Ctl Iso) 5 μ g/mL (barras blancas). Luego se estimularon con 10 μ g de pLL o 30 μ g de Lx IgG, en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo).

Con el fin de comparar los mecanismos a nivel celular por los que actúan pLL y Lx IgG se evaluó la sensibilidad de sus actividades sobre BMDCs al inhibidor de la polimerización de actina, citocalasina D (Cyt D). Se preincubaron BMDCs 30 minutos con DMSO (vehículo) solamente o Cyt D y se estimularon las células con medio de incubación, pLL o Lx IgG en ausencia o presencia de LPS. Los resultados (Figura 4.10) muestran que la actividad de pLL para los cuatro parámetros observados es totalmente indetectable en presencia de Cyt D. Se debe señalar que la Cyt D cambia la respuesta de las células, en los parámetros observados, en la misma dirección que lo hace pLL, lo que no permite formalmente distinguir entre la posibilidad (más probable) que la actividad de pLL requiera del reordenamiento de los filamentos de actina, y la posibilidad que los efectos de pLL y Cyt D sean redundantes. Por otra parte, la actividad de Lx IgG sobre la expresión de IL-10 y CD86 fue claramente detectable en presencia del inhibidor, indicando que el efecto de Lx IgG sobre estos parámetros no requiere de la reorganización del citoesqueleto. En cambio, la actividad de Lx IgG sobre IL-12/23p40 no fue detectable en presencia del inhibidor Cyt D. En cuanto a CD40, se observa que en presencia de Cyt D, el Lx IgG aumenta la expresión del marcador en presencia de LPS, lo cual seguramente se debe a la suma de la inducción de CD40 por LPS y Lx IgG *per se* (siendo esta última no inhibible por Cyt D). De estos resultados se desprende que la actividad de los materiales pLL y Lx IgG presenta diferente sensibilidad al tratamiento con Cyt D, indicando que posiblemente involucre mecanismos diferentes.

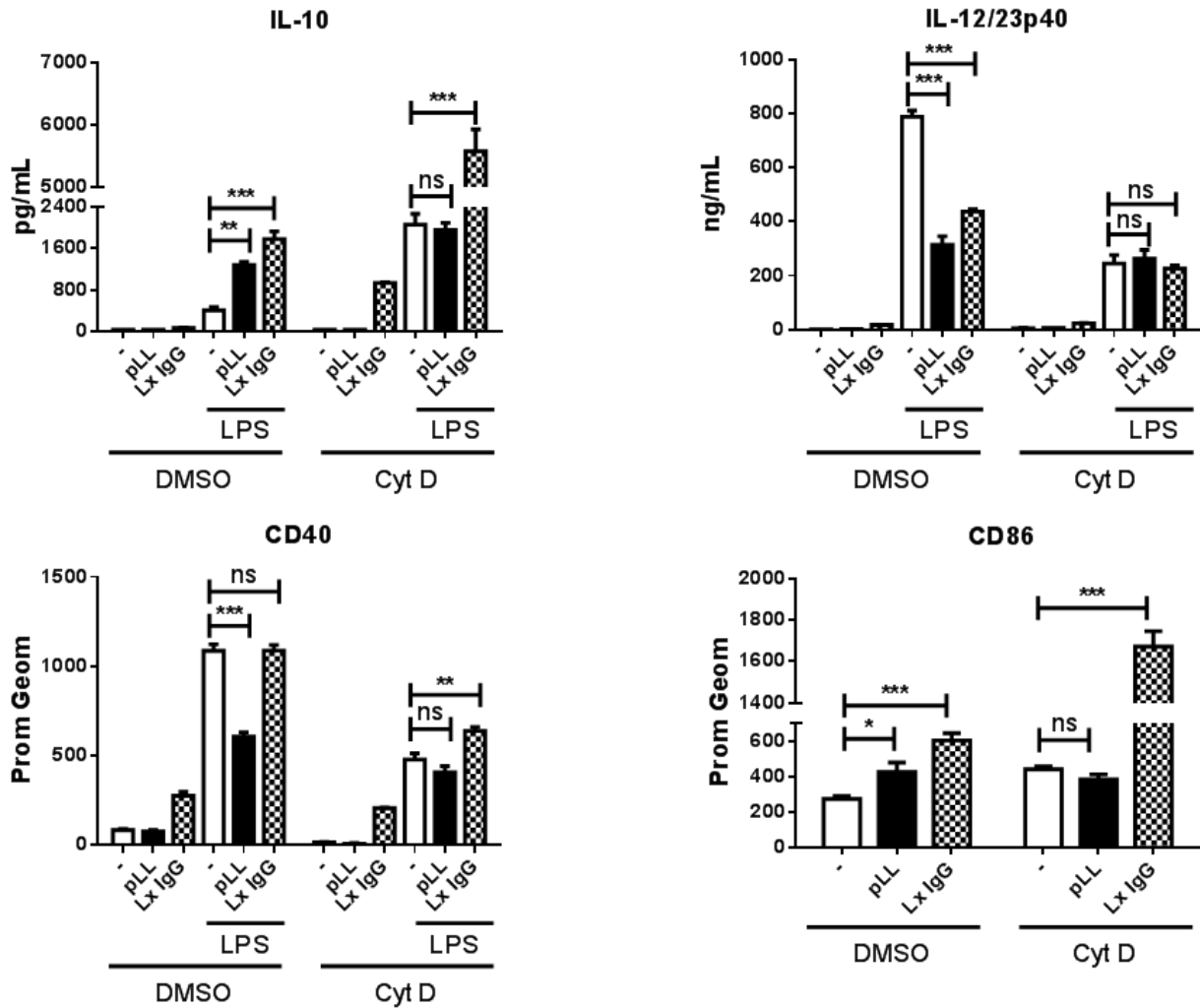


Figura 4.10. Efecto de la citocalasina D sobre la actividad de pLL y Lx IgG sobre BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs con Citocalasina D 5 μ M (Cyt D) y DMSO (vehículo) durante 30 minutos. Luego se estimularon con 10 μ g de pLL o 30 μ g de Lx IgG, en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo).

Por último, se aplicó, al análisis del mismo problema, el método de extracción (parcial) de inmunoglobulinas con tampón glicina 0.2 M pH 2 (Figura 4.6). Los resultados (Figura 4.11) muestran que el material tratado para extracción de inmunoglobulinas retuvo actividad en los cuatro parámetros analizados. La actividad en términos de IL-12/23p40, IL-10 y CD86 se debilitó levemente pero en forma estadísticamente significativa luego del tratamiento ácido en comparación con el tratamiento control, mientras que la actividad sobre CD40 no varió. Las diferencias en términos de IL-10, IL-12/23p40 y CD86 podrían explicarse por menor cantidad de inmunoglobulina en el material lavado, lo cual en conjunto con los resultados obtenidos con Lx IgG, sugiere que una pequeña parte de la actividad sobre estos parámetros podrían derivar de la presencia de inmunoglobulinas en el material.

Globalmente, los resultados de esta sección muestran que si bien pLL tiene Igs de hospedero adsorbidas y estas podrían contribuir marginalmente a algunas de las actividades observadas, el material es activo sobre BMDCs independientemente de la presencia de estas Igs.

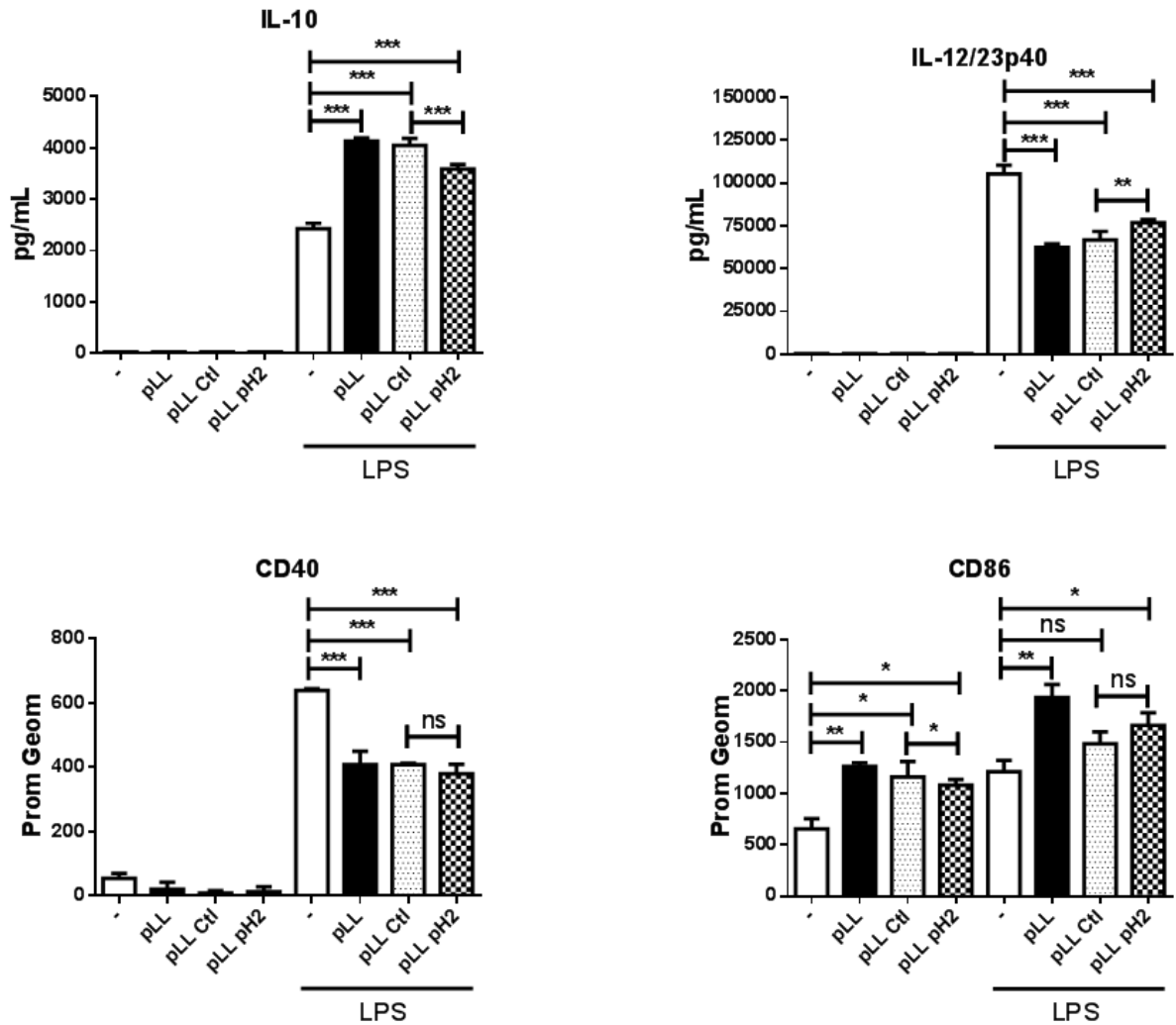


Figura 4.11. La actividad de pLL es independiente de la presencia de Ig adsorbidas al mismo. Se estimularon BMDCs con 10 µg de: pLL, pLL sometido a un tratamiento control consistente en lavado con tampón fosfato pH 7.2 a 50°C durante 2 horas (pLL Ctl), o pLL lavado con tampón glicina 0.2M pH2 a 50°C durante 2 horas (pLL pH2), en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. El pLL utilizado en este experimento es generado a partir de hidátides de ratón. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo).

4.3 Evaluación de la contribución de los componentes glucídicos y proteicos a la actividad de pLL sobre BMDCs

La CL está compuesta principalmente por mucinas y gránulos compuestos por una sal cálcica de myo-inositol hexakisfosfato cálcico (InsP₆). Los lavados realizados a la CL con EDTA, paso necesario para generar el material que llamamos pLL, eliminan los gránulos de la sal cálcica de InsP₆ (15, 16). De esta manera, pLL es un material enriquecido en mucinas parasitarias, con algunas proteínas del hospedero unidas, principalmente inmunoglobulinas, que en la sección anterior se descartaron como componentes activos principales. Las mucinas, en tanto glicoproteínas, tienen un componente proteico y uno glucídico. En esta sección se evaluará la contribución de estos dos componentes de las mucinas a la actividad de pLL sobre BMDCs.

Para evaluar si la actividad de pLL deriva de su componente glucídico, se le realizó un tratamiento de oxidación de sus azúcares. Específicamente, se trató a pLL con periodato (IO₄⁻) de sodio (agente oxidante, selectivo para dioles vecinales, tales como se encuentran en la mayoría de los monosacáridos), seguido por una reacción de reducción de los aldehídos formados a alcoholes con borohidruro (BH₄⁻) de sodio (agente reductor). Al material generado anteriormente se lo denominó pLL BH₄⁻/IO₄⁻. Además, se preparó un material control, al cual únicamente se lo sometió a un tratamiento con borohidruro de sodio, y al que se lo denominó pLL BH₄⁻. Se verificó la efectividad del tratamiento con BH₄⁻/IO₄⁻ mediante dos técnicas diferentes, ambas basadas en el reconocimiento de azúcares en pLL por la lectina PNA. En el formato *dot-blot*, usando pLL solubilizado mediante sonicación (Figura 4.12a), se observó que mientras la lectina fue capaz de reconocer los materiales pLL y pLL BH₄⁻, no fue capaz de reconocer el material pLL BH₄⁻/IO₄⁻. Por microscopía de fluorescencia, usando PNA-FITC, se observó también (Figura 4.12b) que tanto el material pLL como pLL BH₄⁻ fueron marcados, mientras que el material pLL BH₄⁻/IO₄⁻ no fue reconocido por PNA-FITC. Por otra parte, mediante microscopía de campo claro, se verificó que el particulado pLL BH₄⁻/IO₄⁻ presenta la misma presentación física que los materiales pLL y pLL BH₄⁻.

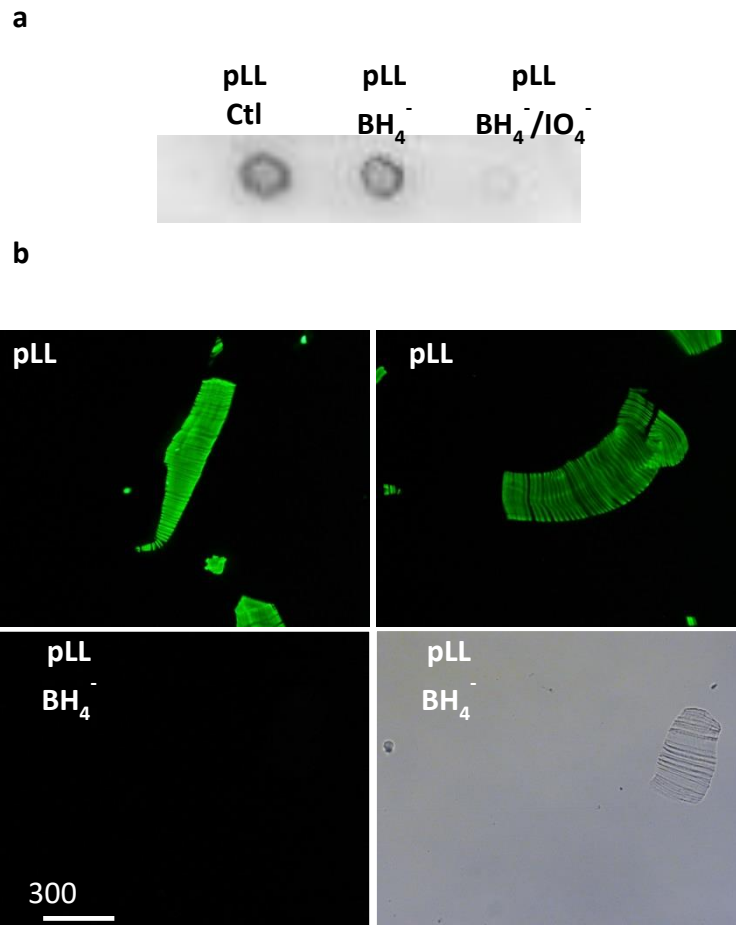


Figura 4.12. El tratamiento de pLL con IO₄⁻/BH₄⁻ anula el reconocimiento por PNA. a- Dot blot de pLL sin tratar (pLL Ctl), pLL tratado con BH₄⁻ (pLL BH₄⁻) y pLL tratado con IO₄⁻/BH₄⁻ (pLL IO₄⁻/BH₄⁻), todos solubilizados por sonicación, enfrentados a la lectina PNA conjugada a biotina, usando revelado con streptavidina conjugada a peroxidasa y el reactivo cromogénico diaminobenzidina (DAB). b- Imágenes por microscopía de fluorescencia de pLL Ctl, pLL BH₄⁻ y pLL IO₄⁻/BH₄⁻, marcados con la lectina PNA conjugada a FITC. Para la imagen de pLL IO₄⁻/BH₄⁻ además se muestra una captura en campo claro de la misma imagen, que muestra la presencia de partículas de pLL en el cuadrante seleccionado.

Una vez validada la oxidación de los azúcares presentes en pLL y sus tratamientos control, se enfrentaron los materiales a BMDCs en ausencia y presencia de LPS, y se observó si los tratamientos generaban cambios en la actividad. Los resultados (Figura 4.13) muestran que el material pLL $\text{BH}_4^-/\text{IO}_4^-$ no presenta ninguna diferencia significativa respecto al control pLL BH_4^- , ni en la potenciación de IL-10 ni en la inhibición de IL-12/23p40 inducidas por LPS. Para el caso de las moléculas coestimuladoras, ninguno de los materiales presentó diferencias significativas, ni en la inhibición de la expresión de CD40 inducida por LPS, ni en la inducción *per se* de CD86. De estos resultados se desprende que el sesgo fenotípico inducido por pLL en BMDCs no requiere a los glúcidos presentes en las mucinas.

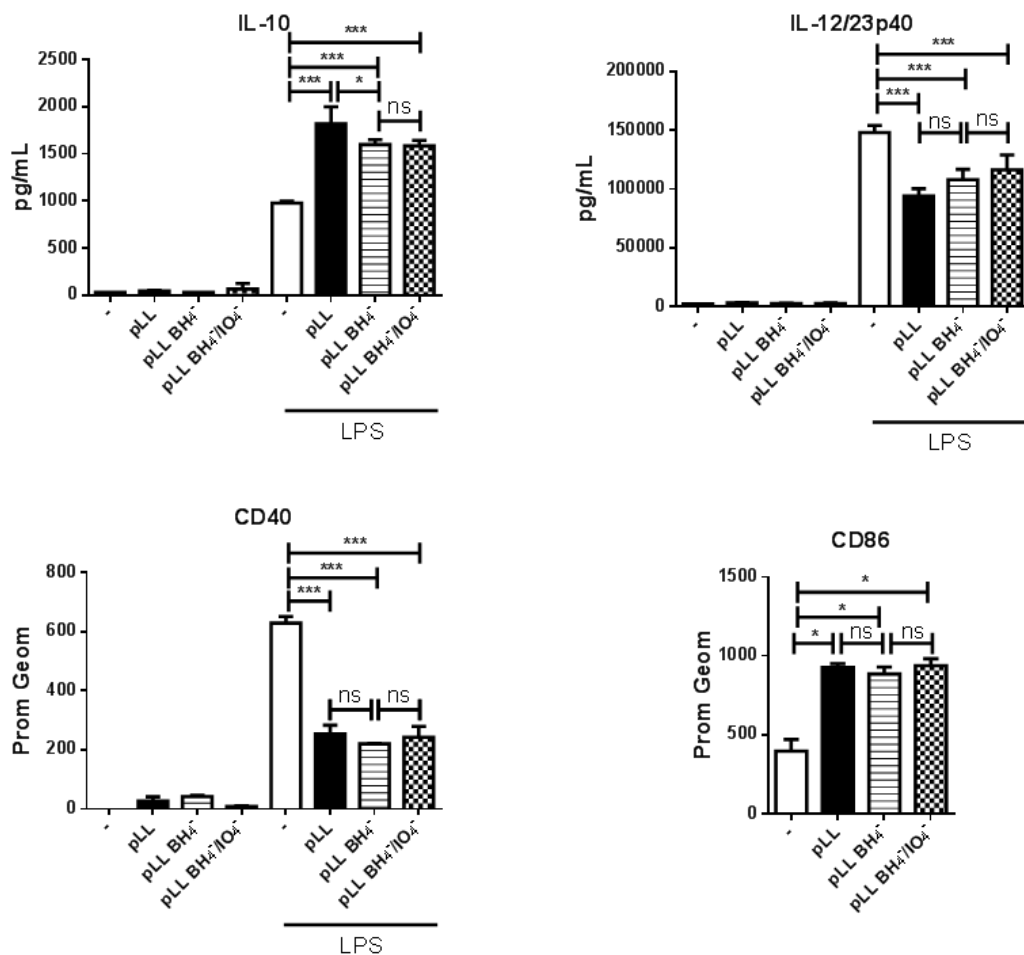


Figura 4.13. Evaluación del papel del componente glucídico de pLL en la actividad sobre BMDCs. Se utilizaron para estimular BMDCs: pLL, pLL tratado con BH_4^- (pLL BH_4^-) y pLL tratado con $\text{IO}_4^-/\text{BH}_4^-$ (pLL $\text{IO}_4^-/\text{BH}_4^-$). Se estimularon BMDCs con 10 μg de cada material en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados para la cuantificación de citoquinas, y duplicados para la evaluación de la expresión de los marcadores de superficie. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimentos (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativo).

Luego se evaluó la contribución del componente proteico a la actividad de pLL. A este respecto, si bien la mayor parte del esqueleto proteico se encuentra decorado por estructuras glucídicas, los extremos N-terminales no se encuentran glicosilados, según datos provenientes del transcriptoma (ver Figura 1.5).

Se trató al material con pronasa (preparación proteolítica de amplio espectro), a este material se lo llamo pLL Pro. Primero se procedió a determinar si dicho tratamiento alteraba la presentación física del material. Para esto se marcó a pLL y pLL Pro con la lectina PNA-FITC. Como muestran los resultados (Figura 4.14a), el tratamiento con pronasa no alteró la presentación física del material. Como se explicó en la Introducción, no es posible analizar por electroforesis el posible efecto de los tratamientos proteolíticos sobre las mucinas de la CL. De todos modos, se estudió qué ocurría con las proteínas del hospedero adsorbidas a pLL. Para esto se extrajeron con tampón de muestra las proteínas no mucínicas de los materiales pLL y pLL Pro, y se las analizó por SDS-PAGE. Como muestran los resultados (Figura 4.14b), todas las proteínas convencionales presentes en pLL sufrieron proteólisis completa con el tratamiento con pronasa. Este resultado permitió verificar la efectividad del tratamiento con pronasa, al menos con respecto a proteínas convencionales (no mucinas) presentes en la preparación. Por otra parte, debido a la muy alta glicosilación predicha en las mucinas de la CL, es muy probable que la actividad de la pronasa sea eficiente únicamente sobre los extremos N-terminales no glicosilados de las apomucinas. Sin embargo, ni el SDS-PAGE ni la electroforesis en agarosa permiten verificar la posible digestión parcial de las apomucinas de la CL (26). En suma, el material pLL Pro mantiene la misma presentación física que pLL, se encuentra totalmente libre de proteínas del hospedero, y potencialmente presenta algún grado de proteólisis de sus apomucinas. Finalmente, se estimularon BMDCs con pLL y pLL-Pro en ausencia y presencia de LPS y se midió la producción de IL-10 y IL-12/23p40. Los resultados (Figura 4.14c) muestran que el tratamiento con pronasa disminuye de manera estadísticamente significativa la potenciación de IL-10 inducida por pLL en presencia de LPS. También se observó una disminución en la inhibición de la producción de IL-12/23p40 en presencia de LPS; este resultado se observó en todas las repeticiones a nivel de tendencia, pero fue estadísticamente significativo sólo en 2 de las 4 repeticiones.

Además, se realizó un ensayo de prueba donde se trató a pLL con diferentes proteasas: endoproteasa GluC (proteasa de serina que cliva específicamente enlaces peptídicos C-terminales a residuos de ácido glutámico; a este material se lo denominó pLL GluC), tripsina (proteasa de serina que cliva específicamente enlaces peptídicos C-terminales a residuos de arginina y lisina; a este material se lo denominó pLL Trip) y pronasa (proteasa de amplio espectro; a este material se lo denominó pLL Pro). Esta selección de proteasas se realizó considerando como posibles blancos las diferentes secuencias de los extremos N-terminales de las distintas apomucinas predichas que conforman la CL (ver Figura 1.5). Los tratamientos de pLL con las endoproteasa GluC y tripsina no produjeron ningún cambio significativo en la actividad de pLL sobre las citoquinas (Figura 7.3, Anexo 1). Sin embargo, el tratamiento con pronasa sí dio lugar a una pérdida significativa de actividad de potenciación de IL-10 y una leve pérdida (no significativa) de la inhibición de IL-12/23p40, en ambos casos respecto al pLL control.

Estos resultados por un lado confirman la conclusión de la sección anterior de que pLL posee actividad sobre BMDCs que es independiente de las Igs del hospedero que contiene. Por otro lado, son compatibles con la posibilidad de una cierta contribución de dichas Igs a la actividad global observada, sin probar dicha contribución, ya que la pronasa también podría eliminar componentes activos de las mucinas.

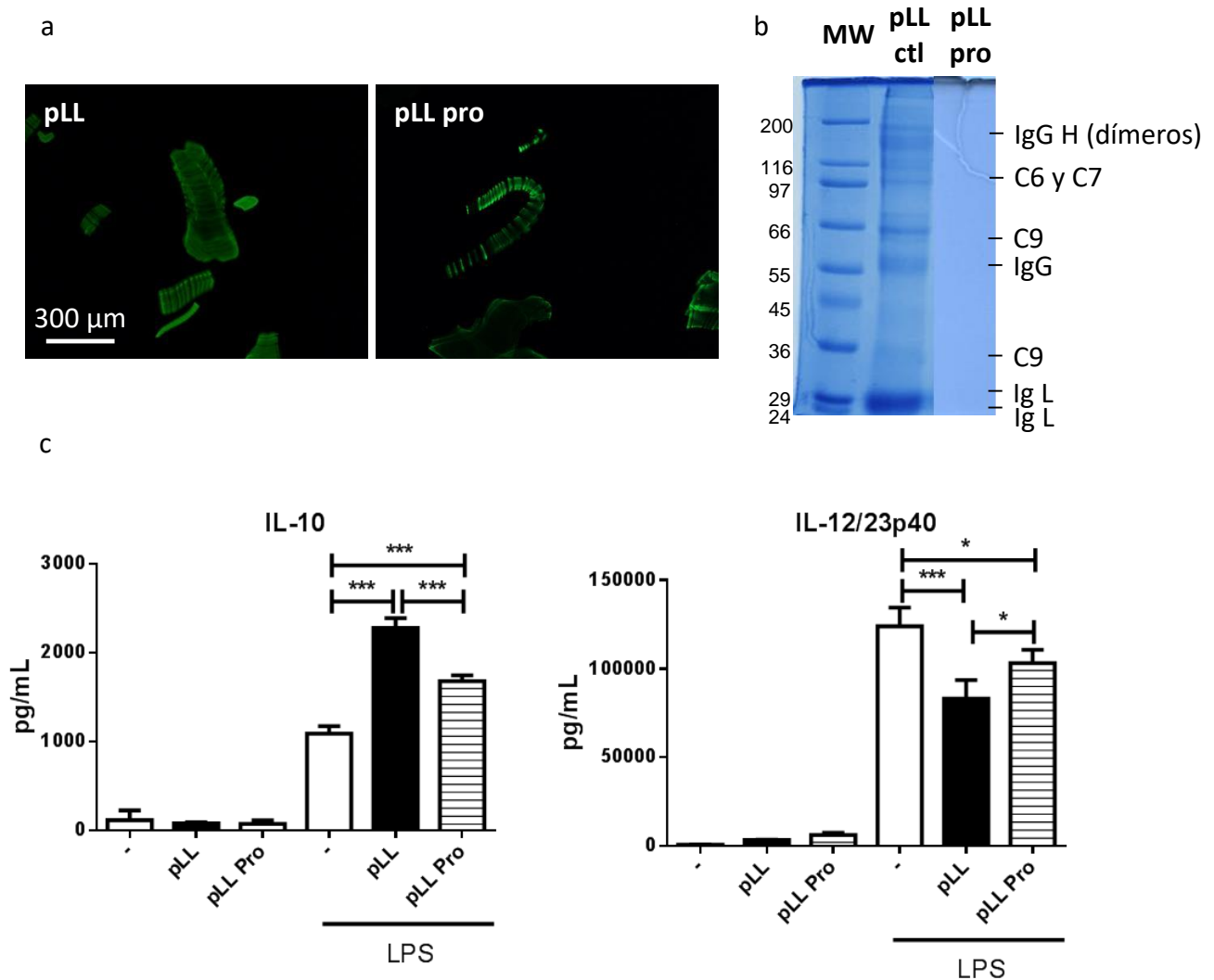


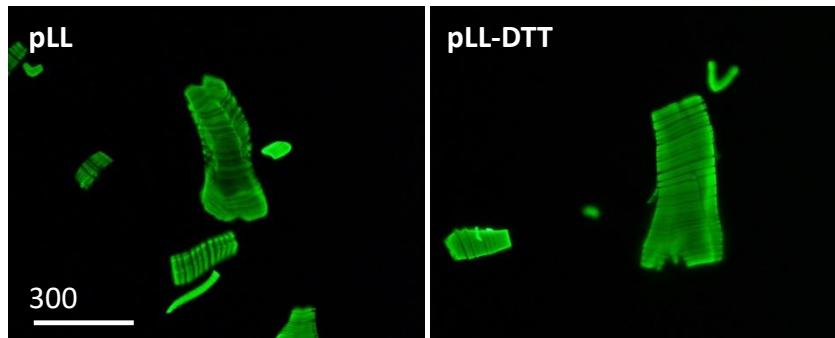
Figura 4.14. Evaluación del papel de los componentes proteicos de pLL en el sesgo inducido sobre la producción de citoquinas en BMDCs. a- Imágenes por microscopía de fluorescencia de pLL Ctl y pLL tratado con pronasa pLL (pLL pro), marcados con la lectina PNA-FITC. b- Se incubó pLL y pLL pro con tampón muestra de electroforesis 1 hora a 37°C, se centrifugó y se analizó el sobrenadante por SDS-PAGE. c- Se estimularon BMDCs con 10 µg de pLL y pLL pro, en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos independientes, excepto que la diferencia entre pLL y pLL pro en términos de inhibición de producción de IL-12/23p40 fue significativa en sólo 2 de los 4 experimentos. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

En conjunto, los resultados obtenidos al tratar a pLL con $\text{BH}_4^-/\text{IO}_4^-$ y con pronasa sugieren que la actividad sobre BMDCs depende, al menos de forma parcial, del componente proteico y no del componente glucídico de la CL. Esto combinado con la observación que la contribución de las Igs del hospedero es marginal, sugiere la posibilidad de que exista actividad en extremos N-terminales no glicosilados de apomucinas de la CL. A este respecto, se sabía previamente que el tratamiento con pronasa tiene un efecto marginal sobre las mucinas de la CL (medido en términos de la facilidad de disolución por sonicación), y que el mismo efecto es dado en forma más contundente por la reducción de disulfuros con ditioneitol (DTT), presumiblemente por penetración diferencial de ambos reactivos en la malla tridimensional altamente glicosilada de la CL (26). Esta información se conecta con la ya mencionada, proveniente del transcriptoma, de que existe un residuo de cisteína en un extremo N-terminal no glicosilado de ciertas apomucinas estructurales de la CL, el cual al encontrarse en un ambiente oxidativo debería estar formando un enlace disulfuro. Por lo anterior, se estudió la sensibilidad de la actividad de pLL al tratamiento con DTT, seguido por iodoacetamida (IAA, agente alquilante de tioles). Se estimularon BMDC con pLL y pLL-DTT en ausencia y presencia de LPS y se midió la producción de IL-10 y IL-12/23p40, y la expresión de CD40 y CD86, a las 18 horas. Los resultados (Figura 4.15b) mostraron que el tratamiento con DTT/IAA disminuyó de manera estadísticamente significativa la actividad de pLL respecto a la potenciación de IL-10, la inhibición de la producción de IL-12/23p40, y la inhibición de la expresión de CD40 inducidas por LPS. Asimismo, el tratamiento dio lugar a una tendencia (que en 3 de las 7 repeticiones experimentales fue significativa) a disminuir la inducción de CD86 por pLL *per se*, y la potenciación de CD86 por pLL en presencia de LPS. Adicionalmente, con el objetivo de evaluar si era posible anular completamente la actividad de pLL se probaron tratamientos de reducción más drásticos, aumentando la concentración de DTT y los tiempos de incubación, obteniéndose resultados similares a los de la Figura 4.15b (datos no mostrados). Por otra parte, si observamos los resultados de los ensayos con pLL tratado con BH_4^- solamente (Figura 4.13), se observa que este material tiene menor actividad que el material control, lo cual seguramente derive de la capacidad del BH_4^- de reducir enlaces disulfuros (222, 223). También se analizó la capacidad del tratamiento con DTT/IAA de extraer proteínas del hospedero. Como muestran los resultados, (Figura 7.4, Anexo 1) el tratamiento con DTT extrae igual o menor proporción de las Igs del hospedero que el tratamiento con pH2. Sin embargo, el tratamiento con DTT/IAA (Figura 4.15) inhibe

de manera más importante la actividad (sobre todos los parámetros) de pLL que el tratado con pH2 (Figura 4.11), nuevamente apoyando la presencia de actividad independiente de las Igs.

En síntesis estos resultados sugieren que los enlaces disulfuro nativos de mucinas de la CL son importantes para la actividad inmunoreguladora de pLL sobre BMDCs.

a



b

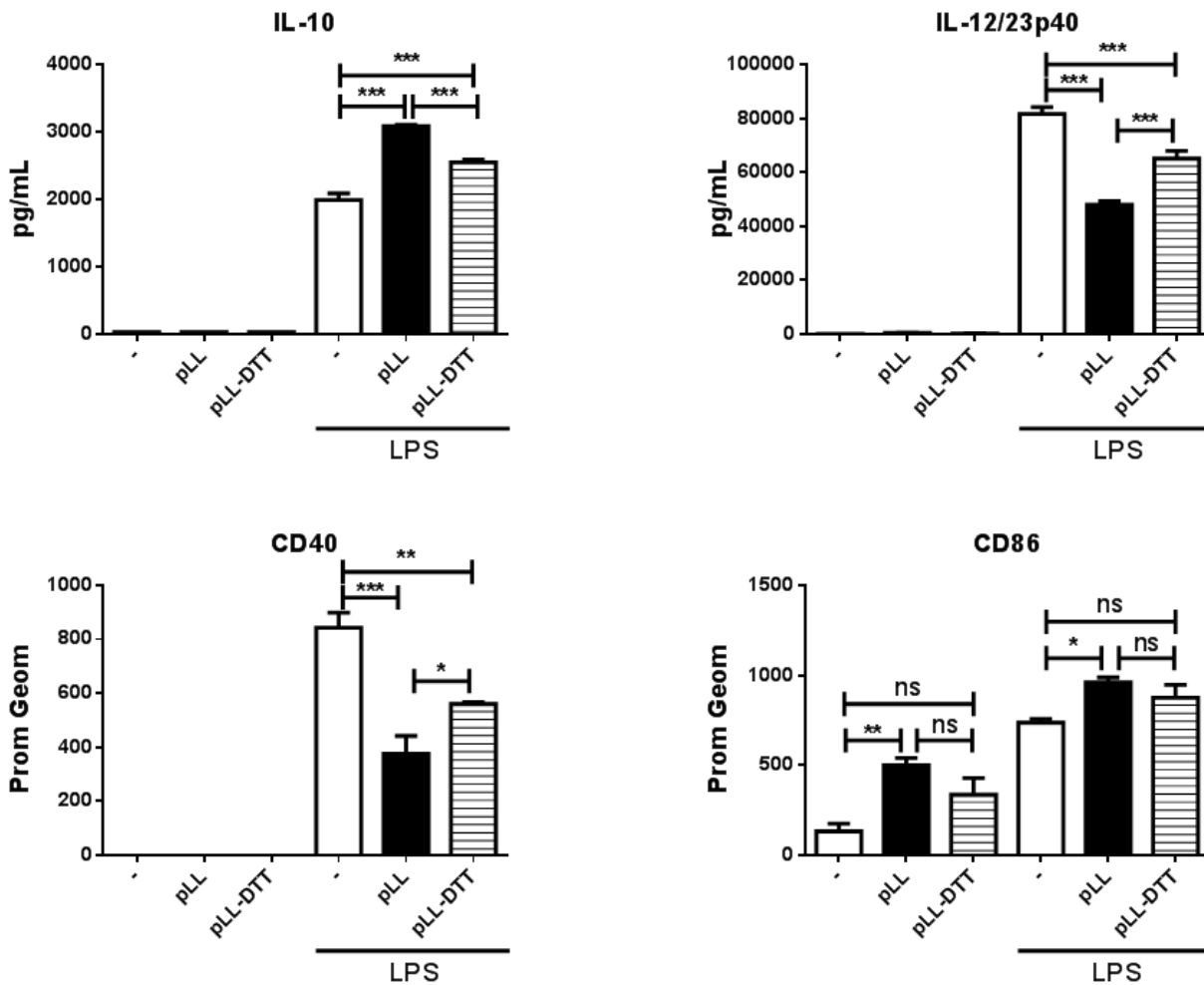


Figura 4.15. La actividad de pLL es sensible a la reducción de enlaces disulfuros con ditiotreitolo. Imágenes por microscopía de fluorescencia de pLL y pLL tratado con ditiotreitolo/iodoacetamida (pLL-DTT), marcados con la lectina PNA conjugada a FITC. b- Se estimularon BMDCs con 10 µg de pLL o pLL-DTT en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados para la cuantificación de citoquinas y duplicados para la evaluación de la expresión de los marcadores de superficie. Los resultados mostrados son representativos de 7 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo).

Por último en esta sección, basándonos en los resultados de que la actividad de pLL no depende de la oxidación de sus azúcares por $\text{BH}_4^-/\text{IO}_4^-$, y de que tanto el tratamiento con pronasa, así como la reducción de enlaces disulfuro con DTT/IAA, son capaces de disminuir la actividad inmunoreguladora de pLL, se propuso como posible motivo activo al extremo N-terminal común de las apomucinas EGC0002904 y EGC0004254 (ver introducción), el cual contiene la única cisteína libre presente en las apomucinas predichas de la CL. Se mandó sintetizar el péptido candidato (secuencia: HACKQSPPPM) y un péptido control (péptido con la misma composición aminoacídica que el péptido candidato pero con la secuencia desordenada, en la que se mantuvo solamente la posición de la cisteína; secuencia: SPCPQPKHAM). Se estimularon BMDCs con pLL, el péptido candidato, o el péptido control, en ausencia o presencia de LPS. Luego se midió la producción de IL-10, IL-12p70 (pLL inhibe la producción de IL-12p70 además de la de IL-12/23p40 inducida por LPS en BMDCs (Figura 7.5, Anexo 1), y la expresión de CD40 y CD86 a las 18 horas. Los resultados (Figura 4.16) muestran que el péptido candidato no presenta ninguna actividad diferencial respecto al péptido control, ni en ausencia ni en presencia de pLL. En otras palabras, el péptido candidato no funciona ni como un agonista ni como un antagonista específico de pLL. Cabe destacar que a la concentración 1.5 μM ambos péptidos causaron una disminución de la capacidad de pLL de potenciar IL-10 en presencia de LPS, que fue reproducible en las 3 repeticiones del experimento realizadas.

Globalmente, los resultados de esta sección sugieren que la actividad de pLL sobre BMDCs depende de componentes peptídicos, y más específicamente requiere enlaces disulfuros intactos. Al mismo tiempo, la observación que la actividad puede ser debilitada pero no anulada por los tratamientos con proteasas o reductores, y los resultados negativos obtenidos con el péptido candidato, argumentan en contra de la presencia de motivos moleculares peptídicos capaces de interactuar con receptores específicos en las DCs.

Como se detalla en la Discusión, esto nos lleva a plantear q la actividad de pLL depende de propiedades a nivel del material (supra-moleculares) que son alteradas por la reducción de disulfuros estructurales.

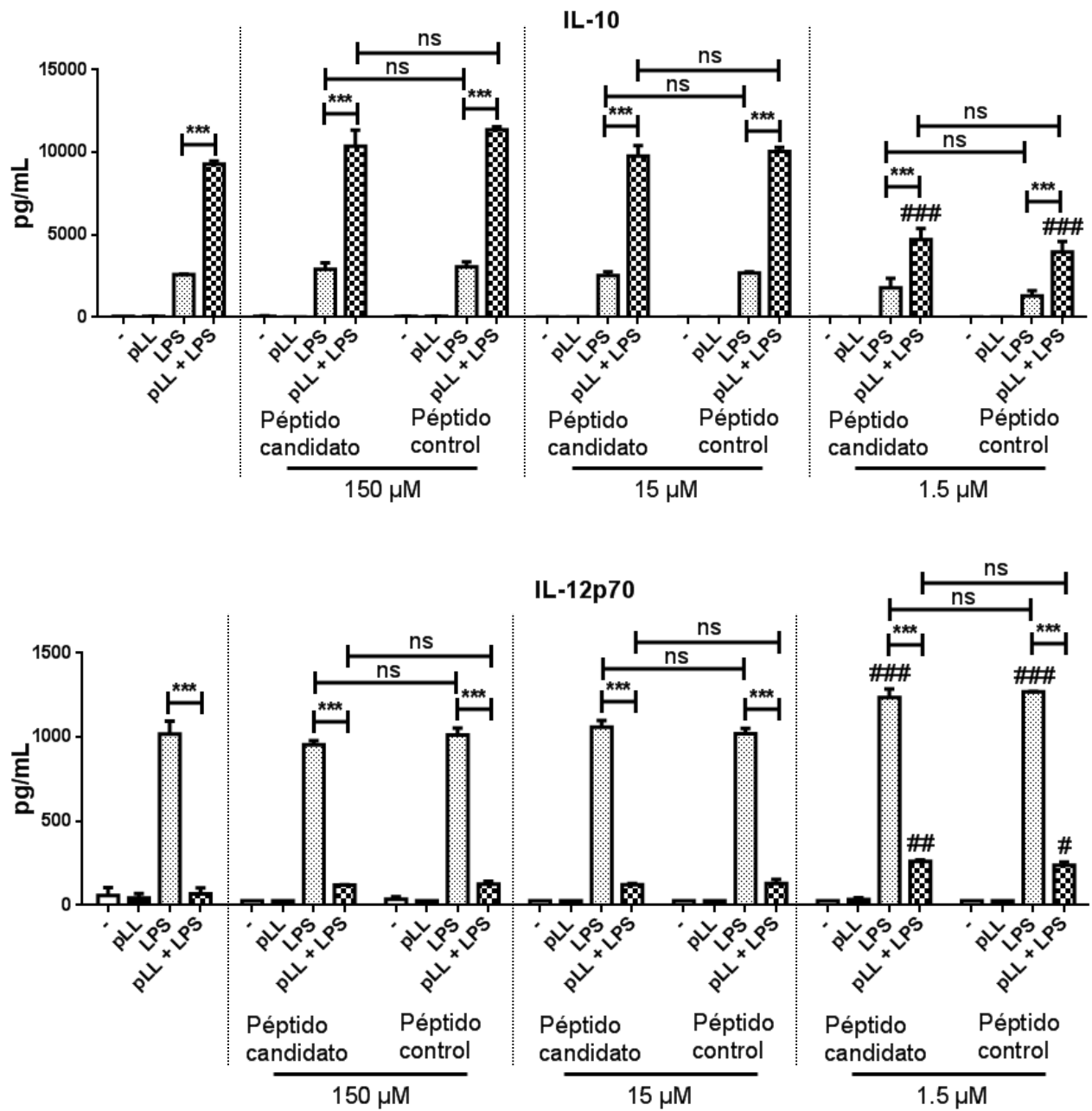


Figura 4.16. Ver pie de figura en la página siguiente.

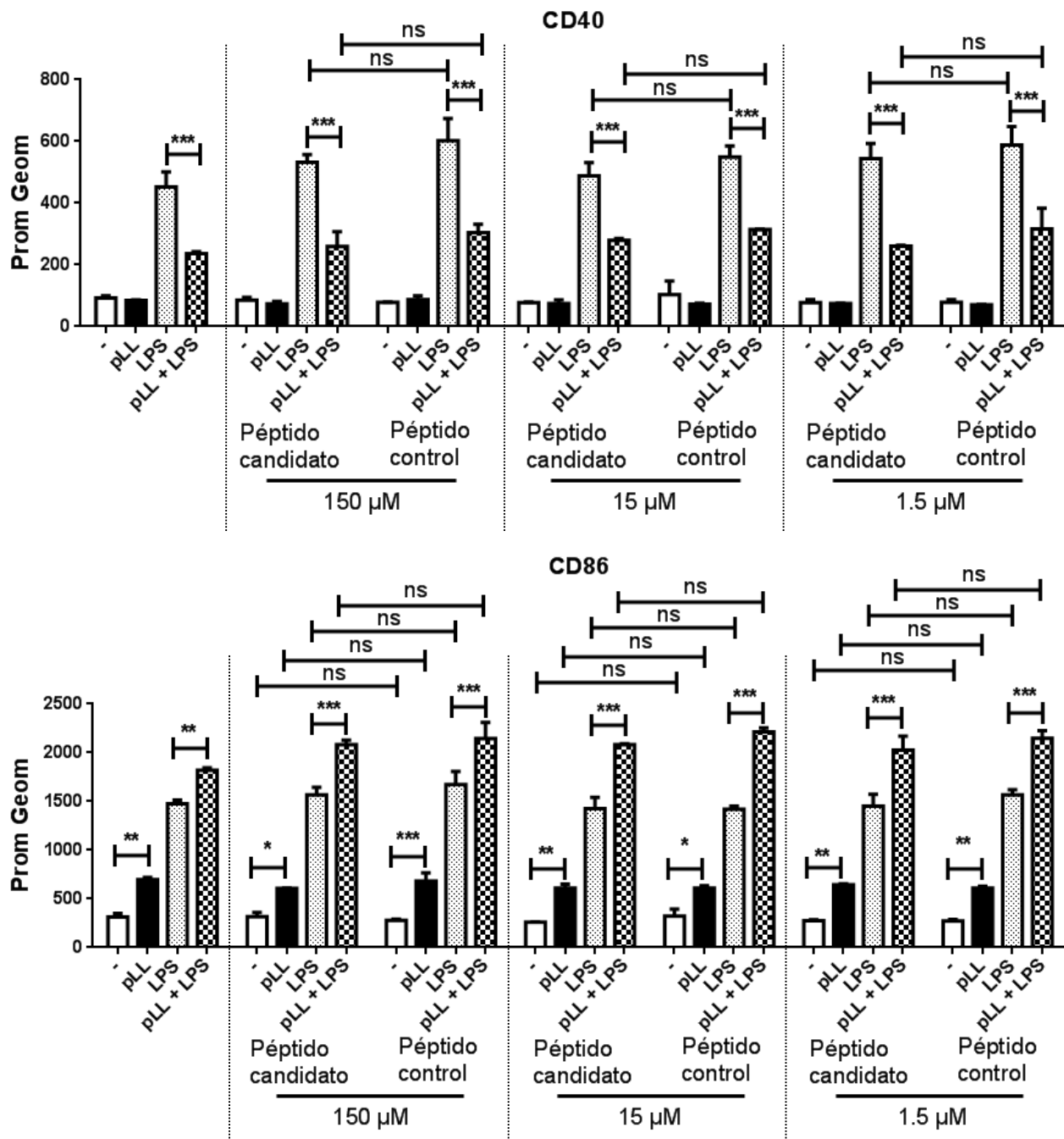


Figura 4.16. Evaluación de la actividad de péptido candidato sintético sobre el sesgo fenotípico inducido por pLL en BMDCs. Se estimularon BMDCs con 10 μ g de pLL y dos péptidos sintéticos (concentraciones utilizadas: 150 μ M, 15 μ M y 1.5 μ M), en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Las secuencias de los péptidos son: péptido candidato (secuencia: HACKSQPPPM) y péptido control (secuencia: SPCPQPKHAM). Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISAs. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados para la cuantificación de citoquinas y duplicados para la evaluación de la expresión de los marcadores de superficie. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativo; para comparaciones en presencia y ausencia de pLL; además se utilizaron: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar la estadística respecto al control sin péptido.

4.4 Identificación de posibles cambios en las vías de señalización intracelular NF- κ B, MAPKs y PI3K/Akt inducidos por pLL en BMDCs

Se buscó identificar si la estimulación de BMDCs con pLL induce algún cambio a nivel de vías centrales de señalización intracelular. Se estudiaron 3 de las principales vías: NF- κ B, MAPKs y PI3K/Akt. Para el estudio de estas vías de señalización, se estimularon BMDCs con pLL (P), LPS (L) y pLL más LPS (P/L), se prepararon extractos celulares totales a diferentes tiempos y se analizaron por *western blot*.

Primero se exploró la vía canónica de NF- κ B. Para esto, se realizaron cursos temporales (0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos), de la degradación de I κ B α . I κ B α , como se mencionó en la introducción, es una proteína central en la activación canónica de este módulo de señalización. Como muestran los resultados (Figura 4.17a), las BMDCs estimuladas con pLL mantienen la cantidad de I κ B α total estable durante el curso temporal estudiado. Las células estimuladas con LPS presentan como se espera degradación de I κ B α a partir de los 20 minutos de la estimulación, la cual no varió al coestimular con pLL. De esta manera, es posible concluir que el paso central de la vía de señalización canónica de NF κ B no se encuentra alterado por el condicionamiento de BMDCs con pLL, en ausencia o presencia de LPS.

Además, se estudió la vía de NF κ B de p105. Para esto, se realizó un curso temporal (0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos) de la fosforilación y de la degradación de p105. Como ya se mencionó, la fosforilación de p105 marca a la proteína para su posterior degradación por el proteosoma. Como muestran los resultados (Figura 4.17b), las BMDCs estimuladas solamente con pLL no presentan fosforilación ni degradación de p105 durante el curso temporal realizado. Por otra parte, las BMDCs estimuladas con LPS presentan la fosforilación y la degradación de p-105 esperadas a partir de los 10 minutos de la estimulación, y este patrón no cambia significativamente al coestimular con pLL. De todos modos, cabe mencionar que en algunos experimentos la fosforilación y/o degradación de p-105 se observó levemente aumentada al coestimular con pLL más LPS respecto a estimular con LPS solamente. De esta manera, es posible concluir que la vía de señalización de p-105 de NF κ B no se encuentra groseramente alterada y sin duda no se encuentra inhibida, al menos en los

niveles iniciales de su regulación, por el condicionamiento de BMDCs con pLL, en ausencia o presencia de LPS.

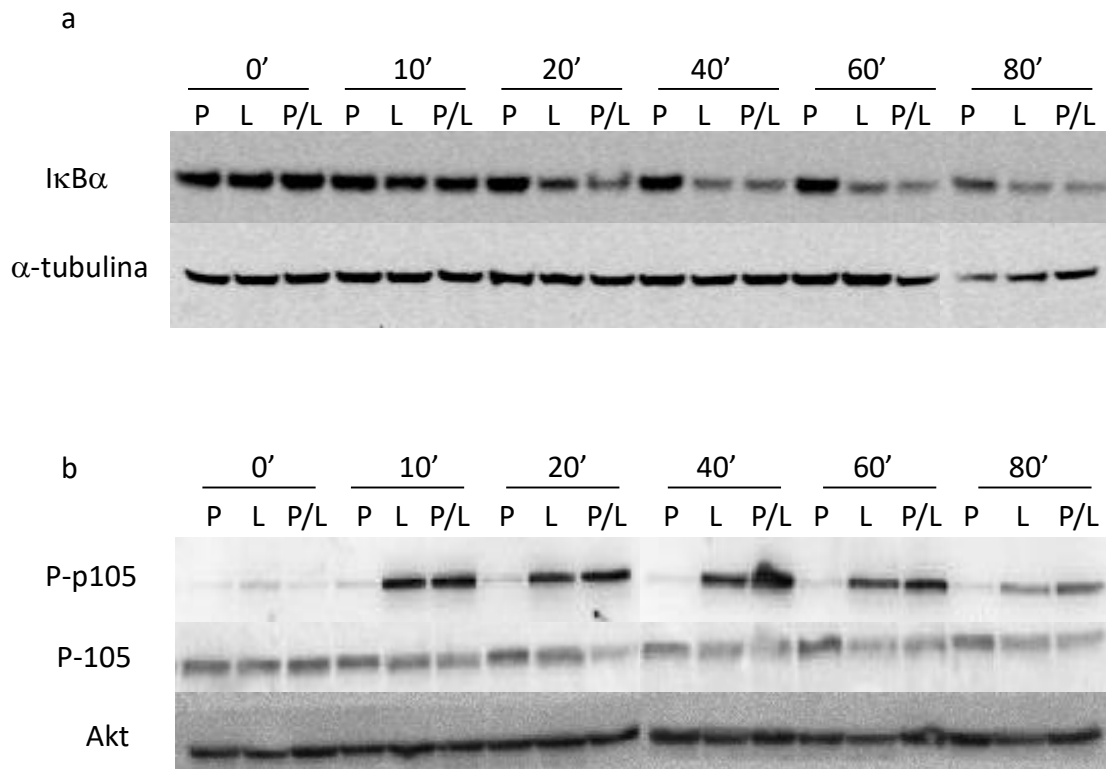


Figura 4.17. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la vía de NF κ B: I κ B α y p105. Se estimularon BMDCs con pLL (P), LPS (L) y pLL más LPS (P/L) y se prepararon extractos celulares totales a 0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos. Se analizaron los extractos por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. a- Se estudió la degradación de la proteína total I κ B α , utilizándose como control de carga α -tubulina. b- Se estudió la fosforilación (Ser933) y la degradación de la proteína p105, utilizándose como control de carga Akt total (en otros experimentos se ha verificado que el nivel de Akt total no cambia con el tiempo en estas condiciones). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes para el caso de I κ B α y de 2 experimentos independientes para p105.

Para el estudio de las MAPKs se analizó la fosforilación de los tres principales miembros de esta familia: JNK/SAPK, p38 y ERK1/2. Se realizaron cursos temporales (0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos) analizando el estado de fosforilación de las MAPKs mencionadas. Como se comentó en la introducción, el nivel de fosforilación de estas quinasas correlaciona con el grado de activación de la vía.

En cuanto a JNK/SAPK, las BMDCs estimuladas con pLL mantienen los mismos niveles de fosforilación a todos los tiempos estudiados, y el mismo resultado se observa para células estimuladas con LPS, o pLL más LPS (Figura 4.18a). En suma, las BMDCs en las condiciones de nuestros ensayos no presentan cambios en los niveles de fosforilación de JNK/SAPK.

Respecto a p38 (Figura 4.18b), las BMDCs estimuladas con pLL no presentan fosforilación a ninguno de los tiempos analizados. Por otra parte, las BMDCs estimuladas con LPS presentan un aumento en el nivel de fosforilación partir de los 10 minutos que alcanza su mayor nivel entre los 20 y 40 minutos, y disminuye a los 60 y 80 minutos. El mismo patrón de fosforilación de p38 se observa al coestimular con pLL más LPS. Entonces, la vía de señalización de p38 no se encuentra alterada por el condicionamiento de BMDCs con pLL, en ausencia o presencia de LPS.

Finalmente para ERK1/2 (Figura 4.18c), los resultados no fueron concluyentes. En nuestras condiciones de trabajo, el nivel de fosforilación de ERK1/2 en respuesta a LPS es bajo, de manera similar a lo que ocurre para JNK/SAPK, lo cual puede deberse a la baja concentración de LPS utilizada. Se realizaron 6 repeticiones, debido al comportamiento variable de los resultados. Más allá de estas variaciones, el comportamiento de las BMDCs estimuladas con LPS vs pLL más LPS siempre fue parecido dentro de cada ensayo, con una pequeña tendencia no totalmente reproducible, hacia mayor fosforilación en BMDCs coestimuladas con pLL. La única variación robusta observada fue el bajo grado de fosforilación a 10 minutos, pero este es independiente del estímulo, y probablemente artefactual.

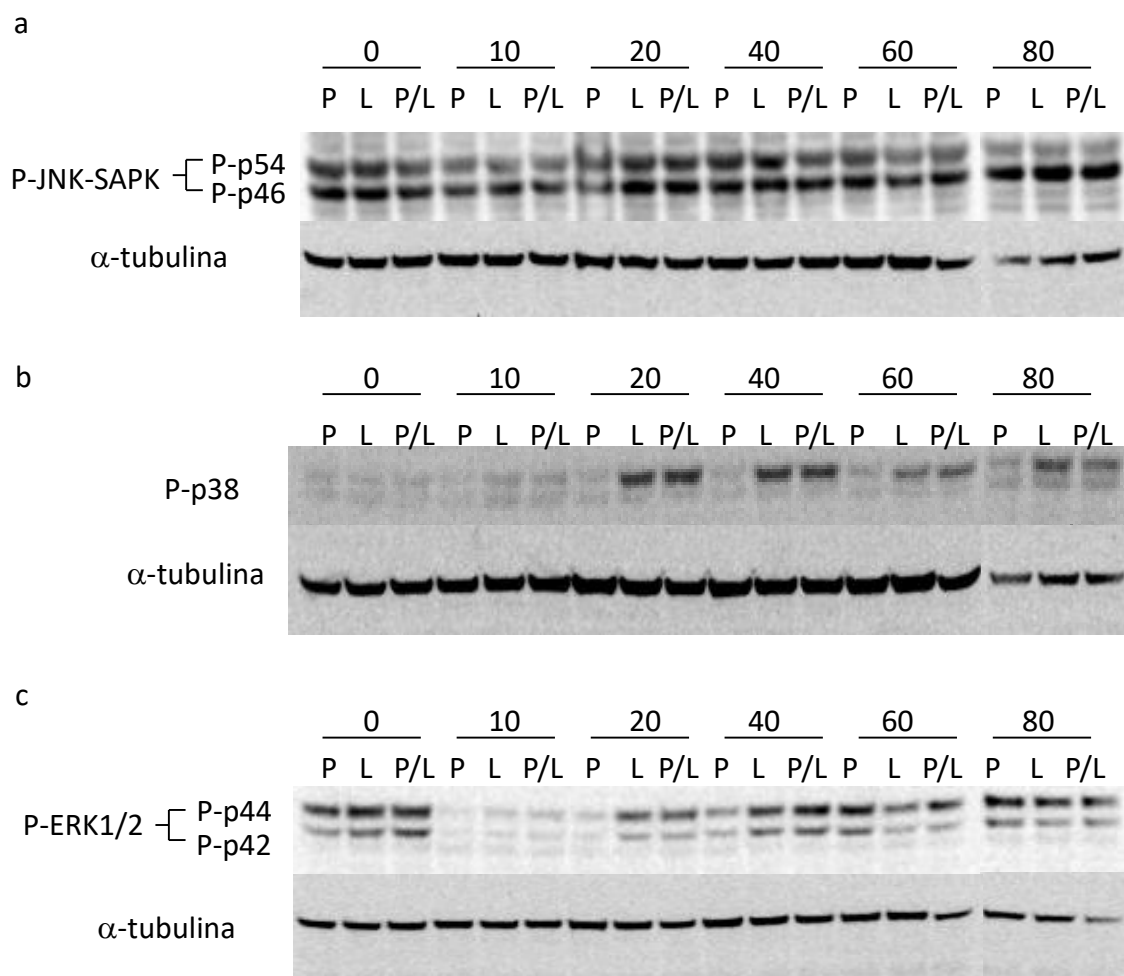


Figura 4.18. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la vía de las MAPquinasas: JNK/SAPK, p38 y ERK1/2. Se estimularon BMDCs con pLL (P), LPS (L) y pLL más LPS (P/L) y se prepararon extractos celulares totales a 0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos. Se analizaron los extractos por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. a- Se estudió la fosforilación de las proteínas a- JNK/SAPK (Thr183/Tyr185); b- p38 (Thr180/Tyr182); c- ERK1/2 (Thr202/Tyr204); utilizándose como control de carga α -tubulina. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes para las quinasas JNK/SAPK y p38 (excepto q el aumento de la fosforilación de pLL a los 80 minutos no fue reproducible). Para el caso de ERK1/2 se realizaron 6 experimentos independientes los cuales presentaron un mayor grado de variabilidad, se eligió el resultado más representativo.

Debido a la naturaleza inconcluyente de los resultados obtenidos en las cinéticas de fosforilación para ERK1/2, y considerando que el objetivo de estos experimentos es determinar cambios que subyacen a los sesgos fenotípicos inducidos por pLL, se decidió realizar un estudio con un inhibidor de esta quinasa. Para esto, se utilizó un inhibidor de MEK (quinasa encargada de fosforilar ERK1/2), UO126, y se observó si el mismo afectaba la actividad de pLL sobre BMDCs en términos de IL-10, IL-12p70, CD40 y CD86, tanto en ausencia como en presencia de LPS. Se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) solamente o el inhibidor UO126 durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación, pLL, LPS o pLL más LPS, y a las 18 horas se cuantificaron los niveles de IL-10, IL-12p70, CD40 y CD86. Tal y como se espera (por los trabajos realizados en macrófagos derivados de medula ósea, BMDM, del inglés, *bone marrow derived macrophages*) (118, 224), el inhibidor redujo el nivel de IL-10 y aumentó el de IL-12 producidos en respuesta a LPS. Además, dio lugar a aumentos en los niveles de CD40 y CD86, en ausencia y presencia de LPS (Figura 4.19). Las BMDCs preincubadas con UO126 mantuvieron la potenciación estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 y las inhibiciones estadísticamente significativas en las producciones de IL-12p70 y de CD40 inducidas por pLL en presencia de LPS, si bien esta última tendió a ser cuantitativamente menor en presencia del inhibidor. También se mantuvo la inducción significativa de CD86 inducida por pLL *per se* y la potenciación significativa de la expresión de CD86 inducida por pLL en presencia de LPS. De esta manera, ya que la incubación con pLL no produjo cambios importantes ni robustos sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2 en presencia de LPS, y la actividad de pLL no se anuló en BMDCs incubadas con el inhibidor UO126, concluimos que la actividad inmunoreguladora de pLL sobre BMDCs no depende, de manera importante, de alteraciones en la actividad de ERK1/2.

Se concluye de los resultados anteriores que pLL no induce fosforilación de JNK/SAPK, ni de p38 *per se*, así como tampoco altera los niveles de fosforilación generados en presencia de LPS. En lo que respecta a la activación de ERK1/2, la exposición a pLL tampoco generó cambios robustos en los niveles de fosforilación de esta quinasa en presencia de LPS. Además, la actividad de pLL sobre BMDCs no fue alterada en forma importante por la utilización del inhibidor UO126. Por lo tanto, los resultados sugieren que los sesgos

fenotípicos inducidos por pLL no derivan de alteraciones sobre las vías de señalización de las MAPKs: JNK/SAPK, p38 o ERK1/2.

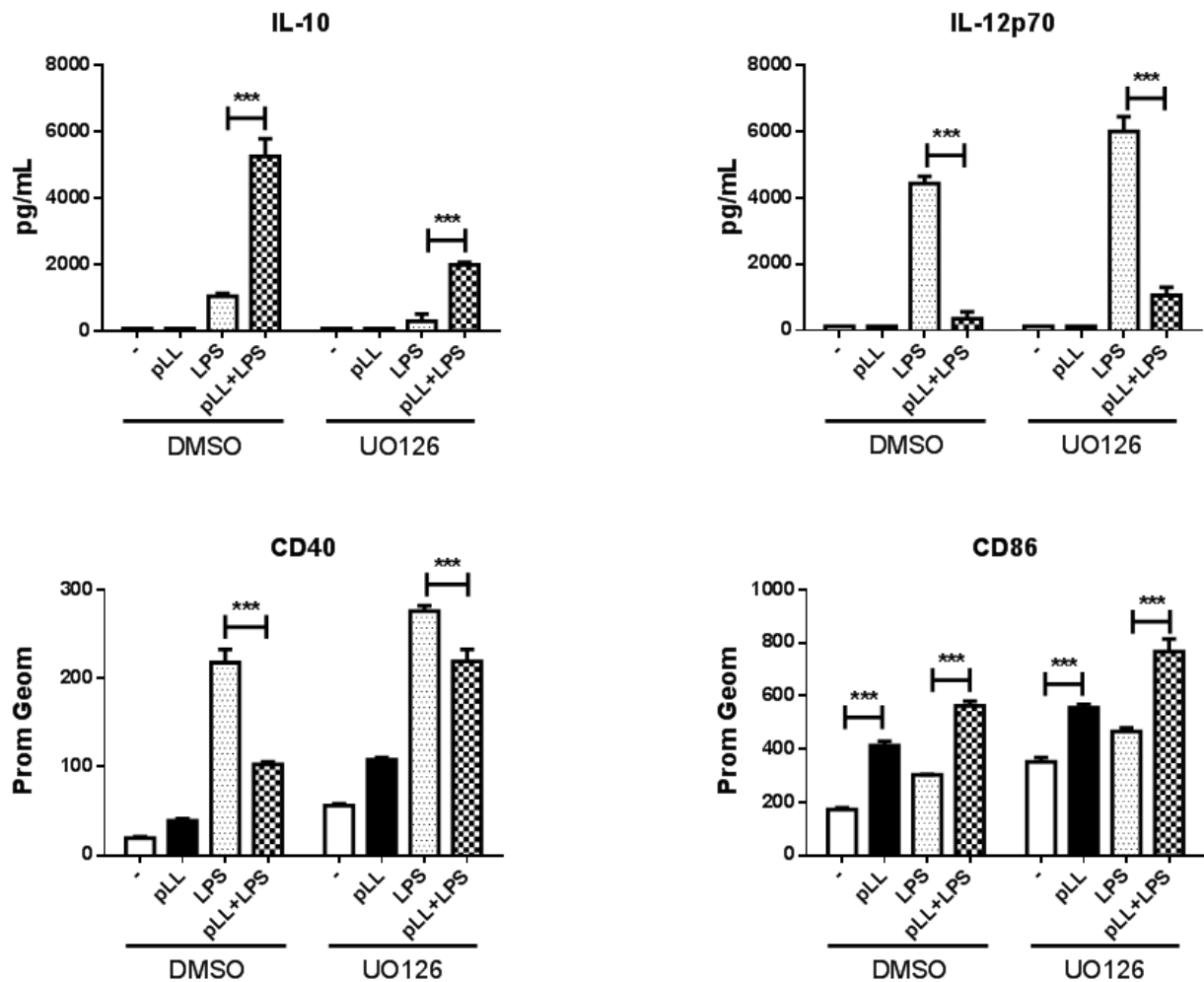


Figura 4.19. El inhibidor UO126 no inhibe la actividad de pLL sobre BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs con DMSO (vehículo) o el inhibidor UO126 5 μ M (inhibidor de MEK, quinasa que fosforila y activa ERK1/2) durante 30 minutos. Luego se estimularon con 10 μ g de pLL en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimentos (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$).

Por último se analizó la vía PI3K/Akt, a través del estudio de la fosforilación de Akt en la posición Ser473, fosforilación necesaria junto con la fosforilación en Thr308 para la correcta activación de esta quinasa. De aquí en más, cuando se refiera a la fosforilación de Akt se referirá a la fosforilación en la posición Ser473. Se realizaron cursos temporales (0, 40, 80, 120 y 160 minutos) de extractos totales de BMDCs condicionadas con pLL, LPS y pLL más LPS. Como muestran los resultados (Figura 4.20), las BMDCs estimuladas con pLL no presentan aumento en fosforilación de Akt durante ningún tiempo de la cinética estudiada. Cabe mencionar que en algunas de las repeticiones experimentales se vio una leve inhibición respecto a la fosforilación basal, comenzando a las 40 minutos; la presencia de esta inhibición correlacionó con la presencia en el ensayo de niveles basales de fosforilación de Akt relativamente altos (datos no mostrados). Por otra parte, las BMDCs estimuladas con LPS presentaron un aumento en el nivel de fosforilación de Akt a partir de los 40 minutos de la estimulación, alcanzando su mayor nivel a los 80 minutos, y disminuyendo a partir de los 120 minutos aproximadamente. Sin embargo, para las BMDCs estimuladas con pLL más LPS, si bien se puede observar un pequeño aumento en los niveles de fosforilación respecto del basal a los 40 minutos, este aumento es leve, manteniéndose la fosforilación cercana a los niveles basales durante todo el lapso estudiado. De esta manera, la presencia de pLL inhibe la fosforilación de Akt en la posición Ser473 inducida por LPS, así como también puede ser capaz de disminuir levemente los niveles basales de la fosforilación de esta quinasa.

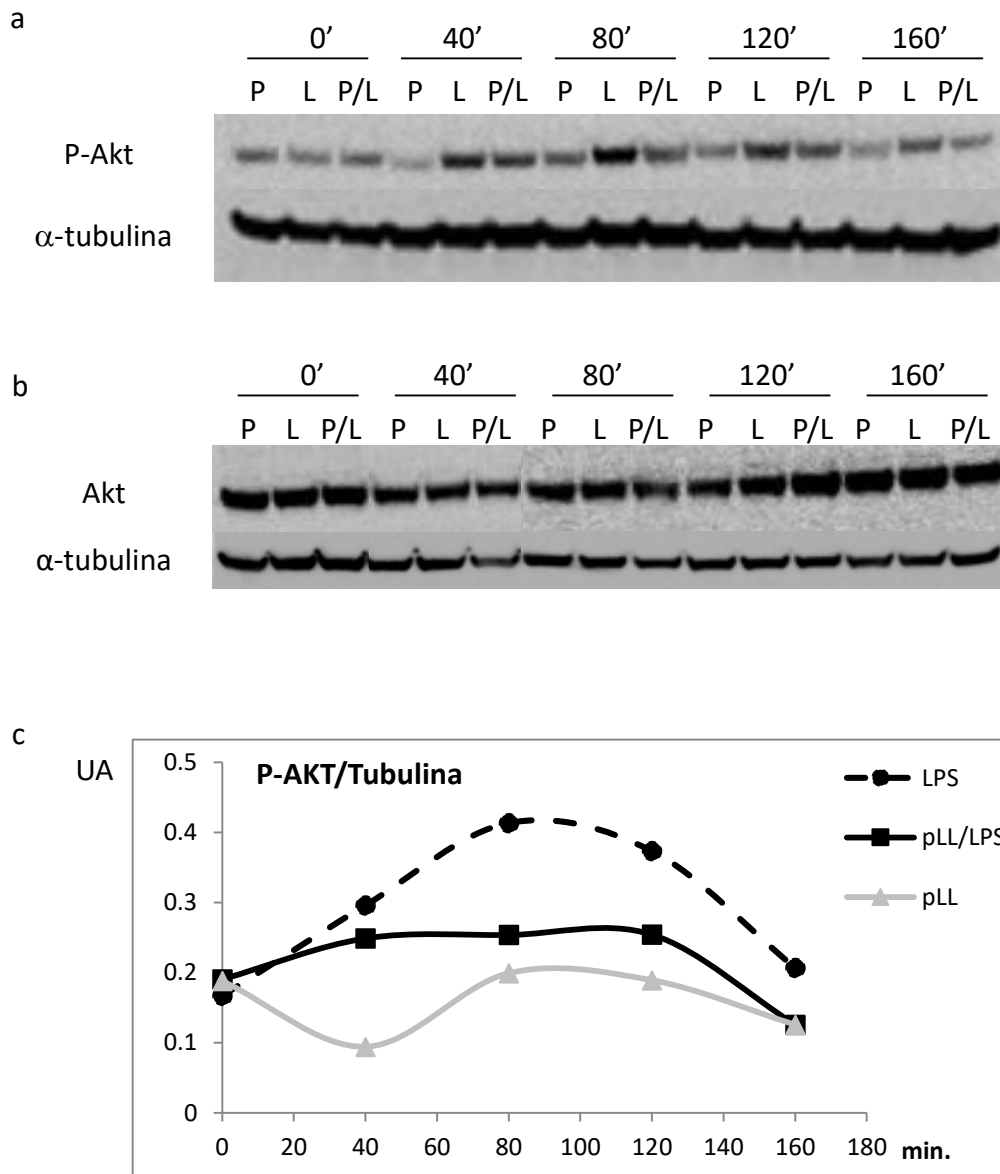


Figura 4.20. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la vía de PI3K/Akt. Se estimularon BMDCs con pLL (P), LPS (L) y pLL más LPS (P/L) y se prepararon extractos celulares totales a 0, 40, 80, 120 y 160 minutos. Se analizaron los extractos por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. a- Se estudió la fosforilación de la proteína Akt (Ser473), utilizándose como control de carga α -tubulina. b- Se estudió la degradación de la proteína Akt, utilizándose como control de carga α -tubulina. c- Cuantificación por densitometría la banda de P-Akt normalizada por el control de carga α -tubulina. Los resultados son representativos de 6 experimentos independientes para la fosforilación de Akt, mientras que para la evaluación de Akt total el resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

Se quiso investigar si la robusta inhibición por pLL de la fosforilación de Akt inducida por LPS en BMDCs, estaba también presente en otros modelos de células mieloides, en particular macrófagos reclutados por inyección intraperitoneal de medio tioglicolato (Tio-Mac) y BMDMs. Los resultados (Figura 4.21) muestran que pLL es capaz de inhibir la fosforilación de Akt inducida por LPS en Tio-Mac, pero no en BMDMs.

En suma, los resultados de esta sección nos llevan a enfocarnos en el estudio de la vía de PI3K/Akt. En particular, en la siguiente sección se estudiará si la inhibición por pLL de la fosforilación de Akt inducida por LPS se relaciona con el sesgo fenotípico inducido sobre BMDCs.

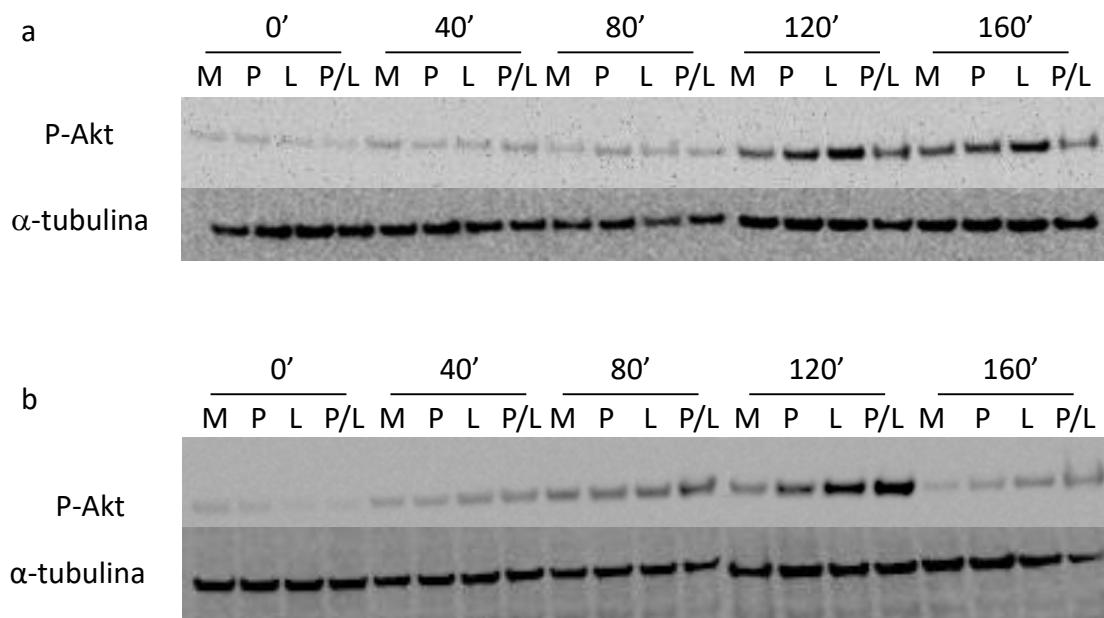


Figura 4.21. Exploración del efecto de la estimulación de pLL sobre la fosforilación de Akt en macrófagos. Se estimularon macrófagos reclutados por tioglicolato y BMDMs con medio solamente (M), pLL (P), LPS (L) y pLL más LPS (P/L), se prepararon extractos celulares totales a 0, 40, 80, 120 y 160 minutos y se analizaron por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos. Se estudió la fosforilación de la proteína Akt (Ser473) en macrófagos reclutados por tioglicolato (a) y en BMDMs (b), utilizándose como control de carga α -tubulina. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

4.5 Evaluación de la participación de la vía de PI3K/Akt en la actividad inmunoreguladora de pLL sobre BMDCs

En esta sección se estudiaron diversos mediadores y reguladores de la vía de PI3K/Akt y sus blancos, en relación a posibles cambios inducidos durante la exposición a pLL y/o la participación en los efectos de pLL observados. Para facilitar la lectura, se introduce una Figura (Figura 4.22) con las vías de señalización estudiadas y los inhibidores específicos utilizados, indicando las proteínas blancos de cada inhibidor.

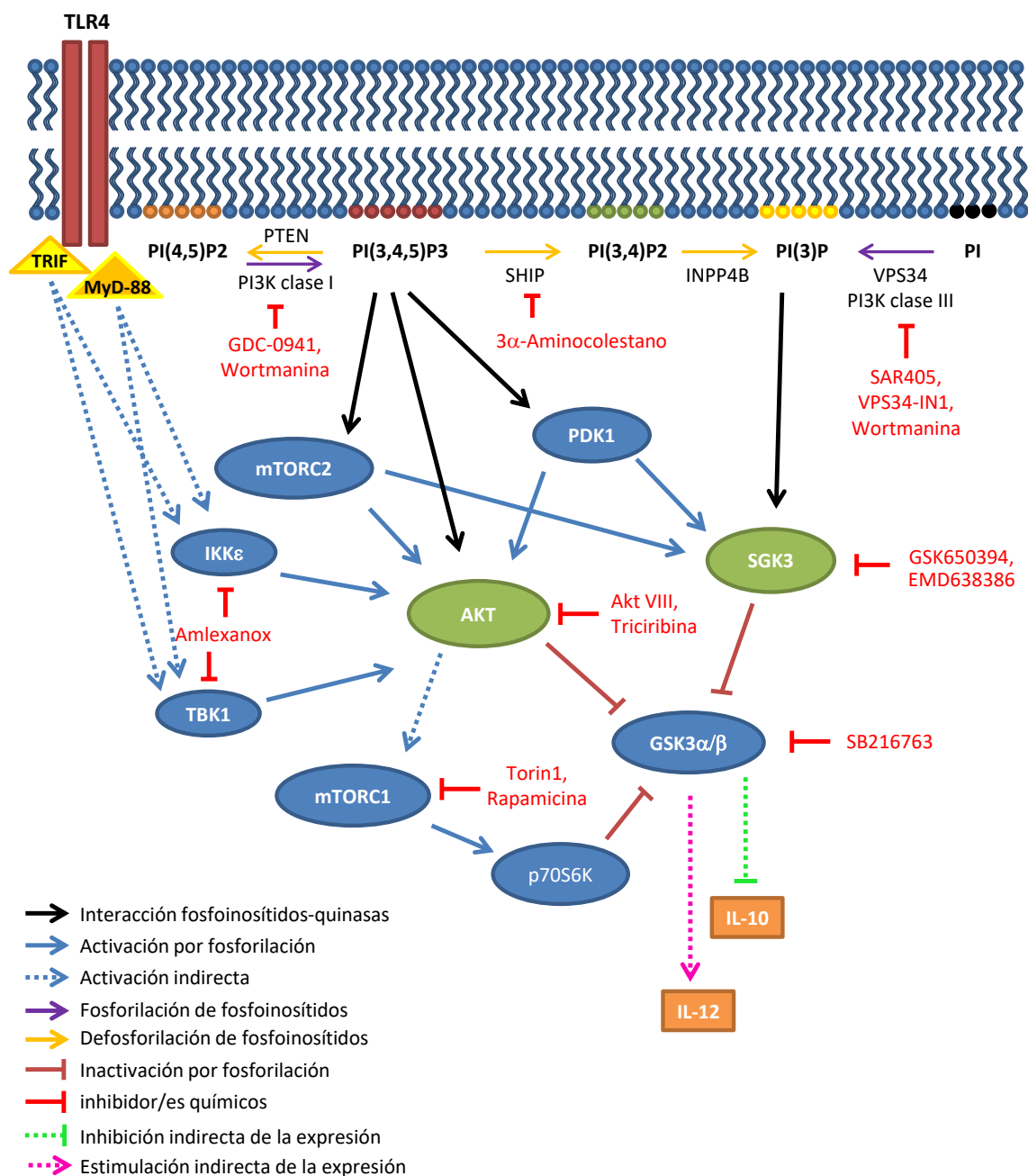


Figura 4.22. Esquema de las vías de señalización estudiadas, e inhibidores específicos de alguna de las proteínas involucradas. Se presenta un esquema de las vías de señalización estudiadas, indicando donde actúan los inhibidores utilizados.

Como se mencionó en la sección anterior, de las vías de señalización estudiadas (NFκB, MAPKs y PI3K/Akt), el único cambio robusto detectado inducido por pLL corresponde a la inhibición de la fosforilación de Akt inducida por LPS. Como se explicó en la Introducción, las PI3K de clase I se encuentran *upstream* de Akt en la vía. Se decidió estudiar con un inhibidor general de PI3Ks, llamado wortmanina, si el mismo imitaba los resultados obtenidos con pLL. Primero se comprobó si en nuestras condiciones la wortmanina inhibía la fosforilación de Akt. Para esto, se preincubaron BMDCs con medio de incubación solamente o wortmanina y se estimularon durante 80 minutos en presencia de LPS. Se realizaron extractos totales y mediante *western blot* se analizó el estado de fosforilación de Akt. Como se observa en los resultados (Figura 4.23a), la fosforilación de Akt fue totalmente inhibida por wortmanina. Una vez verificado que el inhibidor realmente inhibiera la vía a la concentración empleada, se estudió cómo afectaba el fenotipo de BMDCs incubadas con nuestros estímulos. Para esto se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) o wortmanina durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 18 horas, y se cuantificó la producción de IL-10, IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Las BMDCs preincubadas con el inhibidor wortmanina y estimuladas con LPS solamente presentaron una expresión significativamente mayor de IL-12p70 respecto a las BMDCs preincubadas con el vehículo (Figura 4.23b), lo cual se corresponde con datos publicados (166), y nuevamente reafirman la correcta actividad del inhibidor. La wortmanina inhibió totalmente los efectos de pLL sobre IL-10, IL-12p70 y CD40 en presencia de LPS. Para CD86, se observa una inhibición parcial de la actividad de pLL por wortmanina en 2 de las repeticiones y total en las 2 restantes.

En suma, estos ensayos muestran que en presencia de wortmanina pLL pierde totalmente su actividad sobre BMDCs para 3 de los parámetros estudiados (IL-10, IL-12p70 y CD40) y la pierde parcialmente para el otro parámetro (CD86). En otras palabras, son necesarias PI3Ks funcionales para que pLL tenga actividad. Es importante mencionar que la wortmanina no inhibió la producción de IL-10 en presencia de LPS, lo cual no concuerda con lo esperado para el eje PI3K/Akt/GSK-3 (165, 166, 225). Este resultado será abordado en la sección número 8.

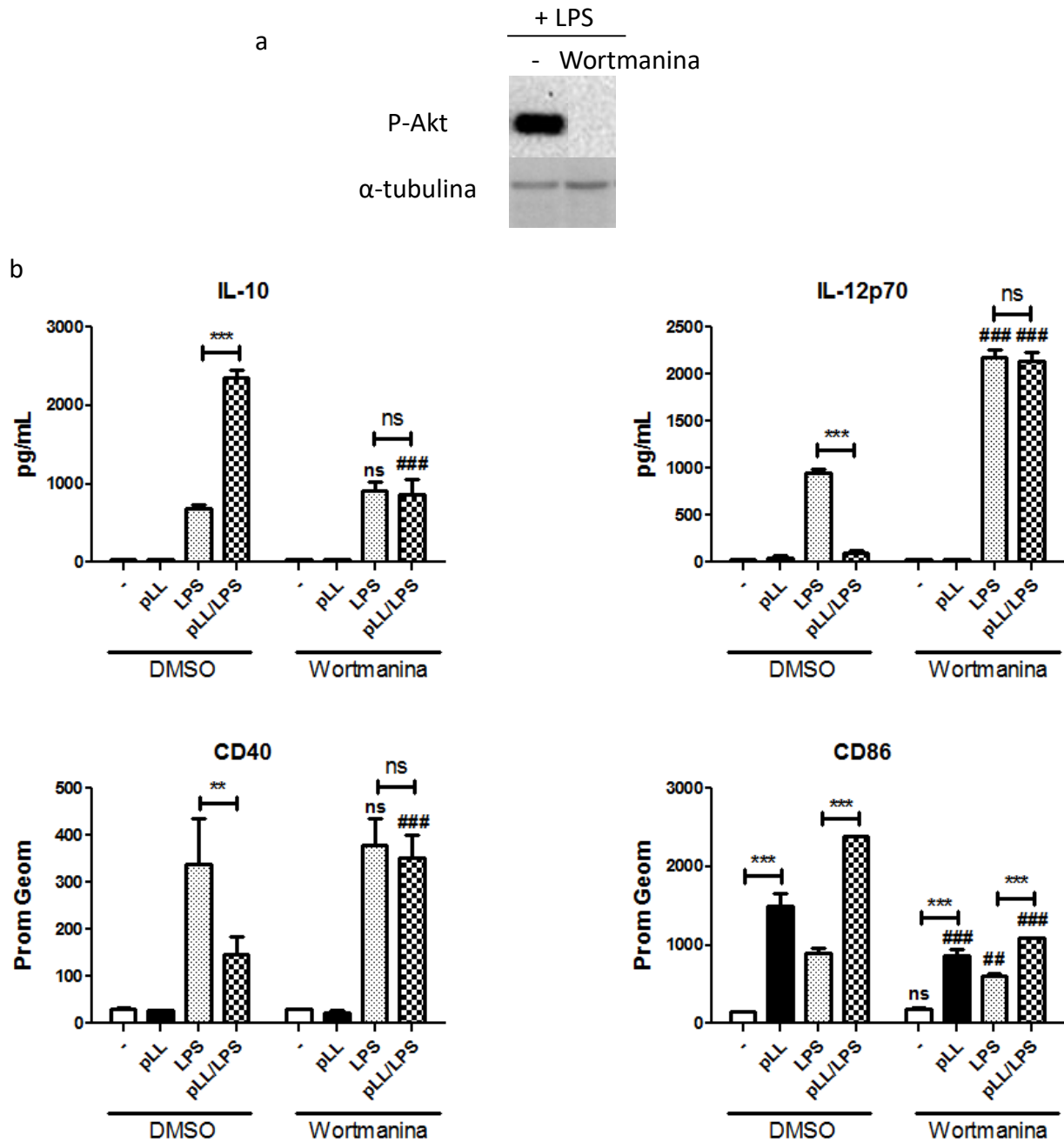


Figura 4.23. Efecto del inhibidor wortmanina sobre la actividad de pLL en BMDCs. a- Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con medio conteniendo DMSO (vehículo) solamente o wortmanina 100 nM, luego se las estimuló con o sin LPS 10 ng/mL durante 80 minutos y se prepararon extractos celulares. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-P-Akt Ser473. Se utilizó como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. b- Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con DMSO solamente o wortmanina 100 nM. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. A las 18 horas se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante por ELISA y se evaluó la expresión de CD40 y CD86 por citometría de flujo. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 5 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se indican las diferencias significativas: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$; o ausencia de estas (ns) entre BMDCs preincubadas con el vehículo solamente vs preincubadas con wortmanina (y luego estimuladas de la misma manera).

El resultado anterior genera una paradoja, ya que pLL parece inhibir la vía de PI3K en términos de Akt en BMDCs, pero en presencia de un inhibidor general de PI3Ks pierde su actividad. Además, de la inhibición de la fosforilación de Akt causada pLL se esperaría una menor fosforilación inhibitoria de GSK-3, lo cual según antecedentes (165) debería causar inhibición de IL-10 y potenciación de IL-12 en presencia de LPS, efectos contrarios a los observados en presencia de pLL. La wortmanina inhibe todas las clases de PI3K, entre ellas a VPS34, o sea PI3K de clase III. Se ha demostrado que una isoforma de SGK, SGK-3, se une a PI3P, producto de VPS34, lo cual favorece su activación por fosforilación (226). Además, se ha demostrado que SGK-1 es capaz de unirse a PI monofosforilados, incluyendo el PI3P (227). Las SGKs son, tanto estructural como funcionalmente, similares a Akt, compartiendo muchos blancos moleculares, entre ellos GSK-3 (228), e incluso se las ha llamado “segundos Akt” (229). Se ha demostrado que varios cánceres resistentes a inhibidores de Akt presentan altos niveles de activación de SGK-1, apoyando la hipótesis que Akt y las SGKs son redundantes en algunos de sus blancos (230). Además, estudios recientes indican que SGK-1 regula negativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias en BMDCs estimuladas con LPS, dependiendo su activación de PI3K (231). Nos planteamos entonces la hipótesis que pLL inhiba la vía de PI3K clase I (con consecuente inhibición de Akt), y paralelamente active a VPS34, (con consecuente activación de SGKs y fosforilación inhibitoria de GSK-3), lo cual podría explicar la potenciación de IL-10 y la inhibición de IL-12 observadas. Por ello, primero desglosamos la participación de PI3Ks de clase I y de clase III en la actividad de pLL sobre BMDCs.

Para el estudio de la vía VPS34/SGK utilizamos dos inhibidores específicos de VPS34 llamados VPS34-IN1 y SAR405, y dos inhibidores de SGKs llamados EMD638386 y GSK650394 (inhibidor de SGK-1, SGK-2 y probablemente SGK3 (232)).

Se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo), o los inhibidores VPS34-IN1 o SAR405 durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 18 horas, y se cuantificó la producción de IL-10, IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. En presencia de los inhibidores de VPS34, las células responden a LPS con una producción significativamente mayor tanto de IL-10 como de IL-12p70. Esta observación que no estaba previamente descrita, se retoma en la sección 4.8. Como se observa en los resultados (Figura 4.24), las BMDCs preincubadas con los inhibidores de

VPS34 mantuvieron la potenciación estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 (para el caso del inhibidor SAR405 ver más adelante), las inhibiciones significativas en las producciones de IL-12p70 y de CD40 inducidas por pLL en presencia de LPS, la inducción estadísticamente significativa de CD86 inducida por pLL *per se*, y la potenciación estadísticamente significativa de la expresión de CD86 inducida por pLL en presencia de LPS. Debido a la alta producción de IL-10 inducida por la preincubación con SAR405 en presencia de LPS, y considerando que las BMDCs podrían haber llegado al máximo de producción potencial de IL-10, se realizó un ensayo similar utilizando una concentración de LPS un orden menor. Se preincubaron BMDCs con DMSO o el inhibidor SAR405, luego se estimularon con LPS (1 ng/mL) o pLL más LPS (1 ng/mL), y a las 18 horas se cuantificó la producción de IL-10. Como muestran los resultados (Figura 4.25) a esta dosis más baja de LPS, las BMDCs preincubadas con SAR405 mantuvieron la potenciación estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 inducida por pLL.

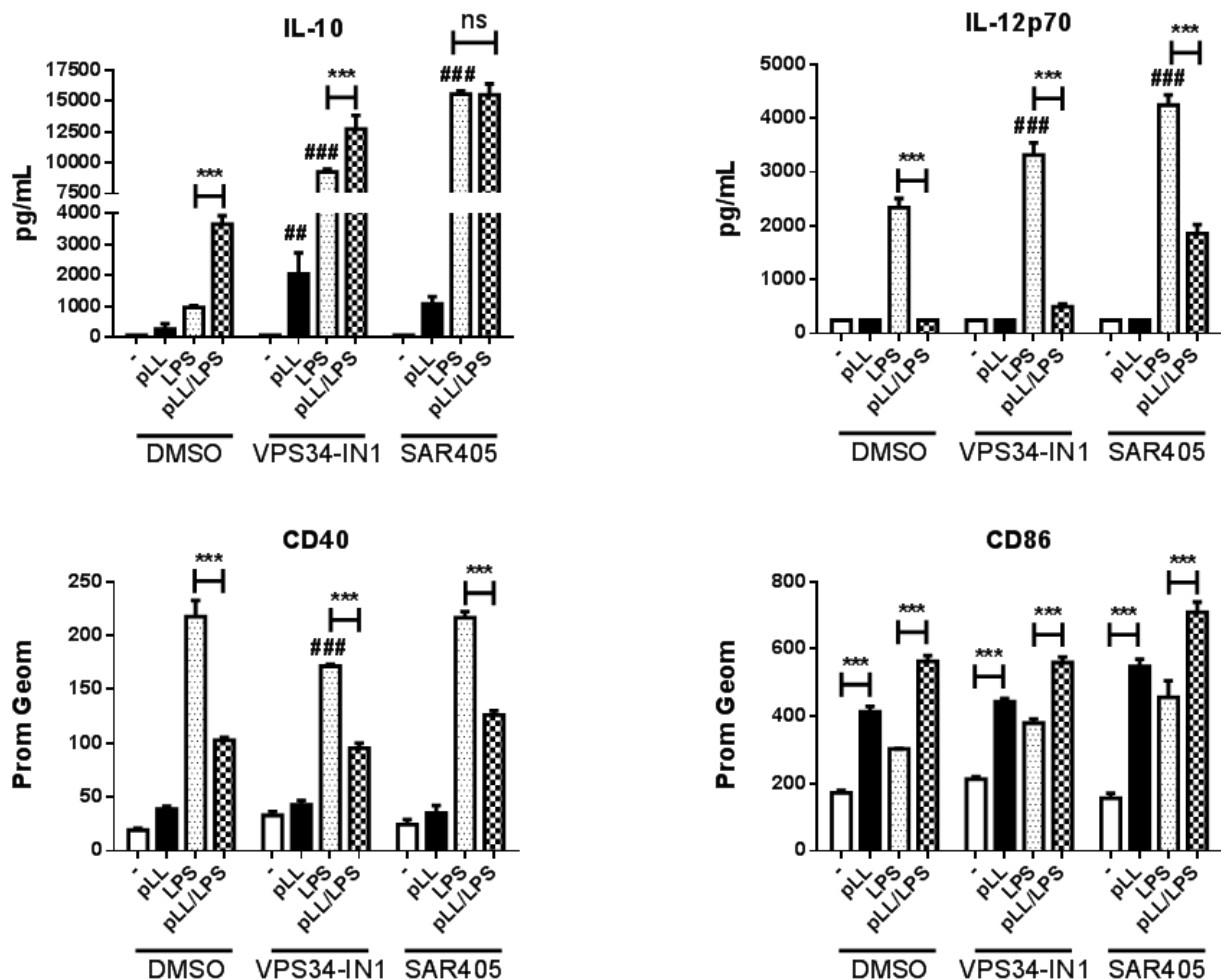


Figura 4.24. Efecto de la inhibición de PI3K de clase III sobre la actividad de pLL en BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con VPS34-IN1 1 μ M, SAR405 1 μ M, o solamente DMSO (vehículo). Luego se estimularon con 10 μ g de pLL en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se indican las diferencias significativas: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$; o ausencia de estas (ns) entre BMDCs preincubadas con el vehículo solamente vs preincubadas con VPS34-IN1 o SAR405 (y luego estimuladas de la misma manera).

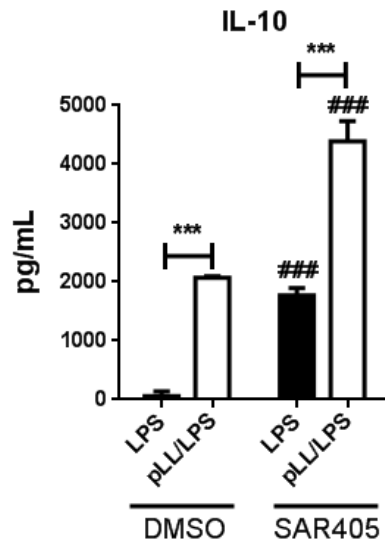


Figura 4.25. Efecto del inhibidor SAR405 sobre la actividad de pLL en BMDCs empleando una dosis más baja de LPS. Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con DMSO (vehículo) solamente o SAR405 1 μ M (inhibidor de PI3K class III). Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia o ausencia de LPS 1 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ensayo. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se indican las diferencias significativas: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$; entre BMDCs preincubadas con el vehículo solamente vs preincubadas con SAR405 (y luego estimuladas de la misma manera).

Luego se estudió la participación de las quinasas SGK en la actividad inmunoreguladora inducida por pLL en BMDCs. Para esto se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo solamente) o los inhibidores SGK650394 o EMD638386 durante 30 minutos; luego se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 18 horas, y se cuantificó la producción de IL-10, IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como se observa en los resultados (Figura 4.26), ambos inhibidores potenciaron la expresión de IL-12 inducida por el LPS como era esperado (231). Además, las BMDCs preincubadas con los inhibidores de SGK mantuvieron la potenciación estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 inducida por pLL en presencia de LPS, las inhibiciones significativas en las producciones de IL-12p70 y de CD40 inducidas por pLL en presencia de LPS, la inducción estadísticamente significativa de CD86 inducida por pLL *per se* y la potenciación significativa de la expresión de CD86 inducida por pLL en presencia de LPS.

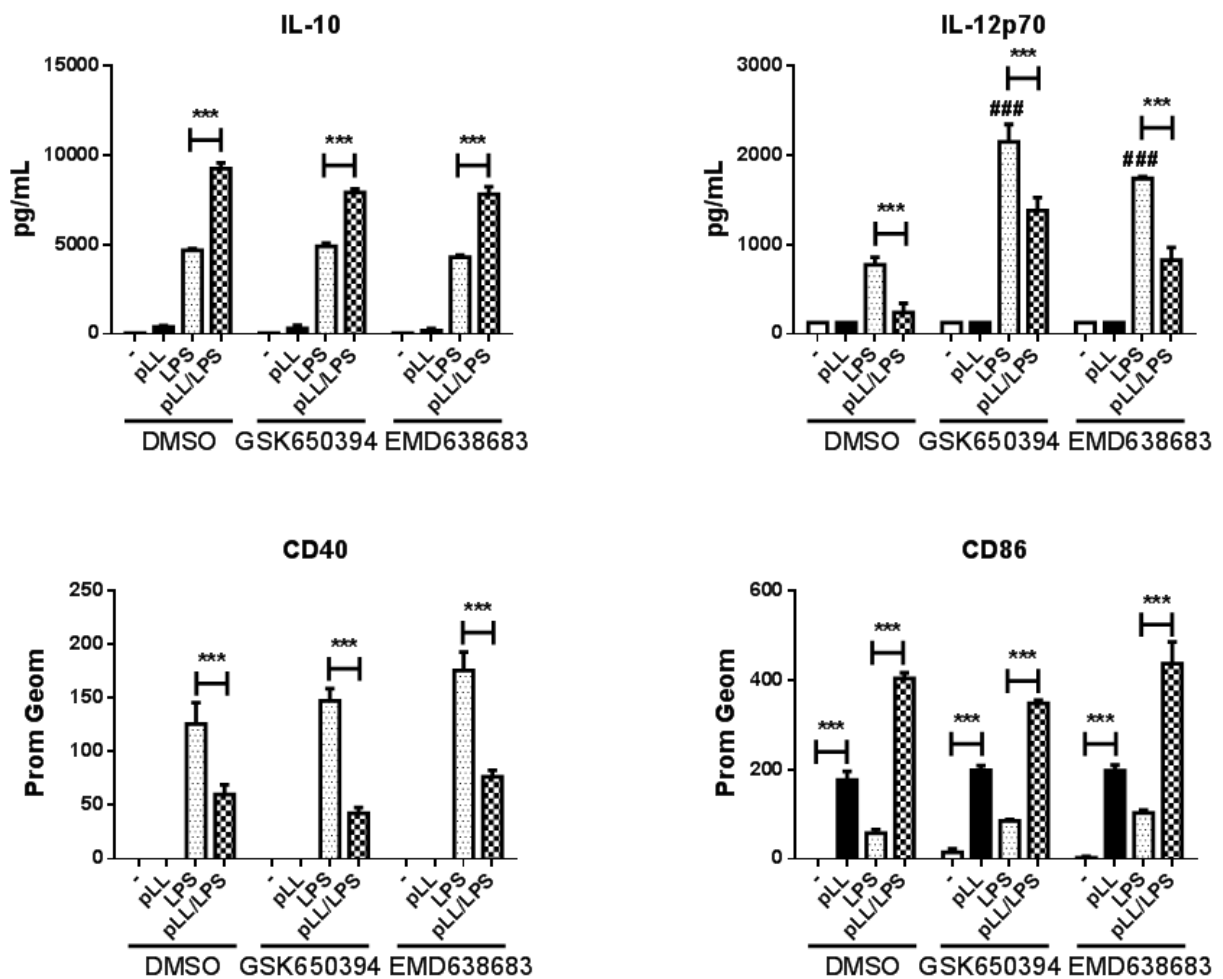


Figura 4.26. Efecto de la inhibición de SGKs sobre la actividad de pLL en BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con DMSO (vehículo) solamente, GSK650394 10 μ M o EMD638683 30 μ M. Luego se estimularon con 10 μ g de pLL en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimentos: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar la diferencias respecto al tratamiento con el vehículo solamente.

Por último, se estudió la fosforilación de SGK-1 en la posición Ser422. Para esto, se realizó un curso temporal (60, 120 y 180 minutos) usando extractos totales de BMDC condicionadas con medio de incubación solamente, pLL, LPS y pLL más LPS. Como muestran los resultados (Figura 7.6, Anexo 1), no existieron diferencias en los niveles de fosforilación entre las diferentes condiciones estudiadas, ni a los diferentes tiempos.

Del conjunto de estos resultados se extrae que el fenotipo inducido por pLL no requiere de VPS34 ni SGKs.

Descartada la participación de PI3K de clase III en los sesgos fenotípicos por pLL, se estudió más en detalle la vía de PI3K de clase I/Akt. Esto incluyó ensayos empleando el inhibidor específico de PI3K de clase I, GDC-0941. Incluyó además, analizar la participación de dos fosfatasas que regulan la actividad de las PI3Ks de clase I, PTEN y SHIP1. También incluyó explorar la importancia de la inhibición de Akt inducida por pLL, empleando 2 inhibidores específicos de Akt, triciribina y el inhibidor VIII de Akt (de ahora en más “Akt VIII”). Finalmente incluyó explorar la participación de una vía alternativa de activación de Akt propuesta, que involucra las quinasas TBK1 e IKK ϵ (140).

Se comprobó si en nuestras condiciones GDC-0941 inhibía la fosforilación de Akt. Para esto, se preincubaron BMDCs con medio de incubación o GDC-0941 y se estimularon durante 80 minutos con LPS. Se prepararon extractos totales y se verificó por *western blot* el estado de fosforilación de Akt. Como se observa en los resultados (Figura 4.27a), la fosforilación de Akt fue efectivamente inhibida por GDC-0941. Además, las BMDCs preincubadas con GDC-0941 produjeron estadísticamente más IL-12p70 que las BMDCs preincubadas con el vehículo solamente; esto se corresponde con los datos publicados acerca de cómo la vía de PI3K/Akt regula la producción de IL-10 e IL-12 (225). Una vez verificada la actividad del inhibidor se estudió como afectaba al fenotipo de BMDCs incubadas con nuestros estímulos. Como indican los resultados (Figura 4.27b), luego de la preincubación con GDC-0941 desapareció totalmente el efecto de pLL sobre IL-10, IL-12p70, CD40 y CD86 en BMDCs, tanto en ausencia como en presencia de LPS. Cabe destacar que en ausencia de pLL, para 3 de los 4 parámetros (IL-10, IL-12p70 y CD86), el inhibidor no modificó la respuesta de las células al LPS, o bien lo hizo en el sentido opuesto a la modificación que ocurre en presencia de pLL. En cambio, para CD40, el inhibidor modificó la respuesta al LPS en el mismo sentido que pLL.

Ya que tanto el inhibidor como pLL disminuyen la fosforilación activadora de Akt, solamente para CD40 los resultados son compatibles con que los efectos de pLL dependan de la inhibición de la actividad de Akt. En suma, estos ensayos muestran que son necesarias PI3Ks de clase I funcionales para que pLL tenga actividad, y sugieren vinculación entre la inhibición de la fosforilación y la expresión de CD40.

Se concluye del conjunto de los ensayos anteriores que pLL pierde su actividad sobre BMDCs en presencia de inhibidores de PI3K de clase I pero no en presencia de inhibidores de PI3K de clase III, y que el efecto de pLL sobre CD40 es imitado por el inhibidor de PI3K de clase I.

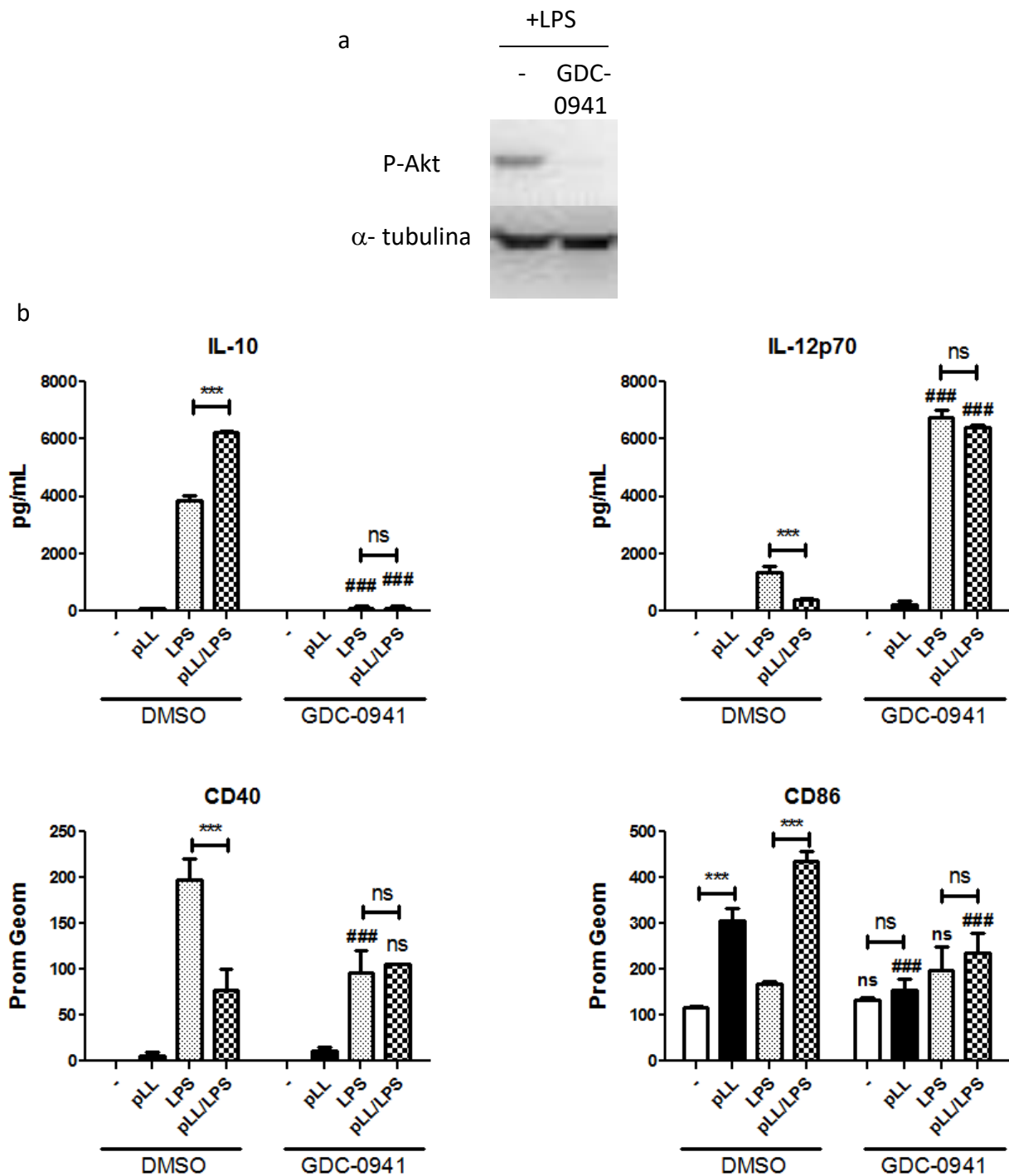


Figura 4.27. Efecto del inhibidor GDC-0941 sobre la actividad de pLL en BMDCs. a- Se preincubaron BMDCs 30 minutos con medio de incubación solamente o GDC-0941 5 μ M. Se estimularon con LPS y se prepararon extractos celulares totales a 80 minutos. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-P-Akt Ser473. Se utilizó como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. b- Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con GDC-0941 5 μ M o DMSO (vehículo) solamente. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. A las 18 horas se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante por ELISAs y se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría de flujo. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimentos: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$, * $P < 0.05$; no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar diferencias entre BMDCs estimuladas de la misma manera pero preincubadas con GDC-0941 respecto al tratamiento con el vehículo solamente.

Como se desprende de los resultados hasta el momento, pLL requiere PI3Ks de clase I activas pero inhibe la fosforilación de Akt. Estos resultados son en principio paradójicos, considerando que Akt es efector de PI3K de clase I. Dados estos resultados complejos, y al no estar a nuestro alcance técnico cuantificar los niveles de PIP3 en respuesta a los estímulos, resultaba de interés obtener información sobre las principales fosfatasa que regulan los niveles de PIP3, PTEN y SHIP1, en el contexto de estimulación con pLL. Para PTEN, se evaluó el estado de fosforilación en la posición Ser380, la cual participa tanto de la estabilidad como de la activación de esta fosfatasa (233). Para esto, se realizó un curso temporal (0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos), de extractos totales de BMDCs condicionadas con pLL, LPS o pLL más LPS. Como muestran los resultados (Figura 4.28), las BMDCs estimuladas con pLL, LPS o pLL más LPS no presentan cambios en el nivel de fosforilación a los tiempos analizados. Esto sugiere en forma primaria que PTEN no participa de manera activa en la regulación negativa de la vía de PI3K/Akt inducida por pLL en presencia de LPS.

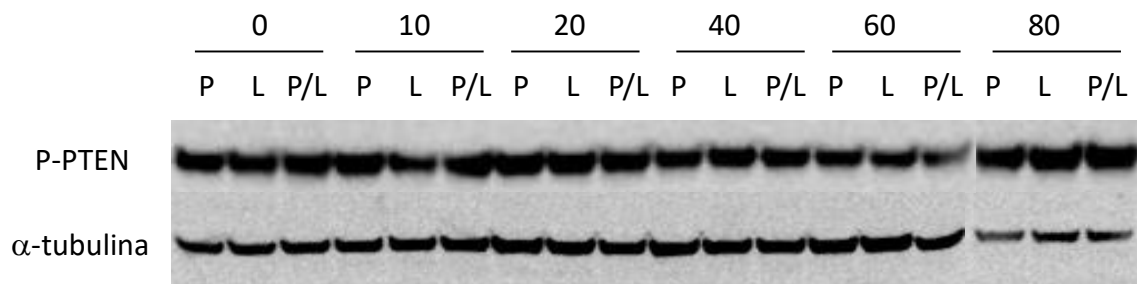


Figura 4.28. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de PTEN. Se estimularon BMDCs con pLL (P), LPS (L) o pLL más LPS (P/L). Se prepararon extractos celulares totales a 0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-P-PTEN en la posición Ser380, utilizándose como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes.

Luego se exploró la participación de SHIP1. Para esto se preincubaron BMDCs con medio de incubación solamente o el inhibidor 3 α -aminocolestano durante 30 minutos, y luego se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 80 minutos. Se prepararon extractos totales y mediante *western blot* se analizó el estado de fosforilación de Akt. Como se observa en los resultados (Figura 4.29a), la fosforilación de Akt aumenta levemente en presencia de 3 α -aminocolestano, aunque se esperaba observar un mayor aumento al utilizar el inhibidor en presencia de LPS. Sin embargo, la inhibición de la fosforilación de Akt inducida por pLL en presencia de LPS se mantiene. Este resultado sugiere que SHIP1 no es el factor principal en la inhibición de la fosforilación de Akt inducida por pLL. Además, se preincubaron BMDCs con EtOH (vehículo) solamente o 3 α -aminocolestano, se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 18 horas, y se cuantificó la producción de IL-10, IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como se observa en los resultados (Figura 4.29b), las BMDCs preincubadas con 3 α -aminocolestano no expresan IL-10 ni IL-12p70 para ninguna de las condiciones, ni aumentan su expresión de CD40 en respuesta a LPS. Ya que estas inhibiciones no se observan al mismo grado en células *Knockout* (KO) para SHIP1 (ver más adelante), es probable que el 3 α -aminocolestano afecte a las células a través de blancos diferentes a SHIP1 (efectos “*off-target*”). Para el caso de CD86, el inhibidor baja el nivel de expresión basal de la molécula, y anula la respuesta al LPS. En paralelo, anula la respuesta a pLL en términos de CD86, y debilita mucho la respuesta a pLL en presencia de LPS. Por lo que se concluye de estos resultados que SHIP1 podría contribuir a los efectos de pLL sobre la inducción de CD86, pero es difícil sacar conclusiones debido a los probables efectos “*off-target*” del inhibidor.

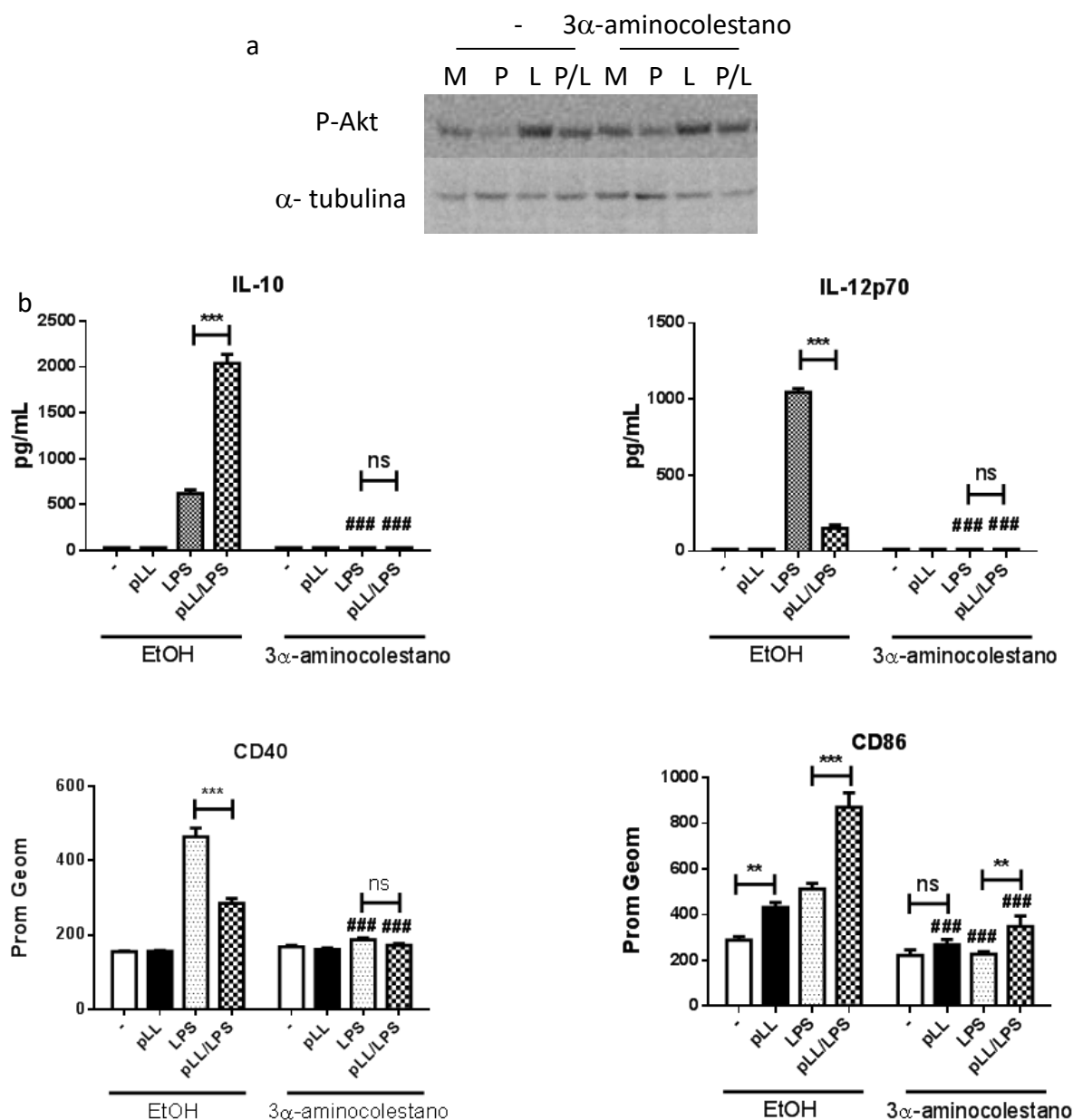


Figura 4.29. Efecto del inhibidor 3α -aminocolestano sobre la actividad de pLL en BMDCs. a- Se preincubaron BMDCs 30 minutos con medio de incubación solamente o 3α -aminocolestano 20 μ M. Luego se estimularon con pLL (10 μ g), en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL y se prepararon extractos celulares totales a 80 minutos. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-P-Akt Ser473. Se utilizó como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. b- Se preincubaron BMDCs 30 minutos con EtOH (vehículo) o 3α -aminocolestano 20 μ M. Luego se estimularon con 10 μ g de pLL, en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativa; para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar la diferencia estadística entre BMDCs estimuladas de la misma manera pero preincubadas con 3α -aminocolestano respecto al tratamiento con vehículo solamente.

Además, se realizó un experimento con BMDCs derivadas de ratones SHIP1^{-/-}, preparadas y analizadas en paralelo con BMDCs obtenidas de ratones tipo silvestre. Ambas producciones de BMDCs se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 18 horas, y se cuantificó la producción de IL-10 e IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Las BMDCs SHIP1^{-/-} presentaron menor expresión de IL-10, IL-12p70, CD40 y CD86 que las tipo silvestre en presencia de LPS, lo cual coincide con datos publicados previamente (145). Esto sigue la misma tendencia observada en presencia de 3 α -aminocolestano, pero a un grado bastante menor, sugiriendo al igual que los resultados anteriores, que parte de los efectos del inhibidor son genuinos y parte son “*off-target*”. Con respecto a los efectos de pLL (Figura 4.30), las BMDCs SHIP1^{-/-} no presentan potenciación de IL-10 ni inhibición de IL-12p70 inducida por pLL en presencia de LPS. Sin embargo, sí presentan inhibición estadísticamente significativa en la expresión de CD40 en presencia de LPS. Para el caso de CD86, se observa que las BMDCs SHIP1^{-/-} no presentan inducción estadísticamente significativa de CD86 por pLL *per se*, ni potenciación estadísticamente significativa de la expresión de CD86 por pLL en presencia de LPS. Cabe señalar que no fue posible obtener resultados sobre la fosforilación de Akt en este ensayo.

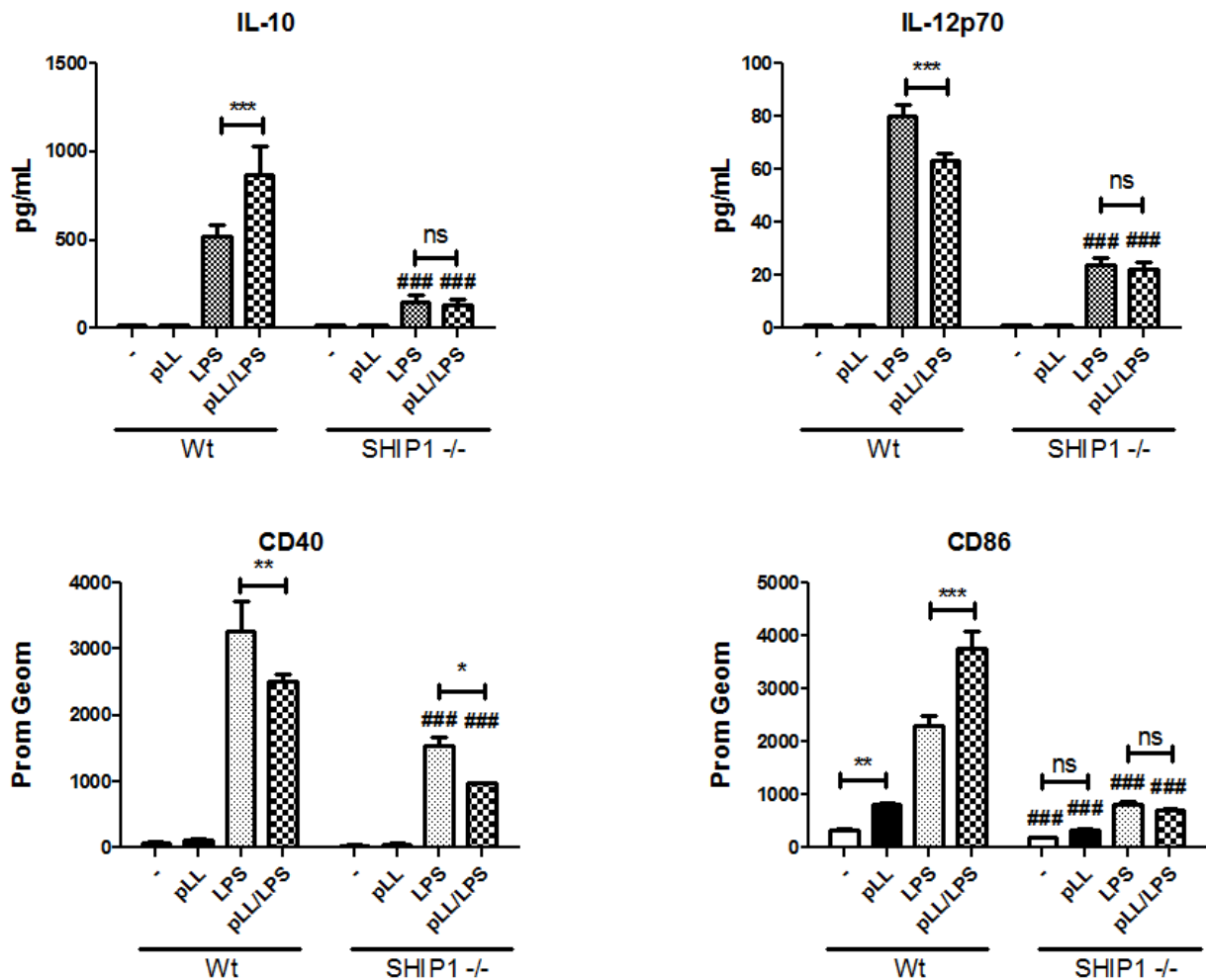


Figura 4.30. Comparación del efecto de pLL sobre BMDCs derivadas de ratones *Wild type* y *SHIP1*^{-/-}. Se estimularon BMDCs derivadas de ratones *Wild type* (Wt) o ratones *SHIP1*^{-/-} con pLL (10µg) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, P < 0.001; **, P < 0.01; * P < 0.05; ns. no significativo, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, P < 0.001; ##, P < 0.01; #, P < 0.05, para indicar la estadística entre BMDCs estimuladas de la misma manera pero derivadas de ratones *SHIP1*^{-/-} respecto a ratones tipo silvestre.

Dada la imposibilidad práctica de obtener repeticiones para el ensayo con células SHIP1 $-/-$, no es posible obtener conclusiones definitivas sobre la importancia de SHIP1 en la respuesta de BMDCs a pLL. Sin embargo, los resultados muestran que la inhibición de la expresión de CD40 es el único efecto de pLL que no se anuló en BMDCs SHIP1 $-/-$, lo cual sugiere que SHIP1 es necesario para los efectos sobre IL-10, IL-12 y CD86.

Luego se exploró la relevancia de la inhibición Akt en el fenotipo de BMDCs inducido por pLL. Para esto primero se evaluó si el material pLL-DTT, el cual tiene una actividad claramente menor que pLL sobre BMDCs (Figura 4.15), era capaz de inhibir la fosforilación de Akt en presencia de LPS. Se estimularon BMDCs con medio de incubación solamente, LPS, pLL más LPS, o pLL-DTT más LPS durante 80 minutos, se prepararon extractos totales y por *western blot* se analizó el estado de fosforilación de Akt. Como se observa en los resultados (Figura 4.31), la fosforilación de Akt en presencia de LPS fue inhibida por pLL pero no por el material pLL-DTT. Este resultado genera un posible vínculo entre la actividad de pLL sobre IL-10, IL-12p70, CD40 y CD86, y la capacidad de inhibir la fosforilación de Akt.

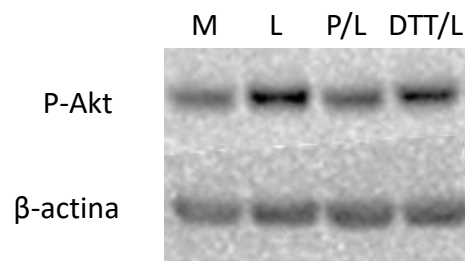


Figura 4.31. Evaluación de la fosforilación de Akt (Ser473) en BMDCs estimuladas con pLL-DTT en presencia de LPS. Se estimularon BMDCs con medio de incubación (M) solamente, LPS (L), pLL mas LPS (P/L) y pLL-DTT más LPS durante 80 minutos. Luego se prepararon extractos celulares totales y se analizaron por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos anti-P-Akt Ser473. Se utilizó como control de carga β -actina. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes.

A continuación, se estudió la actividad de pLL en presencia de dos inhibidores de Akt, triciribina y Akt VIII. Se comprobó que en nuestras condiciones la triciribina inhibe la fosforilación de Akt. Para esto, se preincubaron BMDCs con medio de incubación solamente o triciribina, se estimularon durante 80 minutos con LPS, y se analizó por *western blot* el estado de fosforilación de Akt. Como se observa en los resultados (Figura 4.32a), la fosforilación de Akt fue parcialmente inhibida por triciribina a la dosis de 1.5 μ M. Cabe señalar, que el metabolito activo de la triciribina se une al dominio PH (del inglés, *pleckstrin homology*) de Akt (234). De esta manera, impide el reclutamiento a membrana de Akt (necesario para su fosforilación y activación), y no su actividad quinasa en sí (235). Verificada la actividad de esta concentración del inhibidor, se estudió cómo afectaba al fenotipo de BMDCs incubadas con nuestros estímulos. Se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) solamente o triciribina 1.5 μ M durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS, y a las 18 horas se cuantificó la producción de IL-10 e IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como se observa en los resultados (Figura 4.32b), las BMDCs preincubadas con triciribina 1.5 μ M expresaron niveles significativamente menores de CD40 en presencia de LPS, y significativamente mayores de CD86 para todas las condiciones respecto a BMDCs preincubadas con DMSO. Además, el inhibidor disminuyó la respuesta en IL-10 (en concordancia de lo esperado para un inhibidor de la vía de PI3K/Akt (225)). En términos de la respuesta a pLL, las BMDCs incubadas con el inhibidor mantuvieron la potenciación estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 inducida en respuesta a LPS, y las inhibiciones significativas en la expresión de IL-12p70 y de CD40 inducidas en presencia de LPS. En cambio, si bien se observan tendencias a una mayor expresión de CD86 en presencia de pLL tanto en ausencia como en presencia de LPS, éstas no fueron estadísticamente significativas en presencia del inhibidor. Cabe mencionar que la triciribina a 1.5 μ M tuvo efectos en la misma dirección que pLL para las moléculas de coestimulación, aunque no fue capaz de inhibir la expresión de CD40 inducida por LPS en igual magnitud que pLL. Como la concentración 1.5 μ M del inhibidor únicamente dio lugar a una inhibición parcial de la fosforilación de Akt, se probó una dosis más elevada del inhibidor, 10 μ M. Como se observa en los resultados (Figura 4.33a), la fosforilación de Akt fue casi totalmente inhibida por triciribina a esta dosis mayor. Luego, se estudió cómo afectaba el inhibidor a esta dosis al fenotipo de BMDCs incubadas con nuestros estímulos. Como se observa en los resultados (Figura 4.33b), las BMDCs preincubadas con una mayor

dosis de tricitiribina nuevamente expresaron niveles significativamente menores de CD40 en presencia de LPS, y significativamente mayores de CD86 para todas las condiciones, respecto a BMDCs preincubadas con DMSO. Además, las BMDCs incubadas con el inhibidor a esta dosis no mostraron (o fue muy baja) producción de IL-12p70. En términos de la respuesta a pLL, las BMDCs incubadas con el inhibidor mantuvieron la potenciación estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 inducida en respuesta a LPS, aunque los valores absolutos, al igual que con la dosis más baja del inhibidor, fueron más pequeños que en ausencia del mismo. Además, se observó una expresión significativamente mayor de CD86 tanto en ausencia como en presencia de LPS. Nuevamente, a esta nueva dosis, la tricitiribina dio efectos en la misma dirección que pLL para las moléculas de coestimulación. Es importante destacar que a la dosis alta del inhibidor, el nivel de inhibición de CD40 es similar al alcanzado con pLL, y contrariamente a lo observado para la dosis baja, el inhibidor y pLL actúan sobre CD40 como estímulos redundantes (en lugar de aditivos). Estas observaciones nuevamente sugieren una relación entre la inhibición de la fosforilación de Akt por pLL y la inhibición de la inducción de CD40 en presencia de LPS.

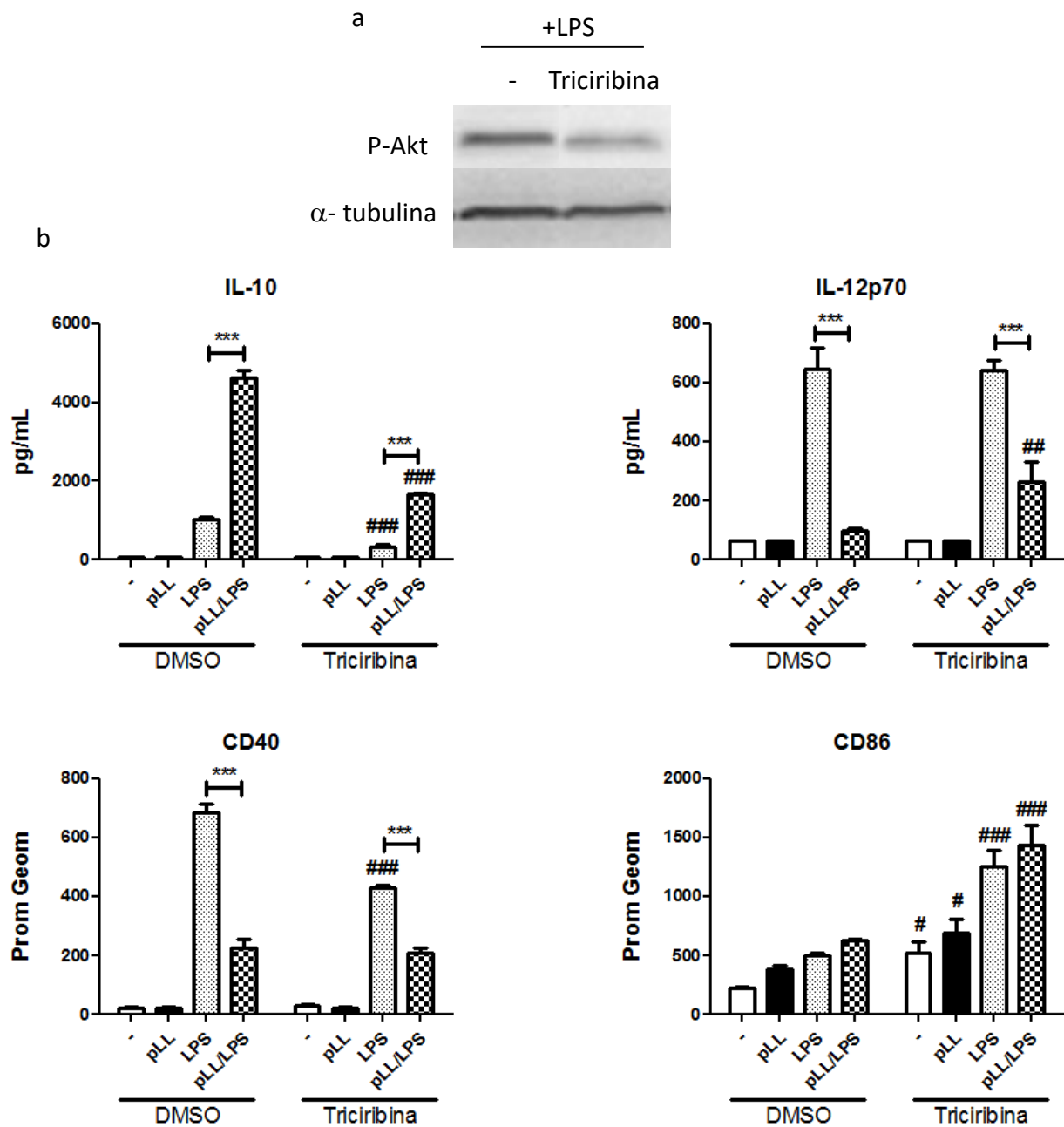


Figura 4.32. Efecto del inhibidor triciribina a concentración 1.5 μ M sobre la actividad de pLL en BMDCs. a- Se preincubaron BMDCs 30 minutos con medio de incubación solamente o triciribina 1.5 μ M. Se estimularon con LPS y se prepararon extractos celulares totales a 80 minutos. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-P-Akt Ser473. Se utilizó como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes. b- Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con triciribina 1.5 μ M, y DMSO (vehículo) solamente. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar la diferencia estadística entre BMDCs estimuladas de la misma manera pero preincubadas con triciribina respecto al tratamiento con el vehículo solamente.

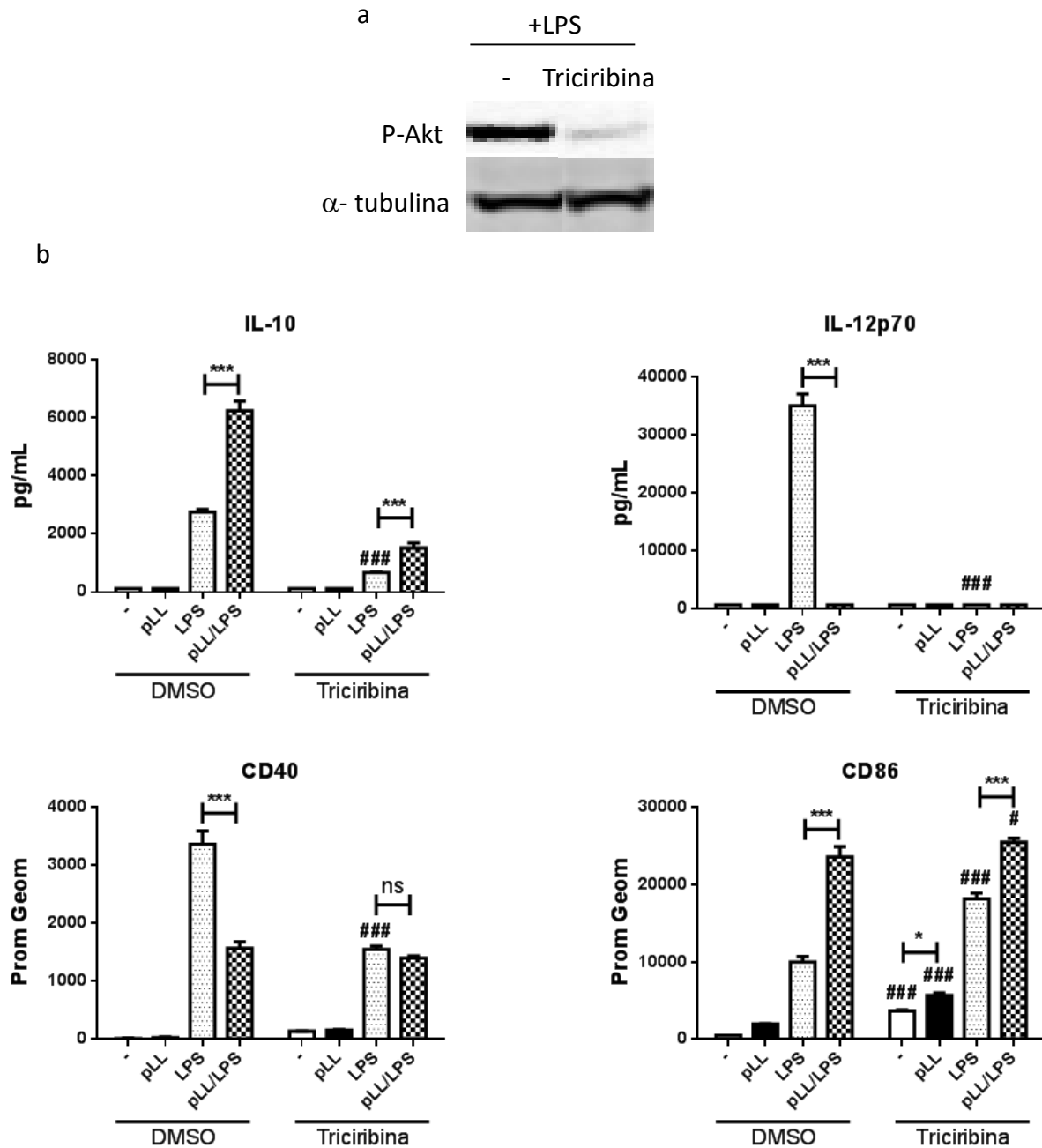


Figura 4.33. Efecto del inhibidor Triciribina a 10 μ M sobre la actividad de pLL en BMDCs. a- Se preincubaron BMDCs 30 minutos con medio de incubaci3n solamente o triciribina 10 μ M. Se estimularon con LPS y se prepararon extractos celulares totales a 80 minutos. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos espec3ficos anti-P-Akt Ser473. Se utiliz3 como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. b- Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con triciribina 10 μ M, y DMSO (veh3culo) solamente. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantific3 la concentraci3n de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante por ELISA, y la expresi3n de CD40 y CD86 por citometr3a a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviaci3n est3ndar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, P < 0.001; **, P < 0.01; * P < 0.05; ns, no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Adem3s, se utiliza: ###, P < 0.001; ##, P < 0.01; #, P < 0.05, para indicar la diferencia estadística entre BMDCs estimuladas de la misma manera pero preincubadas con triciribina respecto al tratamiento con el veh3culo solamente.

Para el inhibidor Akt VIII, primero se verificó que en nuestras condiciones inhibiera la fosforilación de Akt. Al igual que la triciribina, el inhibidor Akt VIII impide el reclutamiento a membrana de Akt mediante la unión al dominio PH de Akt (236). Se preincubaron BMDCs con medio de incubación solamente o Akt VIII, se estimularon durante 80 minutos con LPS, y se analizó por *western blot* el estado de fosforilación de Akt. Como se observa en los resultados (Figura 4.34a), la fosforilación de Akt fue totalmente inhibida por Akt VIII. Verificada la actividad del inhibidor, se estudió como éste afectaba al fenotipo de BMDCs incubadas con nuestros estímulos. Se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) solamente o con Akt VIII durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación, pLL, LPS o pLL más LPS y a las 18 horas se cuantificó la producción de IL-10 e IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como se observa en los resultados (Figura 4.34b), en términos de las respuestas al LPS, el inhibidor disminuyó la producción de IL-10 y potenció la de IL-12p70, lo cual concuerda con lo esperado para un inhibidor de la vía de PI3K/Akt (225). En términos de la respuesta a pLL, las BMDCs preincubadas con Akt VIII mantuvieron la potenciación estadísticamente significativa en la expresión de IL-10 en presencia de LPS. Sin embargo, las BMDCs preincubadas con Akt VIII no presentaron inhibición en la producción de IL-12p70 ni en la expresión de CD40 inducidas por LPS. Para CD86, en presencia del inhibidor se perdió el aumento del marcador en respuesta a pLL *per se*, pero se mantuvo la potenciación, estadísticamente significativa, de la expresión del marcador en presencia de LPS. Además, las BMDCs preincubadas con el inhibidor Akt VIII presentaron una expresión significativamente menor de CD40 respecto a BMDCs preincubadas con DMSO solamente en presencia de LPS. Al comparar los efectos del inhibidor Akt VIII con los de pLL, únicamente aquellos sobre la expresión de CD40 tuvieron la misma dirección, como se esperaría si pLL ejerce efectos a través de inhibir la actividad de Akt.

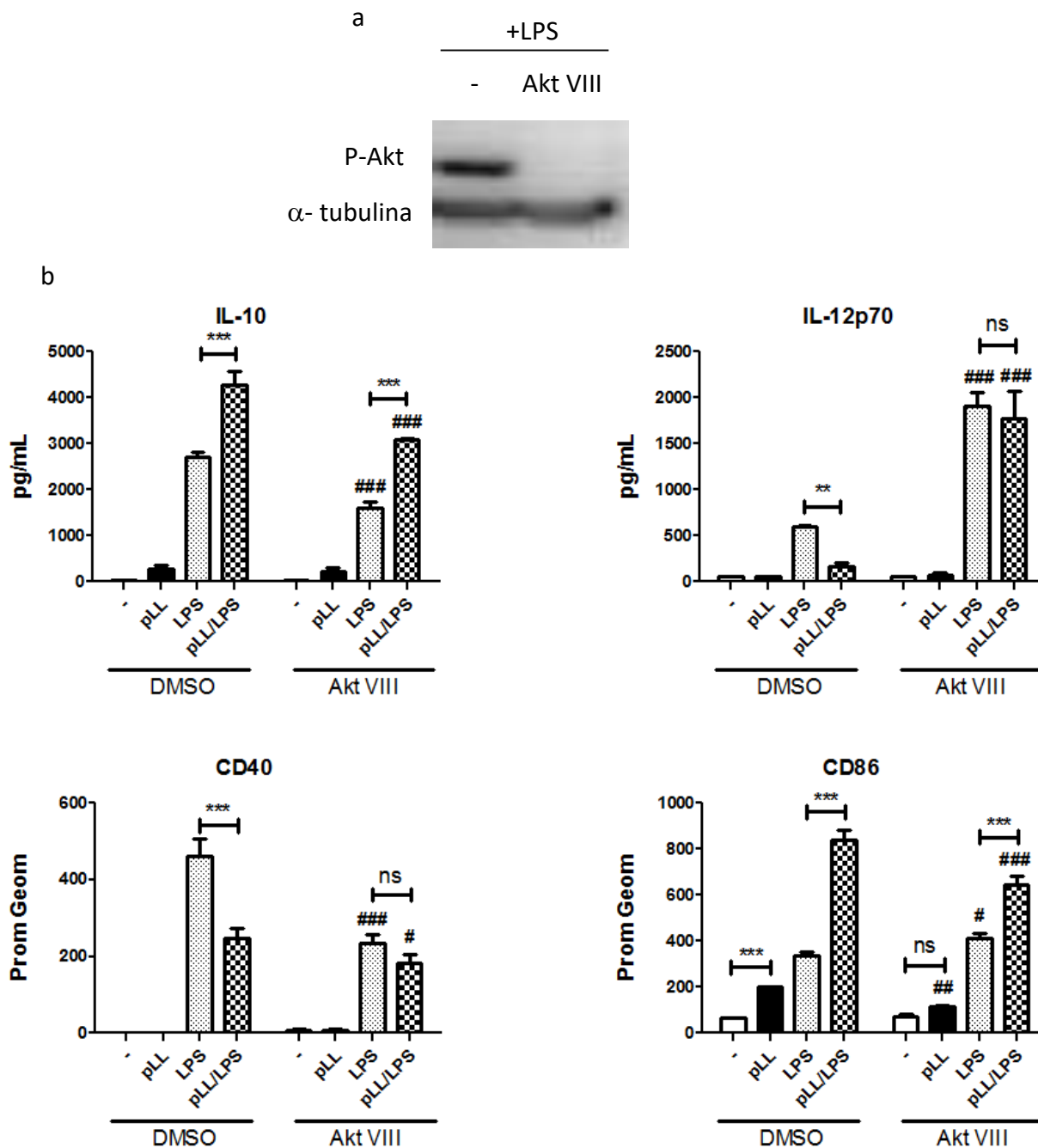


Figura 4.34. Efecto del inhibidor Akt VIII sobre la actividad de pLL en BMDCs. a- Se preincubaron BMDCs 30 minutos con medio de incubación solamente o Akt VIII 10 μ M. Se estimularon con LPS y se prepararon extractos celulares totales a 80 minutos. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-P-Akt Ser473. Se utilizó como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 2 experimentos independientes. b- Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con Akt VIII 10 μ M o DMSO (vehículo) solamente. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante por ensayos de ELISAs, y la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar diferencias entre BMDCs estimuladas de igual manera pero preincubadas con Akt VIII respecto al tratamiento con el vehículo solamente.

Se estudió la participación de una vía alternativa de fosforilación de Akt propuesta para BMDCs, mediada por las quinasas relacionadas a IKKs, TBK1 e IKK ϵ (140, 143). Primero se evaluó el estado de fosforilación de TBK1 en la posición Ser172. Para esto, se realizó una cinética (5, 15 y 30 minutos), de extractos totales de BMDCs condicionadas con o sin pLL, en ausencia y presencia de LPS. Luego se evaluó el estado de fosforilación de IKK ϵ en la posición Ser172. Se realizó una cinética (30, 60 y 120 minutos), de extractos totales de BMDCs condicionadas con o sin pLL, en ausencia y presencia de LPS. Como muestran los resultados (Figuras 4.35a y 4.35b), las BMDCs estimuladas con medio de incubación o pLL solamente no presentan fosforilación de TBK1 o IKK ϵ durante ninguno de los tiempos estudiados. Por otra parte, las BMDCs estimuladas con LPS presentan un aumento en el nivel de fosforilación de TBK1 e IKK ϵ que no cambia al coestimular con pLL. Estos resultados sugieren que pLL no genera cambios en la activación de estas quinasas, tanto en ausencia como en presencia de LPS.

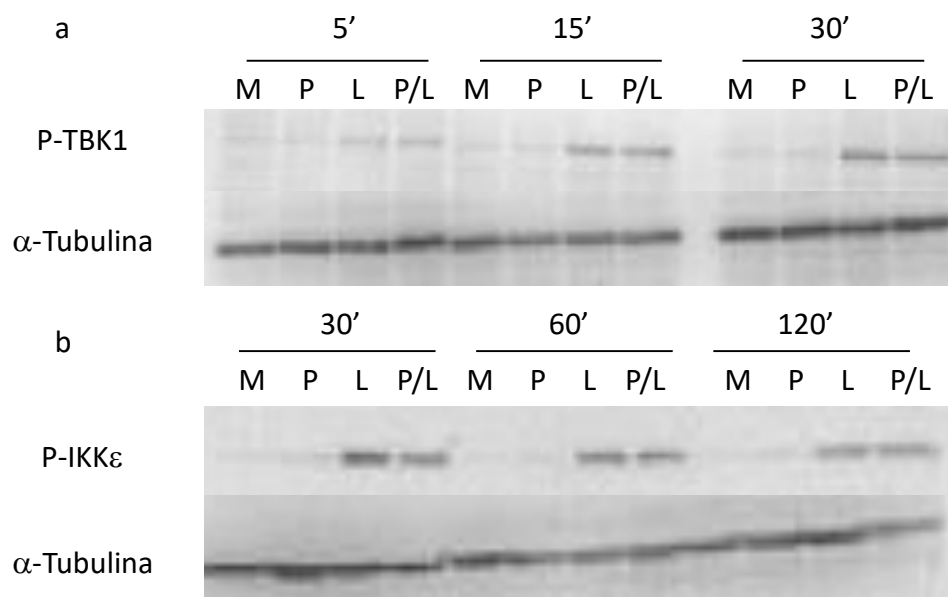


Figura 4.35. Estudio del efecto de BMDCs estimuladas con pLL sobre las quinasas relacionadas a IKKs, TBK1 y IKK ϵ . Se estimularon BMDCs con medio de incubación (M), 10 μ g de pLL (P), LPS 10 ng/mL (L) y pLL más LPS (P/L). Se prepararon extractos celulares totales de BMDCs estimuladas con los diferentes estímulos a: 5, 15 y 30 minutos para el estudio de la fosforilación de TBK1 (a); y 30, 60 y 120 minutos para el estudio de la fosforilación de IKK ϵ (b). Se analizaron los extractos por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos anti P-TBK1/NAK Ser172 y P-IKK ϵ Ser172. Se estudió la fosforilación de la proteína TBK1 (a), y la fosforilación de la proteína IKK ϵ (b), utilizándose como control de carga α -tubulina. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

Además, se estudiaron los efectos de pLL sobre BMDCs en presencia de un inhibidor de TBK1 e IKK ϵ , amlexanox. Se comprobó primero que en nuestras condiciones el amlexanox inhibía la fosforilación de Akt. Para esto, se preincubaron BMDCs con medio de incubación solamente o amlexanox durante 80 minutos con LPS y por *western blot* se analizó el estado de fosforilación de Akt. Como se observa en los resultados (Figura 4.36a), la fosforilación de Akt fue totalmente inhibida por Amlexanox a la concentración utilizada. Verificada la actividad del inhibidor, se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) solamente o amlexanox durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación, pLL, LPS o pLL más LPS y a las 18 horas se cuantificó la producción de IL-10 e IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como se observa en los resultados (Figura 4.36b) en términos de la respuesta a LPS las BMDCs preincubadas con amlexanox presentaron una expresión significativamente menor de IL-10 y CD40, y una expresión significativamente mayor de CD86 respecto al vehículo. Para IL-10, esto es en principio esperado para una droga que indirectamente inhibe la activación de Akt. En términos de la respuesta a pLL, las BMDCs preincubadas con amlexanox mantuvieron la potenciación, estadísticamente significativa, en la expresión de IL-10 en presencia de LPS. Sin embargo, las BMDCs preincubadas con el inhibidor no presentaron inhibición por pLL ni de IL-12p70, ni de CD40 en presencia de LPS. Para CD86, las BMDCs tratadas con amlexanox mantuvieron la inducción significativa de CD86, y la potenciación significativa de la expresión de CD86 en presencia de LPS. Así, los resultados indican que la preincubación de BMDCs con amlexanox inhibió totalmente la fosforilación de Akt en presencia de LPS, e inhibió la expresión de CD40 inducida por LPS, en forma similar a lo que ocurre con pLL. Además, el inhibidor no afectó la actividad de pLL sobre IL-10, ni CD86, mientras que si lo hizo para la IL-12p70.

En conjunto estos datos indican que la pérdida de actividad de pLL inducida por el tratamiento con DTT/IAA está acompañada de la pérdida de la actividad de inhibición de la fosforilación de Akt en presencia de LPS. Por otra parte, los experimentos con inhibidores de la fosforilación de Akt sugieren que pLL podría causar inhibición de la expresión de CD40 a través de la inhibición de la fosforilación de Akt. Además, los resultados con estos inhibidores sugieren que la potenciación en la expresión en IL-10 inducida por pLL no depende de efectos sobre Akt. Por último, se concluye que la vía alternativa de fosforilación

de Akt mediada por las quinasas TBK1 e IKK ϵ no se encuentra alterada ni participa en el condicionamiento de BMDCs con pLL.

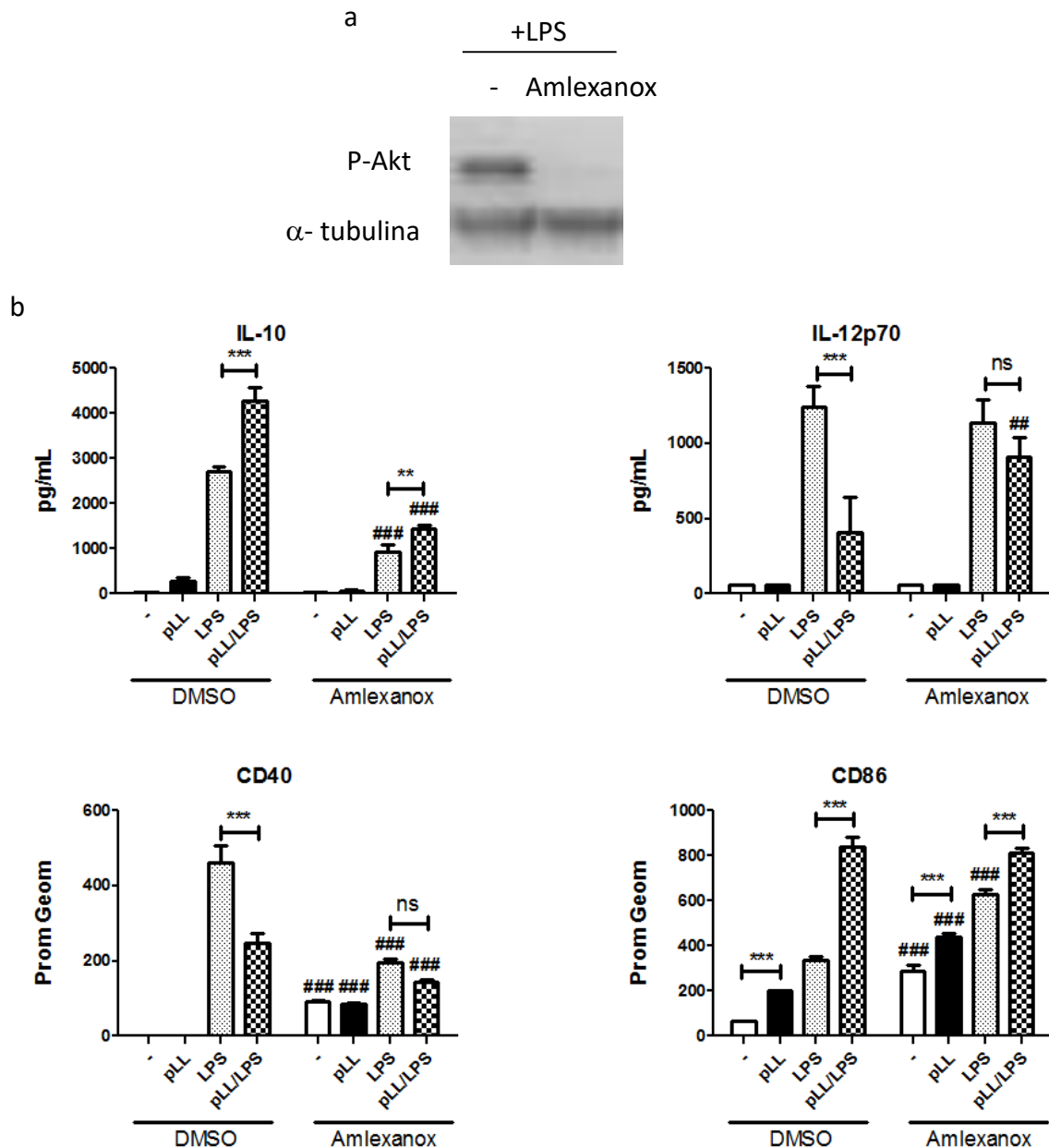


Figura 4.36. Efecto del inhibidor amlexanox sobre la actividad de pLL en BMDCs. a- Se preincubaron BMDCs 30 minutos con medio de incubación solamente o amlexanox 200 μ M. Se estimularon con LPS y se prepararon extractos celulares totales a 80 minutos. Se analizaron los extractos por Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-P-Akt Ser473. Se utilizó como control de carga α -tubulina. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes. b- Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con amlexanox 200 μ M o DMSO (vehículo) solamente. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar diferencias significativas entre BMDCs estimuladas de igual manera pero preincubadas con amlexanox respecto al tratamiento con el vehículo solamente.

Para analizar si la estimulación con pLL, efectivamente causa inhibición en la actividad de Akt en células estimuladas con LPS, se estudiaron dos blancos de Akt de relevancia inmunológica, mTORC1 y GSK-3. Para evaluar si mTORC1 variaba su actividad, se estudió la fosforilación de uno de sus blancos, p70S6K. Se estimularon BMDCs con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 150 minutos, y se analizó por *western blot* sobre extractos totales el estado de fosforilación de p70S6K en la posición Thr389. Como se observa en los resultados (Figura 4.37), el aumento en la fosforilación de p70S6K inducido por LPS fue inhibido por pLL.

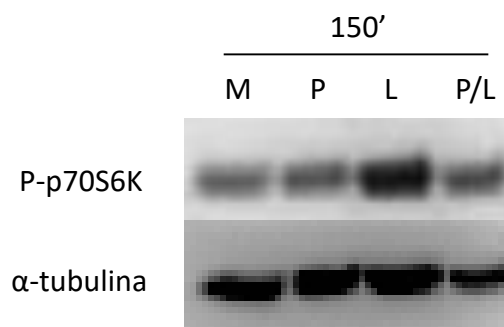


Figura 4.37. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de p70S6K. Se estimularon BMDCs con medio de incubación (M) solamente, 10 μ g de pLL (P), LPS 10 ng/mL (L) y pLL (10 μ g) más LPS 10 ng/mL (P/L). Se prepararon extractos celulares totales a los 150 minutos de BMDCs estimuladas con los diferentes estímulos. Se analizaron los extractos por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos anti-P-p70S6K en la posición Thr389. Se utilizó como control de carga α -tubulina. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Dado el resultado anterior, se estudió si alteraciones en la actividad de mTORC1 podían participar en los efectos de pLL sobre BMDCs. Para ello se emplearon dos inhibidores de mTORC1, rapamicina y torin1. Se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) solamente, rapamicina o torin1 durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación, pLL, LPS o pLL más LPS durante 18 horas, y se cuantificó la producción de IL-10, IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como se observa en los resultados (Figura 4.38), en términos de la respuesta a LPS las BMDCs preincubadas con los inhibidores produjeron significativamente, menos IL-10 y significativamente más IL-12p70, lo cual concuerda con datos ya publicados (166). En términos de la respuesta a pLL, las células preincubadas con los inhibidores mantuvieron todos los efectos de pLL sobre IL-10, IL-12, CD40 y CD86, en ausencia como en presencia de LPS.

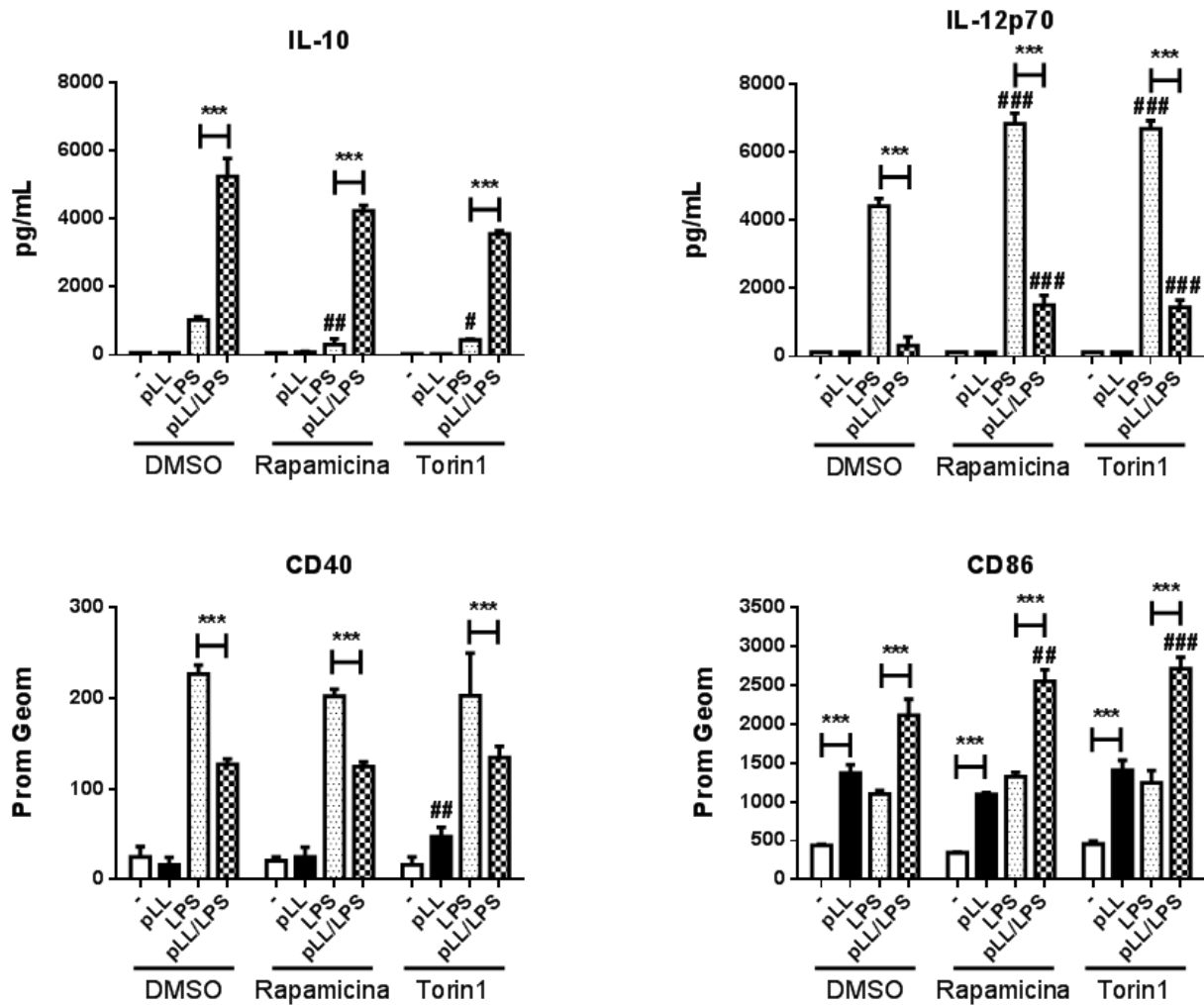


Figura 4.38. Efecto de la inhibición de mTORC1 sobre la actividad de pLL en BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con Rapamicina 10 nM, Torin1 10 nM, o DMSO (vehículo) solamente. Luego se estimularon con 10 μ g de pLL en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISAs. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar diferencias estadísticas respecto a BMDCs tratadas con el vehículo solamente.

Para el otro blanco estudiado de Akt, GSK-3, se estudió la fosforilación (inhibitoria) en la posición Ser21/9 (de GSK-3 α/β , respectivamente). Para esto, se estimularon BMDCs con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS durante 120 minutos, y por *western blot* se estudió el estado de fosforilación de GSK-3. Como se observa en los resultados (Figura 4.39), la fosforilación de GSK-3 α/β Ser21/9 en presencia de LPS fue inhibida por pLL. Este resultado, junto con el obtenido para P-p70S6K Thr389, indica que la actividad de Akt en BMDCs estimuladas con LPS es inhibida por la coestimulación con pLL.

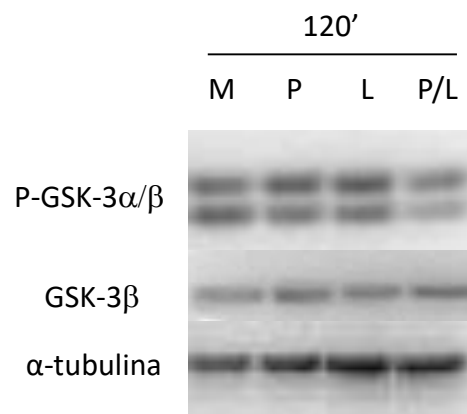


Figura 4.39. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de GSK3. Se estimularon BMDCs con medio de incubación (M) solamente, pLL 10 μ g (P), LPS 10 ng/mL (L) o pLL (10 μ g) más LPS 10 ng/mL (P/L). Se prepararon extractos celulares totales a los 120 minutos, y se analizaron por *Western blot* con anticuerpos específicos contra P-GSK3 α/β (Ser21/9), GSK3 β , y α -tubulina (control de carga). Los resultados para P-GSK3 α/β (Ser21/9) son representativos de 3 experimentos independientes, mientras que el resultado para GSK3 β total es representativo de 2 experimentos independientes.

Por último en esta sección se estudió el comportamiento de BMDCs en presencia del inhibidor de GSK-3, SB216763. Se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) solamente o SB216763 durante 30 minutos, luego se estimularon con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS, y a las 18 horas se cuantificó la producción de IL-10 e IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como se observa en los resultados (Figura 4.40), las BMDCs tratadas con el inhibidor expresan niveles significativamente mayores de CD40 y de CD86, lo cual concuerda con datos publicados (162). Además, en términos de la respuesta a LPS, las BMDCs preincubadas con el inhibidor presentaron una producción, significativamente mayor de IL-10 y significativamente menor de IL-12p70, lo cual también concuerda con datos publicados, obtenidos en monocitos (165, 169). En conjunto estos datos indican que

el inhibidor es activo a la concentración utilizada. En términos de la respuesta a pLL, las BMDCs preincubadas con SB216763 mantuvieron la potenciación significativa en la expresión de IL-10 en presencia de LPS, la inducción estadísticamente significativa de CD86 inducida por pLL *per se*, y la potenciación significativa de la expresión de CD86 en presencia de LPS. Las BMDCs preincubadas con el inhibidor no expresan IL12p70 en respuesta a LPS, por lo cual no es posible determinar que ocurre con el efecto de pLL sobre esta citoquina. Además, las BMDCs tratadas con SB216763 no presentaron inhibición de la expresión de CD40 en BMDCs estimuladas con pLL en presencia o ausencia de LPS. Este resultado es muy importante ya que implica directamente a la actividad de GSK-3 en la capacidad de pLL de inhibir la expresión de CD40, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con los inhibidores de Akt y PI3K de clase I.

En conjunto estos resultados indican que la incubación con pLL inhibe la activación de mTORC1, y causa disminución en la fosforilación inhibitoria de GSK-3 inducida por LPS. Ambos efectos en términos de IL-10 e IL-12p70 se espera que influyan en dirección opuesta a los efectos observados de pLL. Por otra parte, los resultados con inhibidores de mTORC1 indican que el sesgo fenotípico inducido por pLL no depende de alteraciones a nivel de mTORC1, ya que los efectos de pLL se mantienen en presencia de los inhibidores, lo que es coherente con lo anterior. Además, el inhibidor de GSK-3 en términos de IL-10 y CD86, induce una respuesta opuesta a lo esperado en relación a los efectos de pLL. En efecto, pLL disminuye la fosforilación inhibitoria de esta quinasa, y sin embargo influye sobre IL-10 y CD86 en la misma dirección que el inhibidor de la quinasa. Esto sugiere que la actividad de pLL sobre IL-10 y CD86 no involucra cambios en GSK-3. Por otra parte, en términos de CD40 el inhibidor sigue la misma dirección de los resultados obtenidos con pLL, a menor actividad de GSK-3 mayor expresión de CD40. Además, se observó que en presencia del inhibidor pLL no induce inhibición de la expresión de CD40 al estimular con o sin LPS, lo cual acompaña la idea de que pLL inhibe la expresión de CD40 al disminuir la fosforilación inhibitoria de GSK-3, a través de la inhibición de la actividad de Akt.

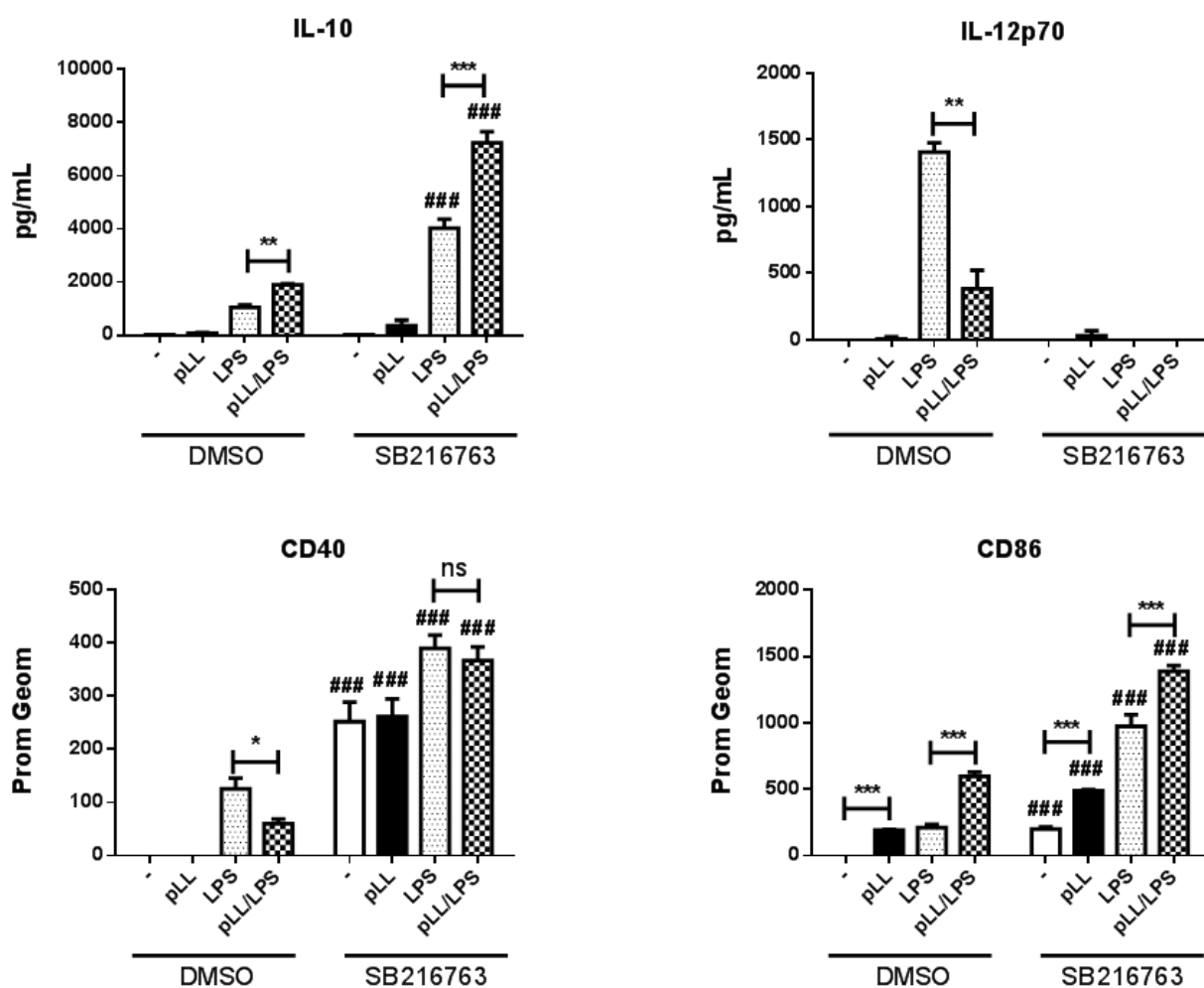


Figura 4.40. Efecto del inhibidor SB216763 sobre la actividad de pLL en BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con SB216763 10 μ M o DMSO (vehículo) solamente. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 (límite de detección 250 pg/mL) en el sobrenadante por ELISA, y se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ####, $P < 0.001$; ###, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar diferencias significativas entre BMDCs estimuladas de igual manera pero preincubadas con SB216763 respecto al tratamiento con el vehículo solamente.

4.6 Exploración de la forma de interacción y el mecanismo que gatilla la respuesta a pLL en BMDCs

Resultados de nuestro grupo han demostrado que pLL necesita de contacto con las BMDCs para tener actividad (103). Además, resultados de esta tesis muestran que el inhibidor de la remodelación de los filamentos de actina, citocalasina D, inhibe la actividad de pLL (Figura 4.10), y que otro tanto hacen la wortmanina y el GDC-0941, ambos inhibidores de PI3K clase I y por lo tanto inhibidores de la fagocitosis. En conjunto estos experimentos nos indican que la actividad de pLL requiere contacto entre las partículas y las BMDCs, remodelación del citoesqueleto, y PI3K de clase I activas. A partir de esto, se evaluó si pLL era fagocitado por BMDCs. Para esto, se incubaron BMDCs con medio de incubación solamente o con pLL conjugado a FITC (pLL-FITC) durante 90 minutos a 37°C y se evaluó la fagocitosis por microscopía de fluorescencia. Como se muestra en los resultados (Figura 4.41), no se observa incorporación de marca por las células en comparación con células incubadas en ausencia de pLL-FITC. Este resultado sugiere primariamente que no hay un nivel significativo de fagocitosis de pLL por BMDCs, lo cual concuerda con que la mayor parte de las partículas en las preparaciones de pLL presentan tamaños no fagocitables.

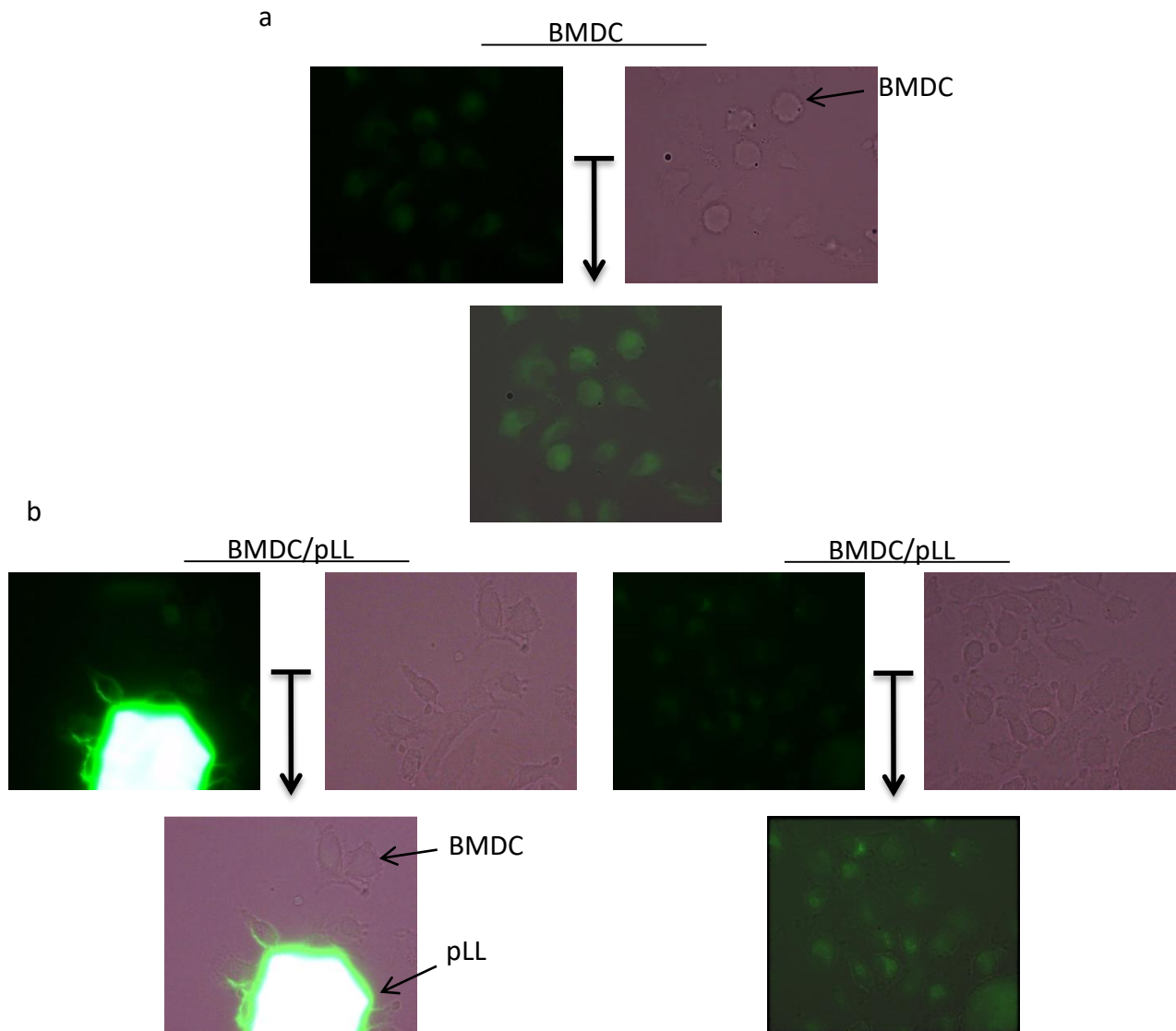


Figura 4.41. BMDCs incubadas con pLL-FITC. Imágenes de microscopía de fluorescencia, campo claro y *merge* de ambas imágenes, de BMDCs incubadas 90 minutos a 37°C con medio de incubación (a) o con pLL conjugado a FITC (b y c). En (c) se muestra un campo en el que hay una partícula de pLL-FITC.

La fagocitosis requiere de la actividad de PI3K de clase I. Dado que pLL inhibe a la vía de PI3K/Akt y que no se observó un nivel significativo de fagocitosis de pLL-FITC, se decidió explorar si pLL inhibe la fagocitosis en general. Para esto se incubaron BMDCs durante 1 hora a 4°C o 37°C con medio de incubación o pLL, y luego se agregaron microesferas (Ms) de tamaño fagocitable (5.24 μ M), marcadas internamente con el fluoróforo *Flash red*, durante 1 hora más. Luego se estudió el porcentaje de BMDCs que habían incorporado una o más microesferas en las diferentes condiciones. Como muestran los resultados (Figura 4.42a y 4.42b) las BMDCs incorporaron marca, y esta incorporación fue significativamente mayor (tanto en % de células positivas para la marca como en el número de Ms incorporadas) a 37°C que a 4°C, indicando un componente de internalización. Este dato es respaldado por observaciones al microscopio de campo claro que muestran que la mayoría de la BMDCs presentan fagocitosis de microesferas a 37°C, y en cambio se observa muy poca o nula fagocitosis a 4°C (datos no mostrados). En suma, la incorporación de marca en BMDCs incubadas con microesferas a 37°C es indicativa de fagocitosis. Al preincubar BMDCs con pLL, y luego con microesferas a 37°C, no se observan diferencias en la incorporación de marca respecto a células preincubadas en medio solamente. Así, los resultados indican que si bien pLL inhibe la vía de PI3K/Akt, no inhibe en forma general la fagocitosis en BMDCs.

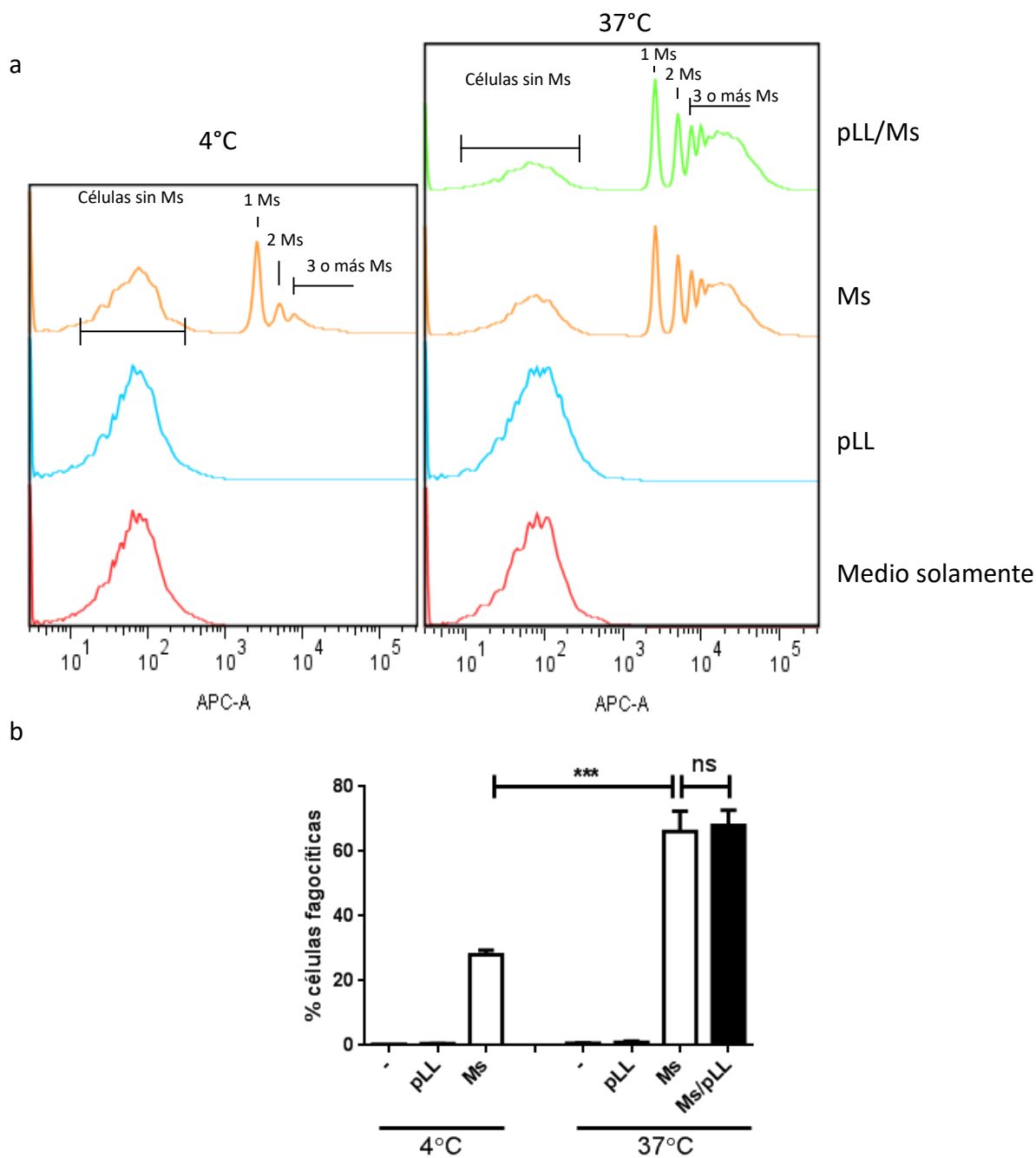


Figura 4.42. Estudio de la capacidad de fagocitosis en BMDCs. Se incubaron BMDCs con medio de incubación solamente o con pLL durante 1 hora, a 4°C o a 37°C. Luego se agregaron medio de incubación solamente o microesferas (Ms) fluorescentes durante 1 hora, a 4°C o a 37°C, y se analizó por citometría de flujo. a- Histogramas de fluorescencia. b- Porcentajes de BMDCs que fagocitaron una o más Ms. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos duplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intraexperimentos: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, no significativa.

La búsqueda de agonistas glucídicos y/o proteicos en pLL que pudiesen interactuar con receptores específicos en las BMDCs u otras células del sistema inmune innato no arrojó candidatos evidentes (ver sección 4.3). Esto nos llevó a considerar a nivel de hipótesis la posibilidad que la actividad de pLL sea independiente de receptor. La hipótesis a su vez está basada en estudios publicados que indican que las células dendríticas son capaces de activarse en presencia de diversos materiales particulados, entre ellos alúmina y cristales de urato monosódico (CUM), de manera independiente de receptor (237–239). Se ha propuesto que propiedades fisicoquímicas de estos materiales particulados incluyendo su rigidez y polaridad, los hacen capaces de activar a células dendríticas por interacciones con cabezas polares de lípidos de la membrana plasmática. Sabemos que pLL presenta una superficie rica en carbohidratos, por lo tanto polar y concebiblemente capaz de interactuar con cabezas polares de lípidos de membrana. Además, tratamientos de pLL con pronasa y DTT/IAA, que facilitan la disgregación por sonicación (26), inducen pérdida parcial de la actividad (Figuras 4.14 y 4.15), lo cual sugiere que el grado de rigidez del material incide sobre su actividad. Por otra parte, la estimulación de BMDCs con los materiales mencionados (alúmina y CUM) activa el inflammasoma NLRP3, así como induce la expresión de CD86 (238, 239). La exposición a pLL también induce la activación del inflammasoma NLRP3 (datos no publicados; obtenidos por la Dra. Cecilia Casaravilla), así como induce la expresión de CD86. Para el caso de la alúmina, incluso se ha reportado que la inducción de la expresión de CD86 es inhibida por inhibidores de PI3K y del reordenamiento de los filamentos de actina, en forma similar a lo observado para pLL (Figuras 4.10, 4.23 y 4.27) (239). En suma, se observan varias similitudes entre los materiales particulados mencionados capaces de activar BMDCs de manera independiente de receptores y pLL.

Los estudios ya mencionados sobre interacción de DCs con alúmina y CUM indican que existe interacción en particular con cabezas polares de colesterol y esfingomielina, que da lugar a una reorganización de las balsas lipídicas (en inglés, *lipid rafts*), que a su vez induce el agrupamiento de receptores que contienen dominios ITAM y reclutamiento de la quinasa Syk, y de PI3K (238, 239). Por lo antes mencionado, concebimos la hipótesis que pLL podría interactuar con BMDCs a nivel de membrana plasmática y de forma independiente de receptores, gatillando una respuesta dependiente de la activación de Syk, PI3K y

reordenamiento del citoesqueleto. Para explorar esta hipótesis primero se analizó si las BMDCs eran capaces de interactuar con pLL a nivel de membrana plasmática. Como se muestra en los resultados (Figura 4.43), las BMDCs son capaces de cambiar su forma para adherirse a partículas de pLL, interactuando en forma aparentemente fuerte con estas a nivel extracelular. También se exploró la importancia de Syk en la actividad de pLL sobre BMDCs. Para esto, se preincubaron BMDCs con DMSO (vehículo) solamente o piceatanol (inhibidor de Syk) durante 30 minutos, se estimularon con medio de incubación, pLL, LPS o pLL más LPS, y a las 18 horas se cuantificó la producción de IL-10, IL-12p70, y la expresión de CD40 y CD86. Como muestran los resultados (Figura 4.44), las BMDCs preincubadas con piceatanol no presentan producción de IL-10, ni de IL-12p70 para ninguno de los estímulos utilizados. Esto sigue la línea de resultados realizados en células THP-1, en los que el piceatanol inhibió (parcialmente) la expresión de IL-10 y IL-12p40 inducidas por LPS (240). En cuanto a las moléculas de superficie, se observa que en BMDCs estimuladas con LPS el piceatanol inhibe la expresión de CD40, mientras que para CD86 se observa que el inhibidor induce una potenciación significativa de la expresión de este marcador, ambas de forma similar a pLL. En cuanto a la respuesta a pLL en presencia de piceatanol, no se observa inhibición en la expresión de CD40 respecto a LPS, mientras que para CD86 tampoco se observa una inducción significativa de CD86 por pLL *per se*. Por otra parte, en presencia de LPS sí se observa una potenciación significativa en la expresión de CD86 inducida por pLL. Cabe mencionar que cómo las BMDCs preincubadas con piceatanol presentaron expresión nula de IL-10 y IL-12p70 en presencia de LPS, no fue posible observar si la presencia del inhibidor altera el efecto de pLL sobre estas citoquinas. Sin embargo, para las moléculas de superficie, estos ensayos sugieren que Syk sería requerida para la actividad de pLL sobre BMDCs, al menos en términos de los efectos sobre CD40 y CD86.

En resumen, en esta sección se muestra, a nivel de experimentos preliminares, que la internalización de pLL por BMDCs es pobre o nula. También se muestran, claramente, que las BMDCs interactúan con pLL a nivel de la membrana plasmática, y que las actividades de pLL son sensibles a un inhibidor de Syk. Junto con datos previos, incluyendo la sensibilidad al inhibidor del reordenamiento de los filamentos de actina y a los inhibidores de PI3K clase I, estos resultados son compatibles con la posibilidad de que pLL, al igual que ciertos otros

materiales particulados como alúmina y CUM, actúe a nivel de membrana plasmática de manera independiente de receptores, y dependiente de Syk.

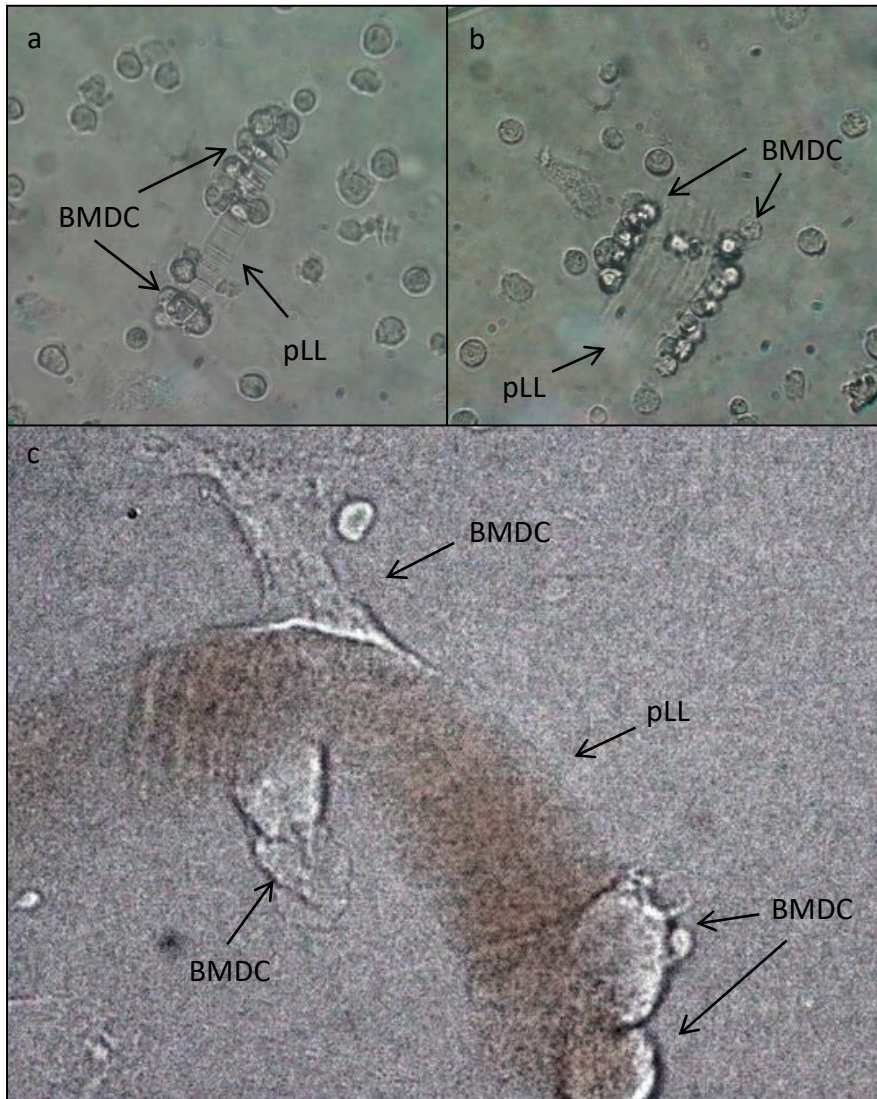


Figura 4.43. Las BMDCs son capaces de interactuar con pLL a nivel de membrana plásmática. Imágenes de microscopía de campo claro de BMDCs incubadas 18 horas con pLL. Magnificación 200x (a y b), y 1000x (c).

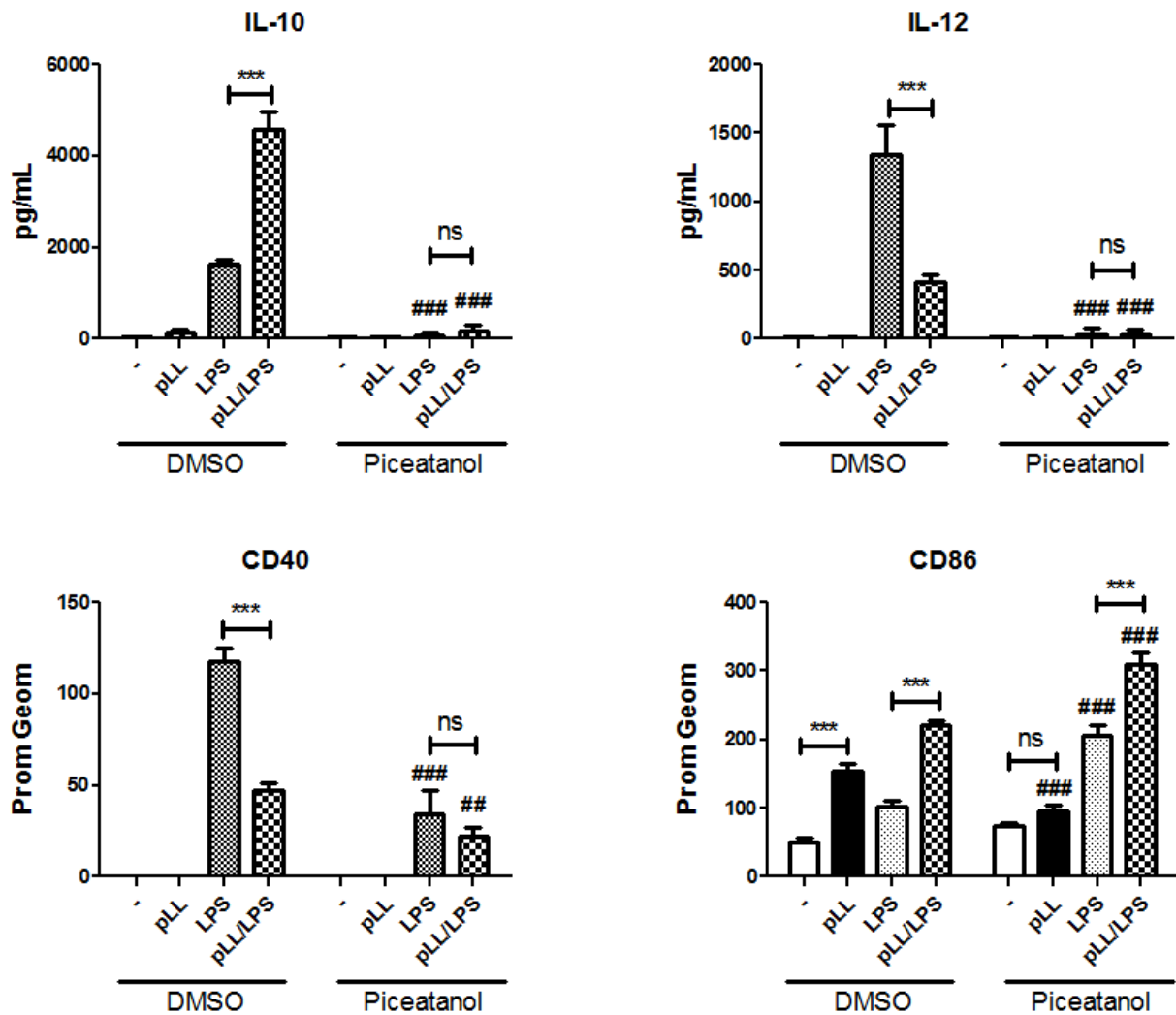


Figura 4.44. Efecto del inhibidor piceatanol sobre la actividad de pLL en BMDCs. Se pre-incubaron BMDCs 30 minutos con piceatanol 25 μ M, o DMSO (vehículo) solamente. Luego se estimularon con pLL (10 μ g) en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Además, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimentos: ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$, * $P < 0.05$; no significativa, para comparaciones en presencia y ausencia de pLL. Además, se utiliza: ###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; #, $P < 0.05$, para indicar diferencias entre BMDCs estimuladas de la misma manera pero preincubadas con piceatanol respecto al tratamiento con el vehículo solamente.

4.7 Evaluación de la actividad de pLL sobre el metabolismo glicolítico aeróbico y la producción de óxido nítrico en BMDCs

Datos publicados indican que la incubación de células dendríticas con agonistas de TLRs, incluyendo LPS, induce un cambio a metabolismo glicolítico aeróbico (207, 211). Este cambio ocurre inicialmente en tiempos de aproximadamente 1 hora, en forma dependiente de TBK1 e IKK ϵ , y de Akt, e independientemente de la activación de PI3K (143). Luego, y con una escala de tiempo de 24 horas, el metabolismo glicolítico se estabiliza en forma dependiente de la producción de óxido nítrico (NO), mediador que inhibe la cadena respiratoria mitocondrial (212). Este cambio tardío, si bien no está demostrado que dependa de Akt, sí es inhibido por un inhibidor de PI3K (207), y es necesario para la correcta activación de las células dendríticas en respuesta a agonistas de TLRs (143). Estos resultados sugieren la posibilidad de que la exposición a pLL, por inhibir la activación de Akt (y concebiblemente la de PI3K, “*upstream*” de Akt) inhibiera el cambio a metabolismo glicolítico, y a través de éste, aspectos de la maduración convencional de la BMDCs.

Se exploró si pLL inducía cambios en la actividad mitocondrial (a nivel de la fosforilación oxidativa) de BMDCs incubadas en presencia o ausencia de LPS. Para esto, se estimularon BMDCs, durante 18 o 22 horas, con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS. Luego, utilizando el equipo *Seahorse XF-24 Extracellular Flux Analyzer*, se realizaron medidas de la tasa de consumo de O₂ (OCR del inglés, *oxygen consumption rate*). Además, se utilizaron los inhibidores/desacoplantes de la fosforilación oxidativa mencionados en la sección 3.5.10 para evaluar el estado de la función mitocondrial. Como muestran los resultados (Figura 4.45), las BMDCs estimuladas con LPS presentan inhibición de la fosforilación oxidativa a tiempos tardíos, lo cual coincide con datos previamente publicados (212). En lo que se refiere a las BMDCs incubadas con pLL no se observan diferencias en el consumo de oxígeno respecto a los controles, tanto en ausencia como en presencia de LPS. Estos resultados indican que pLL no es capaz de inhibir la función mitocondrial *per se*, ni de rescatar la pérdida de la función mitocondrial causada por la estimulación con LPS.

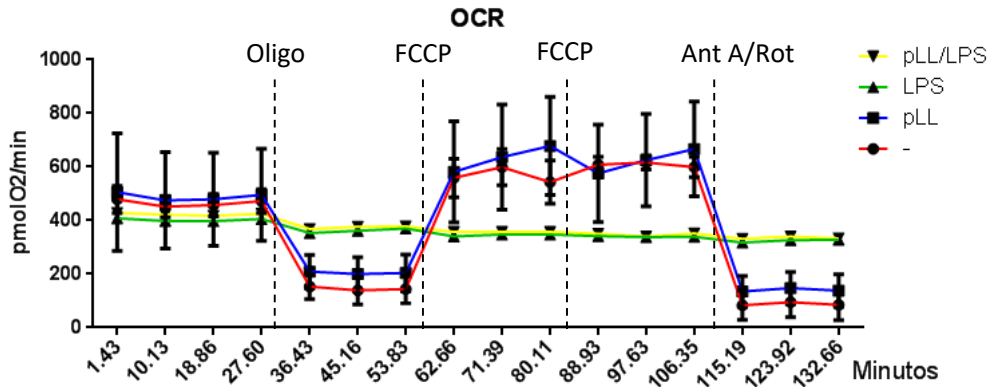


Figura 4.45. Evaluación de la función mitocondrial de BMDCs estimuladas con pLL. Se sembraron BMDCs en placas XF-24, y se las estimularon con 10 µg de pLL en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL por 18-22 horas. Luego se determinó el OCR para cada tiempo indicado. Se agregaron los inhibidores/desacoplantes de la fosforilación oxidativa oligomicina (Oligo), FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona), antimicina A y rotenona (Ant A/Rot) a los tiempos indicados por la línea punteada. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos cuadruplicados. El resultado mostrado es representativo de 2 experimentos independientes.

Luego se exploró si pLL era capaz de alterar la producción de óxido nítrico (NO), en ausencia o presencia de LPS. Para esto se incubaron BMDCs con medio solamente, pLL o como control Lx IgG, en ausencia o presencia de LPS, y a las 18 horas se midió la concentración de nitrito (metabolito estable del óxido nítrico) en los sobrenadantes. Como muestran los resultados (Figura 4.46), pLL no indujo la síntesis de óxido nítrico *per se*, pero sí potenció de manera estadísticamente significativa la expresión de NO en presencia de LPS. El particulado control Lx IgG se comportó de manera diferente a pLL, induciendo *per se* la síntesis de óxido nítrico en bajas cantidades, mientras que en presencia de LPS potenció la síntesis de óxido nítrico con menor intensidad que pLL. Estos resultados descartaron la posibilidad que pLL inhibiera la síntesis de NO inducida por LPS, es decir que inhibiera el desencadenante del cambio tardío a metabolismo glicólico. De esta manera, los resultados obtenidos para la producción de NO acompañan lo observado previamente para la función mitocondrial en BMDCs estimuladas con pLL, en ausencia y presencia de LPS.

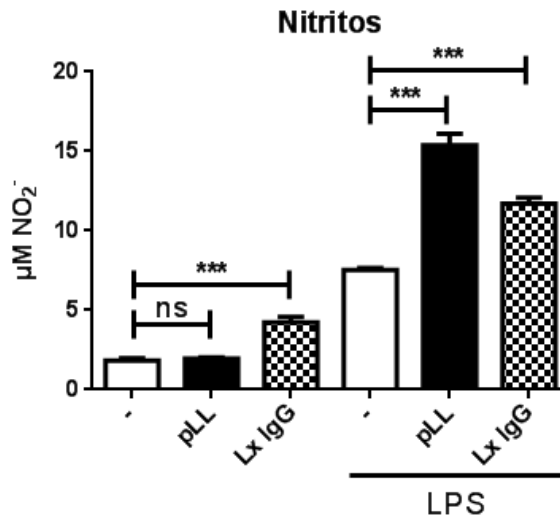


Figura 4.46. Evaluación de la producción de NO (en términos de nitrito) en sobrenadantes por BMDCs estimuladas con pLL. Se estimularon BMDCs con pLL (10µg) o Lx IgG (30µg), en presencia o ausencia de LPS 10 ng/mL, y se cuantificó la concentración de nitritos en sobrenadantes a las 18 horas. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento: ***, P < 0.001; **, P < 0.01; * P < 0.05; sn, no significativo.

Finalmente se estudió si la exposición a pLL era capaz de afectar la acidificación extracelular (ECAR, del inglés *extracellular acidification rate*), la cual es una medida indirecta de la producción de lactato, y por lo tanto de los niveles de glicólisis. Para esto se incubaron BMDCs con medio de incubación solamente, pLL, LPS o pLL más LPS por 18 o 22 horas, y se realizaron medidas de ECAR utilizando el equipo *XF-24 Extracellular Flux Analyzer*. Además, se realizó el mismo ensayo con un tiempo de 2 horas, empleando solamente las condiciones de medio y pLL. Como muestran los resultados (Figura 4.47), las BMDCs incubadas con pLL presentaron un aumento del ECAR para los 3 tiempos estudiados. Además, para las 2 medidas a tiempos tardíos (18 y 22 horas) se observó que el aumento en la glicólisis era inhibible por oxamato, inhibidor de la lactato deshidrogenasa (Figura 7.7, Anexo 1). Esto es indicativo de que pLL induce aumento en el ECAR a través de un aumento en la glicólisis aeróbica, al menos para tiempos tardíos y presumiblemente también lo haga para el tiempo temprano. Además, para los tiempos tardíos, se confirmó que pLL no es capaz de inhibir el cambio hacia glicólisis aeróbica inducido por LPS. De esta manera, se concluye que pLL *per se* es capaz de aumentar los niveles de ECAR tanto a tiempos tempranos como tardíos, y no es capaz de inhibir el cambio metabólico inducido por LPS a través del efecto del NO sobre la cadena respiratoria.

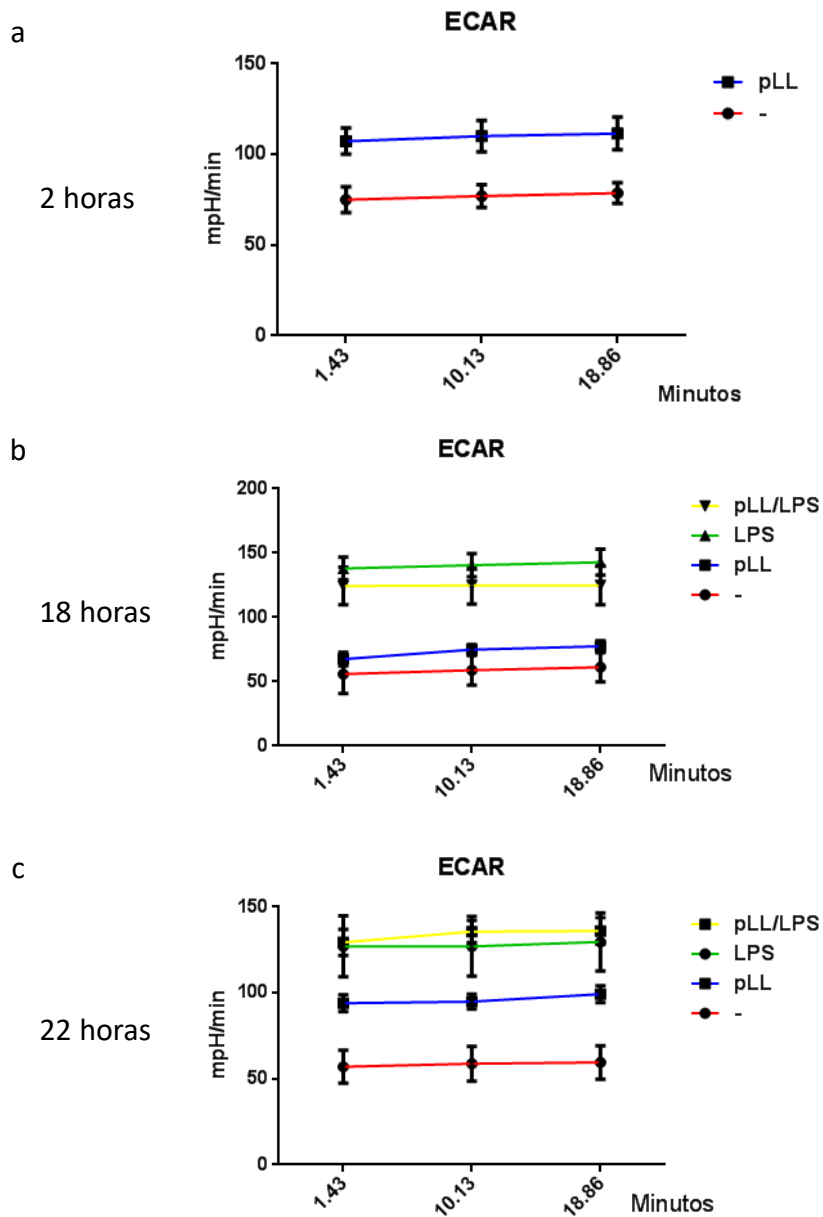


Figura 4.47. Evaluación de la glicólisis aeróbica en BMDCs estimuladas pLL. Se sembraron BMDCs en placas XF-24, y se las estimularon con 10 μ g de pLL en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL por 18 (b) o 22 (c) horas, se realizó lo mismo para pLL o medio solamente con incubación de 2 horas (a). Luego se determinó el ECAR para cada tiempo indicado durante 18 minutos. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados representan experimentos independientes entre sí, pero son la única repetición realizada de cada uno de ellos.

Dados los resultados obtenidos, se concluye que es improbable que los sesgos fenotípicos inducidos por pLL sobre BMDCs se deban a interferencias en el cambio metabólico a glicolisis aeróbica inducido por el LPS. Sin embargo, resulta interesante el aumento en ECAR inducido por pLL en BMDCs.

4.8 Estudio de los efectos de la inhibición de PI3K de clase I y de clase III sobre la producción de citoquinas inducidas por agonistas de TLRs en BMDCs

Observaciones realizadas en el contexto de la evaluación de la participación de la vía de PI3K/Akt en el sesgo fenotípico inducido por pLL en BMDCs (ver sección 4.5), utilizando diferentes inhibidores de PI3Ks, dieron lugar al interés en analizar los efectos de la inhibición de diferentes clases de PI3K sobre la producción de citoquinas inducida por agonistas de TLRs en BMDCs.

La estimulación de células dendríticas con agonistas de TLRs activa el eje PI3K/Akt/GSK-3, el cual regula positivamente la producción de IL-10 e inhibe la producción de IL-12 (165, 225). De esta manera, la inhibición de PI3K debería inhibir la producción de IL-10, al mismo tiempo que aumenta la producción de IL-12. Sin embargo, en presencia de wortmanina (inhibidor general de PI3K) observamos una producción normal o levemente aumentada de IL-10 en respuesta al LPS (Figura 4.23). En cambio, el GDC-0941 (inhibidor específico de PI3Ks de clase I) sí inhibe la producción de IL-10 inducida por LPS como era esperado (Figura 4.27). De esta manera, surge la hipótesis que la inhibición de otras clases de PI3Ks influya sobre la producción de IL-10. Los resultados obtenidos con los inhibidores de VPS34 (PI3K de clase III) muestran que estos inhibidores causan aumento en la producción de IL-10 (Figura 4.24). Así, el resultado obtenido con wortmanina podría explicarse por la suma de los efectos de este inhibidor sobre las PI3Ks de clase I y clase III. Dado a que los ratones genéticamente deficientes en VPS34 no son viables, y que hasta hace poco no existían inhibidores específicos de esta quinasa, se conoce muy poco sobre cómo VPS34 afecta al sistema inmune. Por esto, se decidió realizar un estudio específico sobre el impacto de la inhibición de VPS34, con inhibidores químicos, en la producción de citoquinas inducidas por agonistas de TLRs en BMDCs. Estos resultados se presentan en formato de publicación en el Anexo 2 (241).

5 Discusión

Como ya se mencionó, los parásitos helmintos son capaces de mantener infecciones por largos períodos de tiempo a pesar de los mecanismos de defensa de sus hospederos (46). Para lograr esto han desarrollado diferentes estrategias de modulación de la respuesta inmune. Se conoce muy poco de los agonistas moleculares que disparan el reconocimiento de los helmintos por parte de células del sistema inmune innato, así como de moléculas usadas por estos parásitos para regular la respuesta inmune (27, 46, 49). Las DCs son células centinelas que se encargan de detectar señales de peligro, y orquestar la respuesta inmune en respuesta a diferentes patógenos. En infecciones con parásitos helmintos, las DCs son necesarias para que se monte una correcta respuesta de tipo 2 en organismos infectados (52, 53). También son consideradas los blancos principales a través de los cuales los helmintos inducen respuestas reguladoras.

En el contexto de la infección con *E. granulosus* larvario, los componentes de la CL son candidatos a condicionar a las DCs en dirección reguladora y/o Th2. El estudio del condicionamiento de DCs por partículas de la CL (pLL) de *Echinococcus granulosus* fue realizado por la Dra. Cecilia Casaravilla, principalmente en el contexto de su Tesis de doctorado. Los datos, mayoritariamente en BMDCs, muestran que estas células, al ser condicionadas con pLL, presentan mayor expresión de CD86 (y CD80) en su superficie, sin presentar inducción en la expresión de CD40, ni de citoquinas. Sin embargo, otros efectos del condicionamiento de BMDCs por pLL surgen si coestimulamos con agonistas de TLR. En presencia de LPS por ejemplo, las BMDCs condicionadas con pLL presentan menor expresión de IL-12 y CD40, y un aumento en la expresión de IL-10 y CD86; a este fenotipo inducido por pLL se lo puede denominar semi-maduro. En el desarrollo de esta Tesis se buscó identificar posibles agonistas presentes en la CL de *Echinococcus granulosus* responsables de los cambios mencionados en BMDCs, tanto en ausencia como en presencia de un agonista de TLR (LPS), así como identificar los mecanismos a nivel de señalización que participan en este condicionamiento.

5.1 Evaluación de la actividad de diferentes presentaciones físicas de la CL

Primero se verificó que el método utilizado para generar el material particulado de la CL no introdujese artefactos que pudieran ser responsables de los efectos en BMDCs. Se obtuvieron diferentes preparaciones de la CL, particuladas o “soluble”, y se ensayaron sus efectos sobre BMDCs. Los resultados muestran que la actividad del material no depende del procedimiento utilizado para deshidratar la muestra, ni del mero hecho que ésta pase por una instancia de deshidratación. Además, muestran que la actividad depende de manera inversa del tamaño de las partículas, cuando se comparan iguales masas del material. En conjunto con los resultados publicados que indican que la actividad de pLL depende del contacto con las células (103), es posible inferir entonces que la actividad debe ser proporcional a la superficie total del material disponible para entrar en dicho contacto. Además, los resultados mostraron que la sonicación fuerte para producir un material “soluble” anula la actividad sobre la IL-10, pero no sobre la IL-12, sugiriendo que las actividades sobre estas citoquinas son independientes. Finalmente, se descartó la posibilidad que el material “soluble” adsorbido al plástico fuera activo.

Adicionalmente se determinó que dos materiales particulados no biológicos, de tamaños fagocitable y no fagocitable respectivamente, no imitaron la actividad de pLL. De esta manera, los resultados muestran globalmente que la actividad de pLL sobre BMDCs proviene de características intrínsecas a este material parasitario, y en parte depende de una presentación particulada.

5.2 Participación de distintos componentes presentes en pLL a su actividad: búsqueda de agonistas

Se exploró la participación de los componentes del hospedero en la actividad de pLL. Se determinó que las proteínas más abundantes de origen del hospedero presentes en pLL eran inmunoglobulinas (Igs). Dada la capacidad reportada de Igs de regular respuestas en DCs (219, 242), se evaluó si las mismas contribuían a la actividad de pLL. Se determinó que, si bien un material particulado control recubierto de IgG humana era capaz de aumentar la expresión de IL-10 y de CD86 de forma similar a la que lo hace pLL, las Igs presentes en pLL contribuyen de manera seguramente marginal a la actividad de la preparación.

Luego se determinó que la actividad de pLL no depende de la integridad de sus azúcares, y en cambio sí de la integridad de su componente proteico. En efecto la actividad es disminuida, si bien no anulada, por proteólisis o la reducción de enlaces disulfuro. Esto señaló a los extremos N-terminales de las apomucinas EGC0002904 y EGC0004254, conteniendo cisteína, como posibles candidatos a ser motivos activos de pLL, pero una evaluación directa utilizando péptidos sintéticos descartó esta posibilidad.

Sabemos que la proteólisis inespecífica y la reducción de disulfuros desestabilizan la estructura de pLL, facilitando su disolución por sonicación (26). Globalmente, los resultados sugieren entonces que la actividad de pLL no depende de motivos ni glucídicos ni proteicos, sino de propiedades supramoleculares. Esta línea de pensamiento es acompañada por el resultado de que buena parte de la actividad de pLL se pierde al eliminar la presentación particulada por sonicación.

5.3 Evaluación de los cambios en vías centrales de señalización inducidos por pLL en BMDCs

En esta sección se buscaron cambios en vías centrales de señalización inducidos por la estimulación de BMDCs con pLL, en ausencia o en presencia de un agonista de TLR, estudiándose aspectos de las vías NF- κ B, MAPKs (JNK/SAPK, p38 y ERK1/2) y PI3K/Akt. No se detectó ningún cambio robusto en las vías canónica y de p105 de NF κ B, ni en las MAPKs JNK/SAPK y p38. Para el caso de ERK1/2, si bien los resultados no fueron claros, tampoco indicaron algún cambio específico por la estimulación con pLL. Es sabido que ERK1/2 regula positivamente la expresión de IL-10 y negativamente la de IL-12 en respuesta a agonistas de TLR (224). Se analizó entonces si en presencia de un inhibidor de la activación de ERK1/2 la actividad de pLL dejaba de estar presente. El estudio mostró que la actividad de pLL no depende de ERK1/2. Por último, la estimulación con pLL indujo un fuerte y robusto cambio en la vía de PI3K/Akt, inhibiendo en particular la fosforilación de Akt inducida por LPS, y en algunos casos incluso también los niveles basales de fosforilación de esta proteína, sin alterar los niveles de Akt total. Un efecto similar fue observado en macrófagos reclutados por tioglicolato, pero no en BMDMs. Datos que acompañan estos resultados, obtenidos en la Tesis de Maestría de Paula Seoane, muestran que la estimulación con pLL inhibe, en BMDCs y macrófagos reclutados por tioglicolato, la fosforilación de Akt inducida por otros

agonistas de PI3K, específicamente IL-4, GM-CSF y M-CSF. Esto sugiere fuertemente que la capacidad de pLL de inhibir la fosforilación de Akt no deriva de alteraciones a nivel de receptor, sino de alteraciones en alguno de los pasos posteriores comunes entre los diferentes receptores. Esta idea se encuentra respaldada, en el caso del estímulo LPS, por el hecho de que pLL no inhibe otras vías de señalización activadas a partir de TLR4, como NF κ B, y la MAPK p38. En forma análoga, los resultados de Paula Seoane y Cecilia Casaravilla muestran que la exposición a pLL inhibe la inducción, en respuesta a IL-4, del marcador Relm- α dependiente de PI3K/Akt, pero no la de Ym1, marcador independiente de PI3K/Akt, sugiriendo que no inhibe la vía de STAT6, necesaria para la inducción de ambos marcadores en respuesta a IL-4 (186). Otros datos de nuestro grupo, obtenidos por Yamila Martínez en el contexto de su Tesis de Maestría, indican que pLL no es capaz de inhibir la fosforilación de Akt inducida por LPS en células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea en presencia de Flt3L (Flt3L-BMDCs) (243). Estos resultados, junto con los datos en BMDM, indican que la actividad de pLL sobre Akt es dependiente del modelo celular de célula mielóide estudiado.

Los resultados también muestran que la estimulación de BMDCs con pLL inhibe la fosforilación de p70S6K (blanco directo de mTORC1, y por lo tanto indirecto de Akt) y de GSK-3 (blanco directo de Akt), en el contexto de coestimulación con LPS. En otras palabras, el efecto de pLL sobre la fosforilación de Akt en BMDCs se traduce en menor actividad de esta quinasa, ya que la fosforilación de p70S6K y GSK-3 en presencia de LPS también se inhibe al coestimular con pLL.

5.4 Conexión entre la inhibición de la vía de PI3K/Akt y la actividad de pLL en términos de marcadores de superficie y citoquinas

A continuación se discute de qué manera se conecta la inhibición de la vía de PI3K/Akt y la actividad de pLL en términos de citoquinas y moléculas coestimuladoras. Primero se debe señalar que el material pLL-DTT, que presenta la menor actividad de todos los materiales particulados derivados de la CL sobre BMDCs, dio lugar a muy poca inhibición de la fosforilación de Akt inducida por LPS. Este resultado acompaña la idea de que la inhibición de la fosforilación de Akt probablemente se encuentre asociada con la generación del fenotipo semi-maduro inducido por pLL en BMDCs.

El estudio de la relación entre la inhibición de la vía de PI3K/Akt y los aspectos del fenotipo obtenido al estimular BMDCs con pLL produjo una cantidad importante de información que vincula específicamente a la inhibición de CD40 con la inhibición del eje PI3K/Akt/GSK-3. En primer lugar, los resultados obtenidos con el inhibidor específico de PI3K de clase I, GDC-0941, muestran que parte (cerca del 50 %) de la inducción de CD40 en respuesta a LPS es regulada por la activación del eje PI3K/Akt. Además, el inhibidor GDC-0941 afecta la inducción de CD40 en igual grado que pLL, y ambas actividades no son aditivas, sugiriendo que actúan sobre la misma vía. Como comentario al margen, wortmanina (un inhibidor general de PI3K), contrariamente a GDC-0941, no alteró la expresión de CD40 inducida por LPS. Datos publicados con otro inhibidor general de PI3K, LY294002, en BMDCs estimuladas con LPS, muestran que la expresión de CD40 baja en presencia del mismo, de manera dependiente de dosis (244). Esta diferencia no se puede deber al efecto de la wortmanina sobre VPS34 (PI3K de clase III), ya que nuestros estudios con inhibidores de esta quinasa muestran que la misma no participa en la regulación de la expresión de CD40 inducida por LPS en BMDCs (ver Figura 4.24). Así, el hecho que la wortmanina no inhiba la expresión de CD40 podría deberse a efectos compensatorios sobre PI3Ks de clase II o sobre blancos no PI3K. Más allá de lo anterior, la wortmanina sí se comportó en forma similar a GDC-0941 en el sentido que en su presencia no existió actividad de pLL sobre CD40. Nuevamente, esto acompaña en principio la idea que pLL actúa sobre CD40 al inhibir la actividad de la vía PI3K/Akt, la cual al estar inhibida en forma dominante por la wortmanina impide que pLL tenga efecto. De todos modos, la anulación de los efectos de pLL sobre CD40 en presencia de inhibidores de PI3K de clase I puede deberse a una causa adicional, en común con todos los efectos de pLL, que es el requerimiento de estas quinasas para la interacción células-partículas, como se retoma en la sección 5.5.

La vinculación entre la inhibición de la fosforilación de Akt y la expresión de CD40 fue reforzada por los experimentos utilizando inhibidores de Akt. Empleando el inhibidor triciribina a dos dosis diferentes, se observó que el grado de inhibición de la fosforilación de Akt se relaciona de forma directa con el grado de inhibición de la expresión de CD40 (ver Figuras 4.32a y 4.33a). Además, el nivel de inhibición de la expresión de CD40 alcanzado a la dosis más alta de triciribina coincide con el nivel de inhibición causado por pLL, y a su vez, los efectos de la triciribina y de pLL no son aditivos (ver Figura 4.33b). En forma similar, el

tratamiento con otras dos drogas que anulan la activación de Akt, Akt VIII y amlexanox, inhibió la expresión de CD40 al mismo nivel que lo hizo pLL, siendo los efectos de pLL y de dichas drogas no aditivos (ver Figuras 4.34 y 4.36). Todos estos resultados sugieren fuertemente que la señalización celular que controla la expresión de CD40 inducida por LPS en BMDCs se encuentra integrada por más de un componente, uno de los cuales es la vía de PI3K/Akt. También sugieren fuertemente que la presencia de pLL inhibe ese componente dependiente de PI3K/Akt. Estas conclusiones son coherentes con datos publicados que indican que la expresión de CD40 inducida por LPS es menor en BMDCs Akt1 -/- respecto a BMDCs tipo silvestre (136). En el mismo sentido otro estudio, muy completo, que concluye que el estado de fosforilación de Akt regula de forma directa la expresión de CD40 en presencia de LPS, junto con las vías de STAT-1 α y NF κ B (244).

Se exploró también utilizando inhibidores farmacológicos si los efectos de pLL sobre la expresión de CD40 ocurrían a través de cambios en dos de los blancos más estudiados de Akt, mTORC1 o GSK-3, que como se mencionó anteriormente son impactados por los efectos de pLL sobre Akt. Los resultados utilizando dos inhibidores de mTORC1 diferentes, rapamicina y torin1, indican que los cambios en la actividad de mTORC1 no están vinculados a la regulación de la expresión de CD40. En cambio, los resultados con inhibidores de GSK-3 sí indican la participación de esta quinasa en los efectos de pLL sobre la expresión de CD40. Primeramente, el inhibidor de GSK-3, SB216763, induce la expresión de CD40 en BMDCs, tanto en presencia como en ausencia de LPS, indicando que GSK-3 es un regulador negativo de CD40. Esto, en conjunto con los resultados anteriores, sugiere que la vía de PI3K/Akt regula CD40 al menos en parte a través de GSK-3. Como se mencionó, Akt regula negativamente la actividad de GSK-3. La estimulación de BMDCs con pLL inhibe la actividad de Akt, derivando en una menor fosforilación de GSK-3 y por lo tanto presumiblemente en una mayor actividad de esta quinasa. Todo esto coincide con la inhibición de la expresión de CD40 inducida por pLL. Además, como resultado confirmatorio, la actividad de pLL sobre CD40 es anulada al utilizar el inhibidor SB216763. Esta conclusión es acompañada por resultados publicados que indicaron que la inhibición de GSK-3 (por el mismo inhibidor) en DCs aumenta la expresión de CD40, observándose incluso por citometría relación directa a nivel de células individuales entre fosforilación de GSK-3 y expresión de CD40 (162). Otro estudio concluye que la GSK-3 activa inhibe la degradación de I κ B y por lo tanto la activación

de NFκB (245). Esto podría estar vinculado a evidencias que muestran que la activación de Akt podría contribuir a inducir activación de NFκB (56, 157, 158). Sin embargo, este mecanismo no necesariamente operaría en nuestro sistema, ya que la degradación de IκBα no está inhibida en presencia de pLL (ver Figura 4.17).

La conexión entre la inhibición de la actividad de Akt y la inhibición de la expresión de CD40 causados por pLL además sugiere que el primer efecto sería al menos en parte independiente de SHIP1, ya que en células SHIP1 -/- pLL igualmente tuvo el segundo efecto. Los datos obtenidos por Yamila Martínez, que como ya se mencionó indican que pLL no es capaz de inhibir la fosforilación de Akt inducida por LPS en Flt3L-BMDCs, también muestran ausencia de inhibición de la expresión de CD40. Es importante aclarar que, en contraste, los demás efectos estudiados de pLL (sobre CD86, IL-10 e IL-12) sí se mantienen en ese modelo celular. Un paralelismo parecido se observa en relación a los efectos de pLL sobre macrófagos reclutados por tioglicolato y BMDMs. En macrófagos reclutados por tioglicolato, pLL inhibe tanto la expresión de CD40 como la fosforilación de Akt inducida por LPS (Figura 7.8, Anexo 1). En cambio, en BMDMs pLL presenta débil inhibición de CD40 (datos Dra Cecilia Casaravilla), y no inhibe la fosforilación de Akt inducida por LPS (ver Figura 4.21). En conjunto todos estos resultados sugieren fuertemente una relación directa entre la inhibición de la fosforilación de Akt y la inhibición de la inducción de CD40 en respuesta a pLL, en BMDCs y en macrófagos reclutados por tioglicolato, en presencia de LPS.

Contrariamente a los efectos de CD40, los efectos de pLL sobre CD86, IL-10 e IL-12 no se explican por los cambios sobre el eje PI3K/Akt/GSK-3. Esta deducción surge principalmente de que los efectos sobre los parámetros CD86, IL-10 e IL-12 al inhibir a Akt farmacológicamente no imitan (e incluso son opuestos a) los efectos de pLL. La misma conclusión surge de que los efectos sobre estos parámetros estudiados, al inhibir GSK-3 no son en general opuestos a los de pLL, pese a que la preparación, al inhibir la fosforilación inhibitoria de esta quinasa, debería causar aumento en su actividad. Además, y en la misma línea, los efectos esperados según datos publicados de la inhibición de PI3K/Akt y consiguiente mayor actividad de GSK-3 son en general opuestos a los causados por pLL (162, 165, 246). Esto sugiere que los efectos de pLL sobre CD86, IL-10 e IL12 ocurren a pesar de los cambios que ocasiona el material sobre Akt y GSK-3 (figura 5.1).

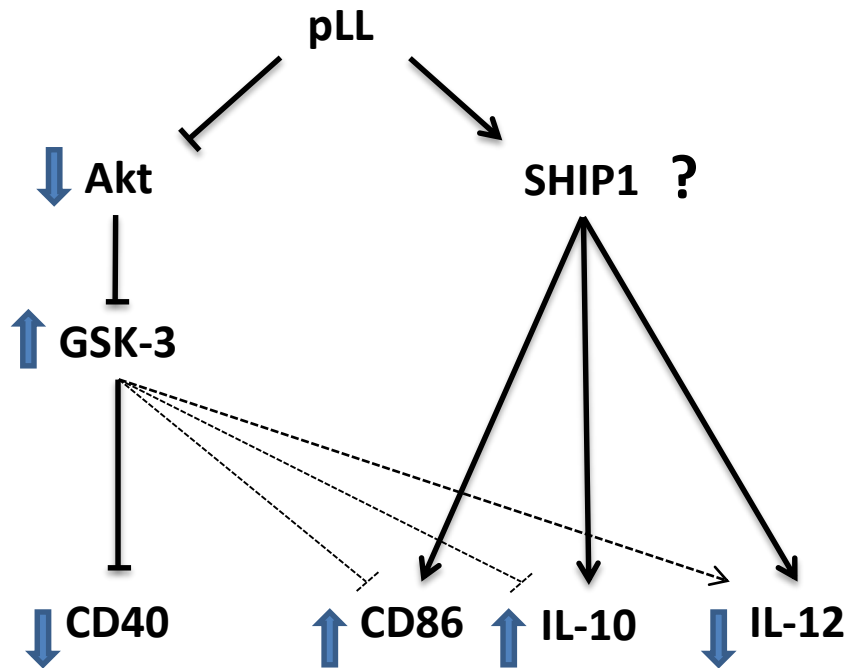


Figura 5.1. Esquema de los posibles mecanismos moleculares planteados que controlan los cambios inducidos por pLL en los parámetros estudiados en BMDC. El efecto de pLL sobre BMDCs inhibe la activación de Akt, lo cual deriva en un aumento en la actividad de GSK-3, con consecuente inhibición en la expresión de CD40. Por otra parte, los efectos de pLL sobre CD86, IL-10 e IL-12, los cuales posiblemente requieren de SHIP (aunque aún no se ha determinado si SHIP es activada por pLL), ocurren a pesar de los efectos del aumento en la actividad de GSK-3.

A continuación se discutirán en detalle los resultados sobre CD86, IL-10 e IL-12. Antes, cabe aclarar nuevamente que si bien todos los efectos de pLL se anularon en presencia de inhibidores de la actividad de las PI3K de clase I, en el conjunto de nuestros resultados asignamos ésto a un requerimiento de PI3K de clase I para dar inicio a la interacción que gatilla toda la señalización en respuesta a pLL, como se discute en detalle en la sección 5.5.

En lo que se refiere al efecto sobre IL-10, las tres drogas utilizadas que inhiben la fosforilación de Akt inhibieron la producción de IL-10 inducida por LPS. Estos resultados siguen la línea planteada en la Introducción de que la activación de PI3K/Akt, y consiguiente inactivación de GSK-3 es antiinflamatoria (165). Como pLL inhibe la actividad y fosforilación de GSK-3, y además las drogas que actúan sobre Akt o GSK-3 no anulan el efecto de pLL sobre IL-10, se concluye que los efectos de pLL sobre IL-10 no ocurren por esta vía. En cambio, el estudio de la participación de SHIP1 muestra que la ausencia de actividad de esta fosfatasa (tanto en presencia de inhibidor químico como en células SHIP1 -/-) disminuye la

producción de IL-10 inducida por LPS. Este resultado, si bien va en contra de lo esperado si se considera a SHIP1 un regulador negativo de la vía PI3K/Akt, coincide con resultados publicados (145). Lo anterior sugiere que SHIP1, en BMDCs, es un regulador positivo de la expresión de IL-10, posiblemente independiente del efecto sobre PI3K/Akt, y pese a éste. El efecto de pLL sobre IL-10 no se observó en BMDCs SHIP1 $-/-$, sugiriendo que pLL podría potenciar la expresión de IL-10 a través de la fosfatasa, quizás porque causa su reclutamiento a membrana plasmática.

En lo que se refiere al efecto sobre IL-12, los resultados en presencia de los tres inhibidores que anulan la fosforilación de Akt arrojaron un panorama complejo, aun en relación a la respuesta a LPS solamente. Esto dificulta la extracción de conclusiones. Sin embargo, las tres drogas revirtieron al menos de forma parcial el efecto de pLL sobre la IL-12, siendo esta inhibición total para el caso de Akt VIII. Estos resultados sugieren que la actividad de pLL sobre la IL-12, que como dijimos no se debe a cambios a nivel de Akt, requiere igualmente de un mínimo de actividad de Akt. Por otra parte, los resultados obtenidos con los inhibidores de mTORC1 y GSK-3 sugieren que la actividad de pLL sobre IL-12 como ya se dijo, ocurre, a pesar de los cambios que genera pLL sobre estos componentes. En otras palabras, sugieren que si pLL no disminuyera la fosforilación inhibitoria de GSK-3 y la actividad de mTORC1, su efecto inhibitorio sobre IL-12 podría ser aún mayor. Los datos obtenidos utilizando el inhibidor 3 α -aminocolestano y células SHIP1 $-/-$ mostraron que SHIP1 es un regulador positivo de la expresión de IL-12 en BMDCs, lo cual concuerda con datos publicados (145), y es además esperable para un regulador negativo de la vía PI3K/Akt. Paradójicamente, la inhibición de IL-12 por pLL no se observa en BMDCs SHIP1 $-/-$, sugiriendo que pLL requiere de SHIP1 activa para inducir sus efectos sobre esta citoquina. Como se discutió antes para IL-10, SHIP1 no actúa únicamente a través de la regulación de la señalización por PI3K/Akt, y sus efectos sobre IL-12 parecen ser complejos. Por ejemplo, contrariamente a lo observado en BMDCs *in vitro*, datos *in vivo* en ratones SHIP^{ADC} (ratones con delección de SHIP únicamente en DCs) muestran producción exacerbada de IL-12 en el contexto de infección por *Trichuris muris* (247, 248). También sugiriendo un panorama complejo, la co-inyección de pLL intraperitoneal en ratones junto con LPS, pese a tener los efectos esperados sobre CD86, CD40 e IL-10, causa un inesperado aumento en la cantidad de IL-12 en lavado peritoneal (103). Si bien no se conoce el origen celular de esta IL-12, este

resultado podría ser compatible con una participación de SHIP1 y con efectos complejos de esta fosfatasa sobre IL-12. De esta manera, no se puede descartar que pLL pueda regular negativamente la producción de IL-12 a través de un hipotético reclutamiento de SHIP1 a membrana plasmática.

En lo que se refiere al efecto de pLL sobre CD86, dos de las tres drogas que inhiben la fosforilación de Akt utilizadas (tricitiribina y amlexanox) aumentaron la expresión de CD86, tanto en presencia como en ausencia de LPS. Sin embargo, este efecto no se observó claramente utilizando el inhibidor Akt VIII, ni en presencia de los inhibidores de PI3K de clase I, pese a que éstos últimos anulan la fosforilación de Akt. Por otra parte, el efecto de pLL sobre CD86 en BMDCs estimuladas con o sin LPS se mantuvo en presencia de las tres drogas, a excepción de la inducción de CD86 por pLL *per se* en presencia del inhibidor Akt VIII. En cuanto a mTORC1, los inhibidores de este complejo no alteraron la expresión de CD86 en presencia o ausencia de LPS, ni el efecto de pLL sobre este parámetro, indicando que el aumento en la expresión de CD86 por pLL es independiente de la regulación de mTORC1. En cuanto a GSK-3, se observó que la inhibición de la quinasa aumenta la expresión de CD86 tanto en presencia como en ausencia de LPS, lo cual concuerda con los datos publicados (162, 246). Estos resultados van en contra de la posibilidad que pLL cause aumento de CD86 a través de GSK-3, y concordantemente, el efecto de pLL sobre CD86 se mantiene en presencia del inhibidor de GSK-3. Concluimos que el efecto de pLL sobre CD86 ocurre a pesar de los cambios inducidos por Akt y GSK-3. Por otra parte, los resultados empleando 3 α -aminocolestano y BMDCs SHIP1 $-/-$ muestran que SHIP1 es un regulador positivo de la expresión de CD86 inducida por LPS, en concordancia con datos publicados (145). Como además, los efectos de pLL sobre este parámetro se inhibieron significativamente en ausencia de la actividad de SHIP1, los datos son coherentes con la posibilidad que el aumento de la expresión de CD86 causado por pLL se deba a reclutamiento/activación de SHIP1.

Cabe mencionar que se ha reportado que la IL-10 regula negativamente la expresión de IL-12 y CD40 en DCs y monocitos, respectivamente (56, 249). Sin embargo, el efecto de pLL sobre IL-12 y CD40 no puede deberse (o no puede deberse únicamente) al aumento en la producción de IL-10. Por una parte, el material "soluble", sLL, no es capaz de potenciar IL-10, pero sí inhibe la expresión de IL-12 (ver Figura 4.5). Por otra parte, en BMDCs SHIP1 $-/-$ pLL

no potencia IL-10 pero sí inhibe la expresión de CD40. Ambos resultados muestran que la inhibición de IL-12 y CD40 inducida por preparaciones de la CL puede estar presente en ausencia de la potenciación de IL-10. En concordancia con estas ideas, mientras que los niveles de potenciación de IL-10 inducida por pLL y Lx-IgG son similares, los niveles de inhibición de IL-12 y de CD40 causados por el Lx-IgG son menores que los causados por pLL. En conjunto, estos resultados indican que los efectos de pLL sobre IL-12 y CD40 son mayoritariamente independientes del aumento en la producción de IL-10 (ver sección 5.9).

En suma, el estudio de la relación entre los cambios en las vías de señalización y las características del fenotipo semi-maduro de BMDCs que induce pLL permitió identificar o sugerir algunos de los mecanismos moleculares involucrados. En particular, el efecto sobre CD40 se encuentra asociado a la inhibición Akt y consiguiente activación de GSK-3 (pero es independiente de la inhibición de mTORC1). El estudio también mostró que en nuestro sistema, y en concordancia con datos publicados, la inhibición de Akt o PI3K y activación de GSK-3 induce efectos opuestos a los generados por pLL sobre CD86, IL-10 e IL-12. Esto indica que los cambios inducidos por pLL sobre estos parámetros responden a una alteración en la señalización separada de las observadas en Akt y GSK-3. Como se mencionó, los datos obtenidos por el grupo en Flt3L-BMDCs apoyan claramente este modelo. Los resultados en relación a SHIP1 sugieren, preliminarmente, que los efectos de pLL sobre CD86, IL-10 e IL-12 involucran la participación de esta fosfatasa, a diferencia del efecto sobre CD40 que sería independiente de la misma. La integración de esto con las conclusiones anteriores lleva a un modelo en el cual, en respuesta a pLL, ocurre por un lado la inhibición de Akt (y activación de GSK-3) y consiguiente inhibición de la expresión de CD40, y por otro, independientemente, una activación/reclutamiento de SHIP1 que lleva a los efectos sobre CD86, IL-10 y IL-12 (Figura 5.2). En este modelo, SHIP1 no contribuiría en forma importante a la inhibición de la actividad de Akt observada, e impactaría sobre CD86, IL-10 e IL-12 en forma independiente de su capacidad reguladora de PI3K/Akt. Se ha observado que SHIP1 inhibe la formación del complejo MyD-88/TLR-4 (al estimular con LPS) y la del complejo TBK-1/TRIF-TRAF-3 (reclutado al activarse el receptor endosomal TLR-3 con el estímulo Poly I:C), aunque aún no se conoce el mecanismo preciso de estos efectos (197, 250). Cabe mencionar que en el endosoma no hay PIP3, por lo cual al menos el segundo efecto de SHIP1 mencionado podría deberse a una actividad independiente de su actividad fosfatasa y

reguladora de PI3K/Akt. En sintonía con esto, en macrófagos estimulados con LPS, SHIP1 regula la señalización por MAPK y la producción de ciertas citoquinas de manera independiente de su actividad fosfatasa, actuando como un regulador negativo de la respuesta a LPS (156, 197).

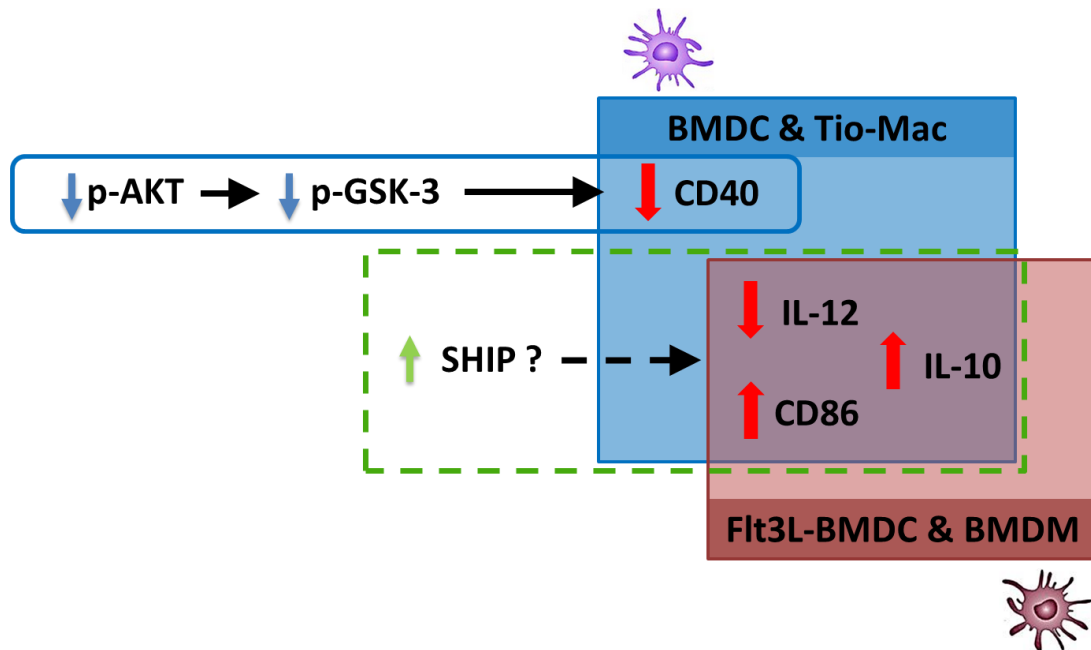


Figura 5.2. Esquema indicando los posibles mecanismos moleculares planteados que controlan los cambios inducidos por pLL, presentes en diferentes modelos de DCs (BMDCs y FIt3L-BMDCs) y de macrófagos (Tio-Macs y BMDMs). En BMDCs y Mac-Tios, pLL inhibe la expresión de CD40 presumiblemente a través de la inhibición en la fosforilación de Akt y consecuente inhibición de la fosforilación de GSK-3. En FIt3L-BMDC y BMDM, pLL no inhibe o inhibe más débilmente la expresión de CD40, mientras que sí se ven afectados en el mismo sentido que para BMDC y Mac-Tio los parámetros CD86, IL-10 e IL-12. En BMDCs el efecto de pLL sobre CD86, IL-10 e IL-12 depende de SHIP, por lo cual se extrapola que esta fosfatasa también participe de la regulación de estos parámetros en los demás modelos celulares estudiados.

5.5 Señalización proximal en respuesta pLL en BMDCs

A continuación se discute de qué manera pLL es capaz de interactuar con las BMDCs para inducir sus efectos. Los resultados generados por el grupo indican que pLL necesita del contacto con las células para ejercer sus efectos (103). Observaciones en esta Tesis muestran que no existen niveles significativos de fagocitosis de pLL por BMDCs. A su vez, por microscopía se observa un fuerte contacto entre las partículas y las BMDCs. Como ya se mencionó anteriormente, la actividad de pLL guarda una relación inversa con el tamaño de las partículas (a igual masa), lo cual visto desde otro punto de vista, sugiere que guarda una

relación directa con la superficie total de las partículas. Estos resultados sugieren que pLL interactúa con las BMDCs a nivel de membrana plasmática, sin ser fagocitado, y su actividad es dependiente de la superficie de contacto. Por otra parte, como se comentó previamente, el estudio de la presencia de posibles agonistas moleculares presentes en pLL responsables del condicionamiento de BMDCs no arrojó ningún resultado positivo evidente, ni para motivos glucídicos ni peptídicos. En concordancia, un estudio en el que se evaluó la unión de las mucinas de la CL de *E. granulosus* a un amplio panel de receptores de la inmunidad innata, mostró reconocimiento únicamente por el receptor de células de Kupffer (CLEC4F), receptor que se expresa únicamente en macrófagos hepáticos (251, 252). Estos resultados nos llevan a plantearnos la posibilidad que pLL induzca sus efectos sobre BMDCs de forma independiente de receptor.

Se ha propuesto que varios materiales particulados (entre ellos alúmina, cristales de urato monosódico, cristales de fosfato de calcio y cristales de colesterol) inducen en DCs y macrófagos señales independientes de interacciones ligando-receptor. Este tipo de señalización ocurriría a partir del reordenamiento de las balsas lipídicas de la membrana plasmática, consecuencia de una fuerte interacción multivalente entre esos sólidos y las cabezas polares de los lípidos de membrana. Esto promueve la agrupación y consiguiente fosforilación de motivos ITAM (del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) que desencadena una señalización celular. A este tipo de señalización se la conoce como MATS (del inglés, *Membrane Affinity Triggered Signaling*) (237–239, 253, 254).

Como se expondrá en los siguientes párrafos, varios de los resultados expuestos anteriormente, así como otros resultados del grupo a ser expuestos, conducen a la hipótesis que pLL induzca sus señales en DC y macrófagos por el mecanismo de MATS.

El paso central en el mecanismo de MATS es la activación de Syk, reclutada a dominios ITAM fosforilados (238). Trabajos publicados recientemente muestran que Syk se activa rápidamente al exponer DCs a cristales de urato monosódico, fosfato de calcio o colesterol, de forma independiente de receptor y a través de MATS (238, 253, 254). Nuestros ensayos con el inhibidor de Syk, piceatanol, muestran que la actividad de pLL sobre BMDCs es sensible a la inhibición farmacológica de esta quinasa (ver Figura 4.44).

Además de Syk, las PI3K son necesarias para gatillar respuestas del tipo MATS (238, 239). Las PI3K de clase I son requeridas para la polimerización de actina, lo que las hace necesarias en los procesos de cambios de forma celular, adherencia, e inicio de la fagocitosis (130, 255). Así, se propone que la interacción con las partículas que señalizan por MATS involucra a PI3K, necesaria para el anclaje extracelular (239). Se ha reportado que la señalización MATS inducida por la alúmina es sensible a inhibidores farmacológicos de PI3K y del reordenamiento de los microfilamentos de actina (239). La inhibición farmacológica de PI3K, así como la de Syk, impide la aparición de una interacción fuerte (medida por microscopía de fuerza atómica) entre la célula y el sólido, sugiriendo que además de ser activadas por la interacción, Syk y PI3K son necesarias para la misma, es decir que hay asas de retroalimentación en el mecanismo (238, 239). Nuestros resultados muestran que la actividad de las PI3K de clase I es necesaria para que pLL ejerza cualquiera de sus efectos estudiados sobre BMDCs. Por otra parte, los inhibidores de PI3K de clase III no afectaron la actividad de pLL sobre BMDCs, sugiriendo que la misma no requiere de fagocitosis ni maduración del fagosoma (255). En otras palabras, los datos con inhibidores farmacológicos, junto con las observaciones al microscopio sugieren que la fagocitosis no es necesaria, pero sí el contacto a nivel de membrana plasmática. La necesidad de reordenamiento de actina para una interacción en superficie también explicaría el hecho de que la actividad de pLL se anula en presencia del inhibidor de la polimerización de filamentos de actina, citocalasina D, pese a no observarse fagocitosis.

Se ha propuesto que para la señalización por MATS son importantes propiedades fisicoquímicas de los materiales, en particular, su rigidez y la polaridad (necesaria para la interacción con las cabezas polares de los lípidos de membrana) (238). En concordancia con esto, los tratamientos de pLL con DTT o pronasa, que facilitan su solubilización por sonicación (26), y entonces presumiblemente afectan sus propiedades fisicoquímicas, induce la pérdida parcial de actividad sobre BMDCs. Además, el hecho que la superficie de pLL sea rica en carbohidratos y por lo tanto polar, hace concebible que la misma interactúe con las cabezas polares de los lípidos de membrana.

Todos los materiales particulados que se han propuesto señalizan a través de MATS, incluyendo alúmina, cristales de urato monosódico, cristales de fosfato de calcio y cristales de colesterol, activan el inflamasoma NLRP3 (127, 238, 239, 253, 254). Estudios realizados

por la Dra. Casaravilla indican que pLL es un fuerte activador del inflamasoma NLRP3 en BMDCs previamente estimuladas con LPS. Entonces, el servir como segundas señales para la activación del inflamasoma NLRP3 es otra característica que comparte pLL con los materiales que se han propuesto señalizan a través de MATS. Adicionalmente, se ha reportado que algunos de esos materiales aumentan la expresión de CD86, en ausencia de agonistas de TLR y en forma dependiente de PI3K y del reordenamiento de los filamentos de actina (239), de manera similar a lo que ocurre con pLL.

La activación del inflamasoma NLRP3 por pLL tiene en común con la inducción del fenotipo semi-maduro estudiado en esta Tesis que también es sensible a inhibidores de PI3K de clase I y de Syk, y que también es mucho más débil si pLL fue previamente tratado con DTT. Sin embargo, los resultados de la Dra. Casaravilla también muestran que la inducción del fenotipo semi-maduro estudiado en esta Tesis es totalmente independiente de NLRP3 y caspasa-1. Asimismo muestran que la activación del inflamasoma es sensible a los inhibidores de PI3K de clase III. Así, la inducción del fenotipo semi-maduro y la activación del inflamasoma parecen compartir los pasos proximales pero son luego procesos paralelos.

En suma, si bien no hemos realizado experimentos confirmatorios, mucha de la información obtenida en esta Tesis, junto con otros datos del grupo, sugiere la posibilidad de que pLL interactúe con BMDCs (y otros modelos de células mieloides) a nivel de membrana plasmática para inducir el fenotipo semi-maduro, así como otros eventos intracelulares, a través de MATS.

5.6 Integración entre la señalización propuesta que lleva al fenotipo semi-maduro y la posible señalización por MATS en respuesta a pLL

A continuación se discute de qué manera se integran los datos obtenidos al estudiar los cambios en vías de señalización por las que pLL induce el fenotipo semi-maduro en BMDCs con el mecanismo proximal propuesto para los efectos de pLL, MATS.

Como ha propuesto Yan Shi, particularmente para células presentadoras de antígeno, los mecanismos de señalización a través de MATS y los que son a través de receptores, fagocíticos y que inician activación celular, presentarían muchas similitudes, particularmente en sus consecuencias (Figura 5.3) (237). En otras palabras, en ambos casos

habría agrupamientos de balsas lipídicas, y por lo tanto de proteínas de membrana con dominios ITAM con la consiguiente fosforilación de éstos y activación de Syk. Pese a que en muchos sistemas Syk participa en la activación de PI3K, se ha reportado que Syk es un regulador negativo de la vía de PI3K/Akt y la fosforilación de GSK-3 en BMDCs estimuladas con LPS (256). Así, la activación de Syk por MATS podría explicar porqué pLL inhibe la activación de Akt. Los mecanismos por los cuales Syk regula PI3K/Akt/GSK-3 en BMDCs no fueron elucidados, por lo que tampoco aportan al problema abierto de cómo se inhibe la actividad de Akt al estimular BMDCs con pLL. Más allá del mecanismo preciso, el requerimiento de PI3K para dar comienzo a la señalización tipo MATS que conlleva activación de Syk, junto con la regulación negativa de PI3K/Akt por Syk, explicarían el resultado paradójico que la actividad de pLL requiera de PI3K de clase I activas, a la vez que induce inhibición de la fosforilación y actividad de Akt.

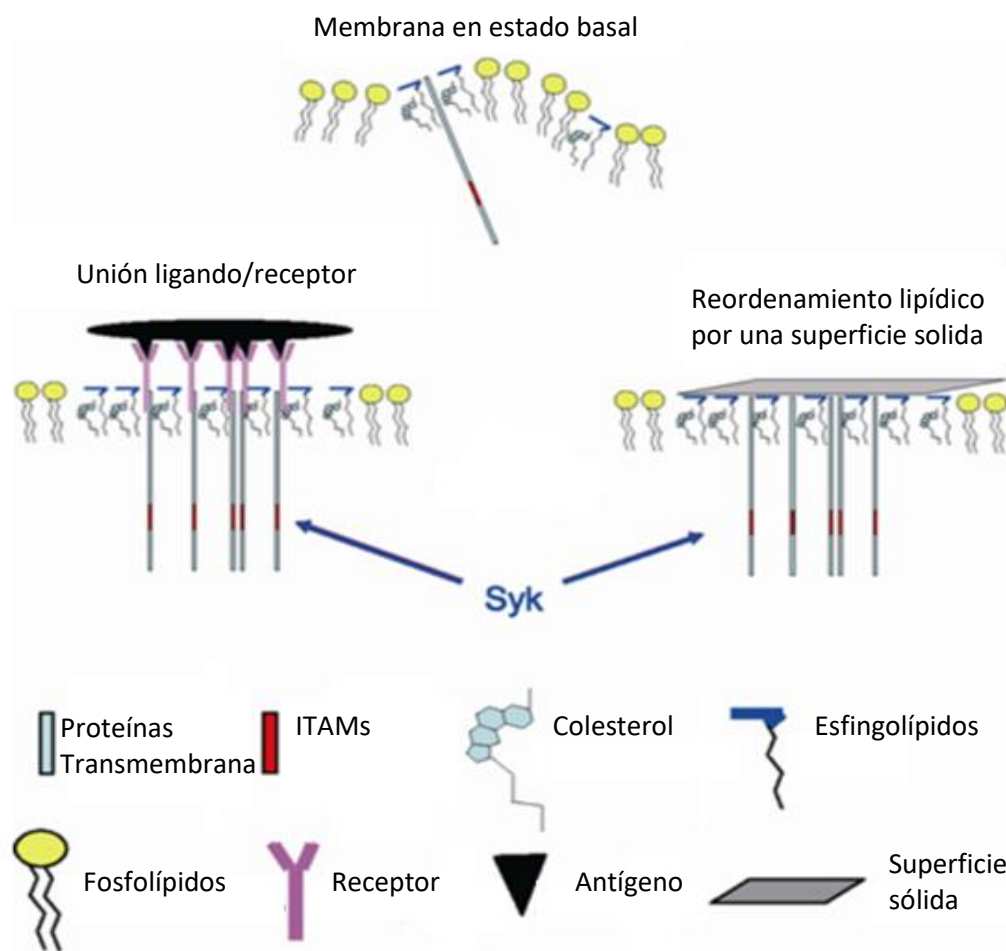


Figura 5.3. Mecanismo hipotético de señalización por MATS y comparación entre la señal disparada por MATS y por la interacción ligando receptor. Los efectos de la unión ligando/receptor y del reordenamiento lipídico por una superficie sólida son muy similares, promoviendo señales parecidas, sino idénticas. Adaptado de(237).

La proteína SHIP1, que está bien establecido es reclutada a motivos inhibitorios ITIM, también puede ser reclutada a motivos activadores ITAM, de manera dependiente de Syk, según se ha reportado recientemente en linfocitos B (187, 257, 258). La señalización por motivos ITIM e ITAM recientemente ha dejado de ser tan dicotómica. Se ha propuesto que motivos ITAM pueden reclutar fosfatasa de tirosinas, que son las principales intermediarias de la respuesta/señalización inhibitoria (259). Los determinantes de si domina la respuesta activadora o inhibitoria seguramente involucren tanto la naturaleza de la señal, como la densidad, la arquitectura y la afinidad/avidez de la unión ligando receptor (258). Extrapolando esta observación a DCs, la señalización por MATS podría reclutar SHIP1 a dominios ITAMs (y quizás también ITIM) y activarla. Esto se conecta con los resultados que sugieren que la actividad de SHIP1 es necesaria para parte de los efectos de pLL sobre BMDCs. El reclutamiento de SHIP1 podría contribuir a la inhibición de la actividad de Akt, aunque como se mencionó anteriormente, los resultados en relación a CD40 sugieren que la mayor parte de dicha inhibición sería independiente de SHIP1.

La aparente contribución de las Igs unidas a pLL a los efectos del material, también podría explicarse por el modelo propuesto, ya que los receptores de Fc activadores señalizan por ITAM y reclutan Syk a membrana plasmática (257). En relación a los efectos de pLL sobre IL-10 y CD86 en particular, que son los más afectados por la eliminación de las Igs, y al mismo tiempo parecen requerir SHIP1, se puede postular una contribución al posible reclutamiento de SHIP1 de motivos ITAM asociados a receptores Fc activadores, nuevamente por analogía con lo reportado en células B (257). Además, los receptores de Fc inhibidores señalizan por motivos ITIM, que reclutan a SHIP1 directamente (Figura 5.4). Este último mecanismo podría explicar la parte del efecto de pLL sobre CD86 que es insensible al inhibidor de Syk piceatannol, notoria sobre todo en condiciones de coestimulación con LPS (ver Figura 4.44). Entonces, basándonos en estos mecanismos propuestos, los efectos de las Igs presentes en pLL sumarían a la actividad mayoritaria, independiente de Igs y debida a MATS. A su vez, estos mecanismos potencialmente en común entre los efectos intrínsecos de la CL y los de las Igs asociadas a partículas explican que el Lx-Igs imite a pLL en términos de aumento en la expresión de IL-10 y CD86. La diferencia mecánica entre los efectos intrínsecos de la CL y los de Igs unidas a superficie (Lx-Igs) se observa cuando se utiliza el inhibidor citocalasina D, ya que presumiblemente la señalización por receptores de Fc no requiere del

reordenamiento de los microfilamentos de actina, mientras que la señalización por el mecanismo MATS sí lo requiere.

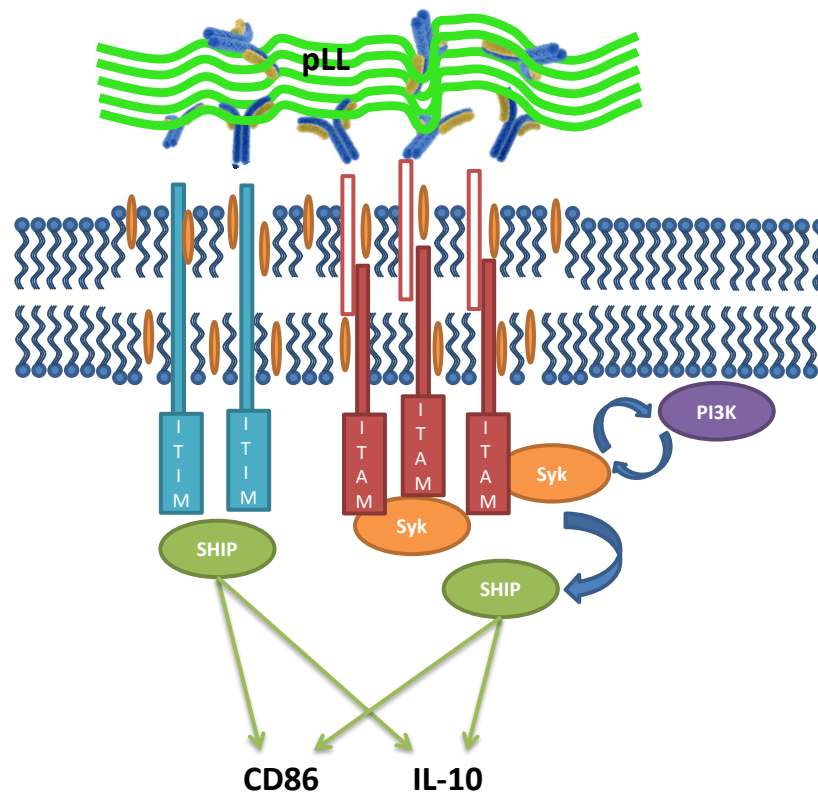


Figura 5.4. Contribución propuesta a nivel de señalización de las Igs asociadas a pLL. Las Igs asociadas a pLL podrían ser capaces de interactuar con receptores de Fc activadores o inhibidores, de esta manera reclutando SHIP a membrana, en forma dependiente e independiente de Syk respectivamente. Tanto los resultados obtenidos en esta Tesis como los publicados con BMDC SHIP^{-/-} indican que SHIP es un regulador positivo de CD86 e IL-10. Además, los resultados de la Tesis sugieren que una (pequeña) parte de los efectos de pLL sobre CD86 e IL-10 se deberían a las Igs asociadas.

En resumen, se plantea a nivel de hipótesis que la malla mucínica de pLL podría generar en DCs y macrófagos señalización a través de MATS, al interactuar directamente con lípidos de membrana plasmática. Esto gatillarían una señal que involucra a Syk y a PI3K. La activación de Syk, por mecanismos desconocidos, inhibiría la vía de PI3K/Akt en un punto por debajo de los receptores específicos para agonistas de PI3K. Esto último explicaría la inhibición de la fosforilación de Akt observada en presencia de pLL frente a diferentes agonistas, así como la inhibición en la fosforilación de GSK-3. Esta inhibición de la fosforilación de Akt y GSK-3 es responsable de la inhibición en la expresión de CD40. Por otra parte, SHIP1, por sus capacidades reguladoras de la respuesta inmune celular, ejercería los efectos sobre la expresión de CD86, IL-10 e IL-12 (figura 5.5). Este modelo admite, como se mencionó, que

parte de la actividad que observamos en pLL sea mediada por las Igs adsorbidas, las cuales serían reconocidas por los FcRs expresados en las BMDCs, tanto activadores (reclutando a Syk y quizás a SHIP1), como inhibitorios (reclutando SHIP1 independientemente de Syk).

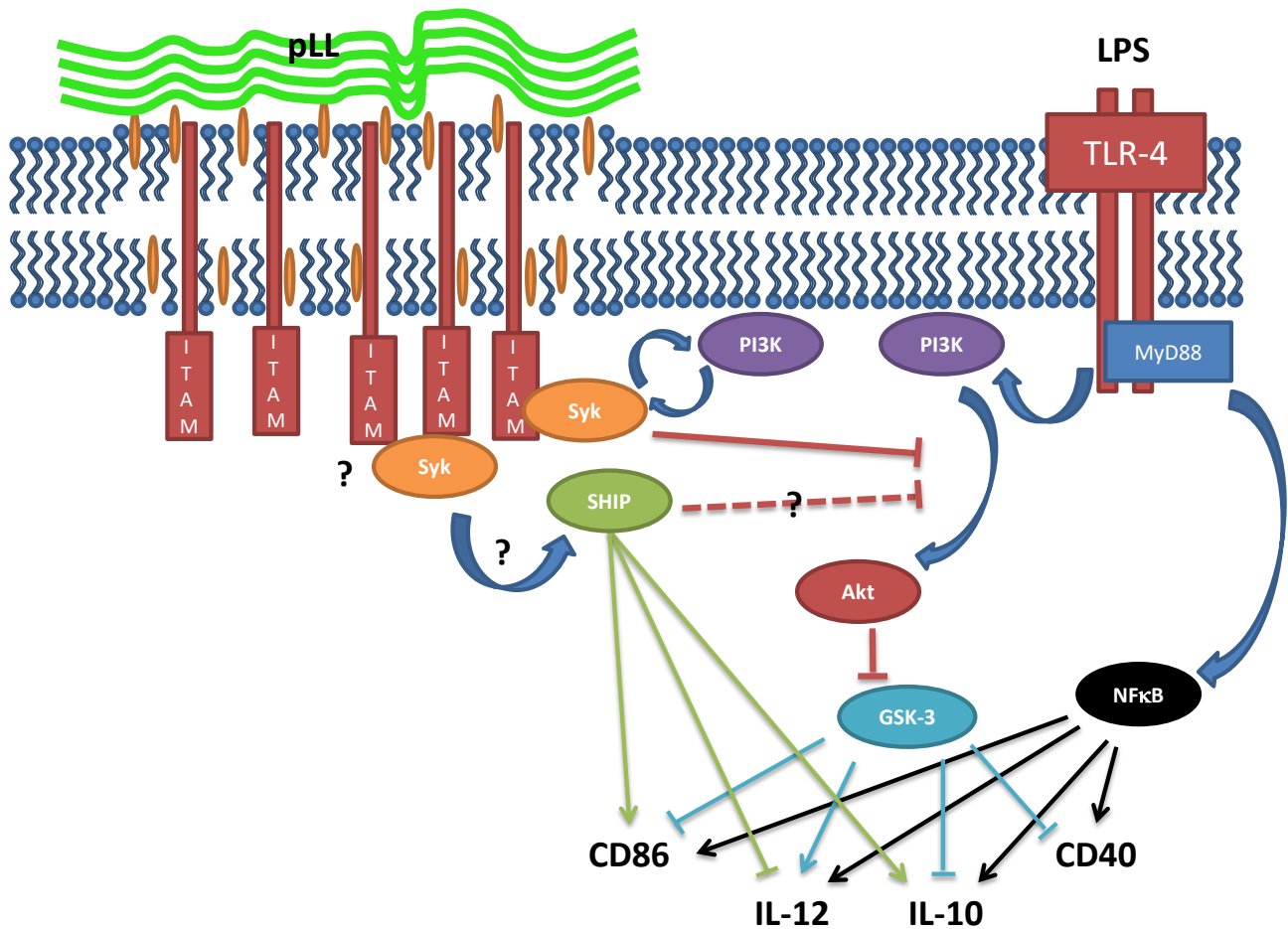


Figura 5.5. Eventos de señalización propuestos inducidos por pLL (sin considerar las Igs asociadas) y efectos a nivel de citoquinas y moléculas coestimuladoras, en el contexto de coestimulación con LPS. La señalización propuesta a través de MATS reclutaría Syk y PI3K a membrana plasmática. Esto a su vez, podría reclutar SHIP de manera dependiente de Syk. Syk puede regular negativamente PI3K/Akt, por mecanismos desconocidos y tendría esta actividad en el contexto de estimulación por pLL. SHIP es un inhibidor conocido de PI3K/Akt, si bien en el conjunto de los resultados de la Tesis no parece ser central en la inhibición de Akt.

5.7 Efectos de pLL sobre el metabolismo y sobre la producción de óxido nítrico en BMDCs.

Se evaluó si pLL afectaba el estado metabólico de las BMDCs, tanto en presencia como en ausencia de LPS. En presencia de LPS, a pesar de inhibir la activación de Akt, pLL no inhibe el cambio tardío hacia glicólisis aeróbica, ni rescata la disfunción mitocondrial causada por el LPS. Ya que el mediador inducido por LPS responsable de inhibir la respiración mitocondrial es el NO (212), el resultado anterior es acompañado por la observación que pLL no inhibe, sino que aumenta, la producción de NO inducida en presencia de LPS (ver Figura 4.46). Si bien para la producción de NO no se realizó en esta Tesis un análisis similar al realizado para las moléculas de coestimulación y las citoquinas, se ha reportado que GSK-3 es un regulador positivo de la expresión de iNOS, y por lo tanto de la producción de NO, en macrófagos (260–262). Además, está reportado que SHIP1 es un regulador positivo muy potente de la producción de NO en BMDCs diferenciadas por GM-CSF (263). De esta manera, es posible que el aumento en la producción de NO inducido por pLL en presencia de LPS derive de la inhibición de la actividad de Akt y consiguiente activación de GSK-3, o de la activación propuesta de SHIP1, o de ambas. Los resultados también indican que los efectos de pLL sobre la activación inducida por LPS no se explican por inhibición del cambio a glicólisis aeróbica. Por otro lado, los resultados indican que pLL *per se* es capaz de inducir un aumento en ECAR temprano, que probablemente se deba a un aumento de flujo en la vía glucolítica. Lo conocido es que el nivel de glucólisis en células mieloides depende de la actividad de mTORC1 (264–266). Por lo tanto, en asociación con nuestros otros resultados que muestran inhibición de este complejo (al menos luego de coestimulación con LPS) esta observación es inesperada, y amerita un análisis en mayor profundidad.

5.8 Desglose de los efectos de las PI3K de clase I y III sobre la producción de citoquinas en BMDCs estimuladas con agonistas de TLR

Finalmente, los ensayos realizados con los inhibidores farmacológicos de las distintas clases de PI3Ks permitieron diseccionar las actividades de las PI3K de clase I y la PI3K de clase III (VPS34) en respuesta a LPS en BMDCs. El eje PI3K/Akt/GSK-3 en BMDCs estimuladas con LPS aumenta la producción de IL-10 e inhibe la producción de IL-12 (165). Sin embargo, la utilización de un inhibidor general de PI3K (wortmanina) en BMDCs estimuladas con LPS no

inhibió la producción de IL-10, generando un resultado controversial, sobre el cual ya existían datos publicados (267). La utilización de inhibidores específicos para las PI3K de clase I y de clase III indicó comportamientos opuestos en la regulación por estas quinasas de la producción de IL-10 inducida por LPS. La inhibición de las PI3K de clase I, efectivamente bajó la producción de IL-10, mientras que la inhibición de la PI3K de clase III la potenció. Este resultado indica que la actividad de las PI3K de clase III regula de forma negativa la producción de IL-10 inducida por LPS. Además, se observó que la PI3K de clase III regula negativamente la producción de otras citoquinas (TNF- α , IL-12, IL-6), tanto en presencia de LPS como en presencia de Pam3CSK4 (agonista de TLR2).

El resultado paradójico obtenido con la wortmanina deriva entonces de que este inhibidor general de PI3K, si bien a través de inhibir las PI3K de clase I tiende a bajar la producción de IL-10, al mismo tiempo tiende a potenciar la producción de la citoquina al inhibir la PI3K de clase III. En concordancia, se observaron resultados muy similares al utilizar una mezcla de inhibidores de PI3K de clase I y III o wortmanina.

En conjunto estos resultados indican que la inhibición de la PI3K de clase III causa aumento en la producción de varias citoquinas convencionales secretadas en BMDCs estimuladas con agonistas de TLRs. Los mecanismos por los cuales la PI3K de clase III inhibe la producción de citoquinas no son obvios. La PI3K de clase III es necesaria para el tráfico vesicular, y otras funciones celulares básicas, por lo que el mecanismo que subyace a esta observación podría ser complejo (53). Sin embargo, una hipótesis interesante deriva de que la PI3K de clase III es necesaria para el proceso de autofagia, el cual consume membrana del retículo endoplasmático presumiblemente disminuyendo la síntesis de proteínas secretorias, y más en general es un programa celular antagónico con la biosíntesis (268, 269)). En esta hipótesis entonces, la inhibición de la PI3K de clase III, a través de la inhibición de la autofagia, daría lugar a un aumento general la síntesis proteica, y en particular la de proteínas secretadas (incluyendo citoquinas).

5.9 Perspectivas

Los resultados de esta Tesis funcionan como gatillo para nuevas interrogantes. A continuación se plantean algunas de estas interrogantes, y a partir de ellas, perspectivas para la continuación de este trabajo:

I. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares por los que pLL inhibe la fosforilación de Akt? En este contexto, es importante evaluar si pLL también inhibe la fosforilación de Akt en la posición Thr308 además de en la Ser473. Si bien se realizaron experimentos preliminares que sugieren que pLL es capaz de inhibir también la fosforilación de Akt en Thr308 en presencia de LPS (datos no mostrados), la visualización de este evento de fosforilación resultó difícil. También sería útil cuantificar los niveles de PIP3 en BMDCs estimuladas con o sin pLL, en presencia o ausencia de LPS. Además, sería interesante estudiar si pLL afecta la estabilidad de las PI3K de clase I, y/o de los adaptadores que las reclutan, por cuantificación de proteína total. Como se mencionó en la sección 1.3.3.2, tanto las subunidades de PI3K como los adaptadores que reclutan estas subunidades pueden ser regulados a nivel de proteína total por ubiquitinación y degradación por proteosoma (170, 171, 270, 271). En macrófagos en particular, los adaptadores IRS1/2, responsables de la activación de PI3K en respuesta a factores de crecimiento e IL-4, pueden ser degradados en determinadas condiciones, con la consiguiente inhibición de la vía de PI3K/Akt (186); esto se ve acompañado de inhibición de la vía en respuesta a LPS, abriendo la posibilidad de degradación también del adaptador BCAP. Entonces, de observarse efectos de pLL a nivel de proteínas totales, se podría explorar si los mismos se revierten en presencia de inhibidores del proteosoma. Por último en esta parte, se debería analizar la contribución de SHIP1 a la inhibición de la fosforilación de Akt, idealmente utilizando BMDCs SHIP1 $-/-$. Todos estos posibles experimentos apuntan a investigar la posibilidad, considerada más probable, que la inhibición causada por pLL ocurra mecanísticamente *upstream* del reclutamiento a membrana plasmática y activación de Akt. Pero también se ha reportado que la fosfatasa PP2A desfosforila Akt en ambas posiciones (preferentemente en la Thr308) en BMDCs (128)). Entonces también resultaría interesante evaluar la actividad de la fosfatasa PP2A en células estimuladas con o sin pLL, en presencia o ausencia de LPS, así como efectos de inhibidores de esta fosfatasa. Una vez que se hayan elucidado los mecanismos por los cuales

pLL inhibe la fosforilación de Akt, sería interesante estudiar si los mismos mecanismos se encuentran presentes en los diferentes modelos celulares estudiados en esta Tesis. De esta manera, se podría también responder la interrogante de por qué pLL causa distintos efectos en los diferentes modelos celulares, con referencia en particular a las diferencias en su capacidad de inhibir la fosforilación de Akt y la expresión de CD40.

II. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos de pLL sobre CD86, IL-10 e IL-12, y en particular, cuál es la participación de SHIP1 en los mismos? Para determinar si la actividad de esta fosfatasa es regulada por pLL, se podría explorar la fosforilación y/o el reclutamiento a membrana plasmática de SHIP1, o se podría realizar una cinética cuantitativa de los niveles de su producto, PI(3,4)P₂, en BMDCs estimuladas con pLL. Además, de tener accesibilidad nuevamente a ratones SHIP1 ^{-/-}, sería importante evaluar si en BMDCs SHIP1 ^{-/-} pLL inhibe la fosforilación de Akt inducida por LPS.

III. ¿El fenotipo semi-maduro de BMDCs estudiado depende solamente de las señales que se gatillan directamente por el contacto con pLL, o existe contribución de señales de tipo parácrino? Para esto se podría realizar un experimento con insertos porosos (*transwells*), separando BMDCs en contacto con pLL de BMDCs sin dicho contacto. De observarse que las BMDC que no están en contacto con las partículas son igualmente condicionadas, sería interesante analizar la participación en los efectos, en particular, de la IL-10, cuya producción es potenciada por pLL. Se ha reportado que en células mieloides la producción de IL-12 y CD40 es inhibida por la presencia de IL-10 (72, 249). Esto abre la posibilidad que la potenciación de IL-10 mediada por pLL contribuya a la inhibición de IL-12 y CD40, si bien como se mencionó en la sección 5.4, algunos de los resultados de esta Tesis sugieren que esta contribución debe ser en todo caso pequeña. Este problema se podría analizar directamente, en ensayos utilizando BMDCs IL-10^{-/-} o IL-10R^{-/-}, o en presencia de un anticuerpo bloqueante de la IL-10 o del receptor de IL-10.

IV. ¿Cómo se puede conciliar una actividad dependiente de PI3K con un efecto inhibitorio de PI3K/Akt? La inducción de CD86 por pLL, en ausencia de (otros) agonistas de la vía de PI3K (en esta Tesis, LPS), requiere de la actividad de PI3K. Esto sugiere que pLL activa PI3K en alguna etapa de los mecanismos por los que ejerce su actividad. A su vez, pLL induce la inhibición de la vía de PI3K/Akt. Si bien no estamos seguros de que la inhibición de esta vía

ocurra a nivel de PIP3 (o directamente sobre Akt), es probable que sea a nivel de PIP3, ya que según datos preliminares pLL es capaz de inhibir la fosforilación de Akt en ambas posiciones, Ser473 y Thr308. Esto a su vez lleva a razonar que podría existir una retroalimentación negativa que mantenga la intensidad de señalización por pLL en un nivel ni demasiado alto, ni demasiado bajo. En esta retroalimentación, la inhibición de PI3K haría disminuir la fuerza de interacción y por lo tanto los propios eventos (por ejemplo dependientes de Syk) que causan la inhibición de la vía. En concordancia, pLL atenúa la fosforilación de Akt en respuesta a estímulos pero nunca la anula totalmente, y (excepto a dosis muy altas) no causa muerte celular.

V. ¿pLL efectivamente señala a través de MATS? Para esto se podría medir la fuerza de unión entre pLL y BMDCs por microscopia de fuerza atómica, en ausencia y presencia de inhibidores de PI3K de clase I y Syk, en forma similar a lo realizado para alúmina y cristales de urato monosódico (238, 239). También se podría eliminar el colesterol de membrana plasmática de BMDCs (utilizando por ejemplo ciclodextrinas (272)) y evaluar sobre estas células la actividad de pLL. En forma similar, sería interesante tratar a las BMDCs levemente con proteasas (para degradar los receptores de membrana) y determinar si responden al estímulo de pLL. En este caso se exploraría la expresión de CD86 únicamente (ya que los TLR estarían degradados). También se podría explorar si pLL induce la fosforilación de Syk en BMDCs, en presencia o en ausencia de LPS. De confirmarse que pLL señala por MATS, sería el primer material de origen de patógenos reportado que señalice a través de este tipo de interacción. Sería interesante realizar estudios comparativos entre pLL y materiales particulados que se ha propuesto señalizan por MATS. Este tipo de análisis podría por ejemplo contribuir a explicar por qué otros particulados como la alúmina (un adyuvante ampliamente utilizado) induce potenciación de IL-10 en presencia de agonistas de TLRs (273).

VI. ¿Qué funcionalidad presentan las BMDCs estimuladas con pLL? a nivel de especulación, la inhibición de la expresión de CD40 e IL-12 y el aumento en la producción de IL-10 relacionan a las BMDCs estimuladas con pLL con funciones reguladoras. La inducción de CD40 en DCs activadas es muy importante para su inmunoregulación; por ejemplo se ha demostrado que al bloquear la señalización de CD40 aumenta el potencial tolerogénico de las células presentadoras de antígeno en enfermedades autoinmunes o trasplantes (274,

275). Además, como se mencionó anteriormente, la IL-12 es una citoquina polarizante de una respuesta Th1, mientras que la IL-10 es una citoquina con efectos anti-inflamatorios (276). Estudiar funcionalmente a las BMDCs condicionadas con pLL, si bien es crucial, presenta una dificultad particular, y es que la densidad de las partículas de pLL y las BMDCs son muy parecidas, lo que no permite separar células de partículas por centrifugación luego del paso de condicionamiento. La separación de BMDCs utilizando *beads* magnéticas recubiertas con una lectina que reconoce pLL, tampoco es una estrategia utilizable, ya que la incubación con agitación requerida hace que las BMDCs se activen, en términos de moléculas de superficie (datos de la Dra. Cecilia Casaravilla). En este momento la Lic. Yamila Martínez, en el grupo, está poniendo a punto el condicionamiento de BMDC por partículas de CL de mayor tamaño que las empleadas en esta Tesis. Estas partículas generan un fenotipo muy similar al inducido por pLL y pueden ser separadas de las DC por decantación. Esto permitirá evaluar la capacidad de las DCs condicionadas por la CL de inducir/polarizar respuesta T, en co-cultivos o *in vivo* por transferencia de DCs.

VII. ¿La estimulación de BMDCs con pLL altera la sobrevivencia de estas células? Otro aspecto sobre el cual puede influir la actividad de Akt en la biología de las DCs es la sobrevivencia celular. Se ha demostrado que la activación de Akt en DCs, y en BMDCs en particular, promueve la sobrevivencia celular (136). En este artículo en particular, se observó que la estimulación con LPS aumenta la sobrevivencia de BMDCs a través de la activación de la vía de PI3K/Akt (136). De esta manera, la inhibición de Akt inducida por pLL en presencia de LPS probablemente disminuya la sobrevivencia de las BMDCs en comparación con el tratamiento con LPS solamente. Este efecto también regularía de forma negativa la capacidad de las DCs de inducir respuestas adaptadoras.

VIII. ¿Hasta qué punto los procesos estudiados en BMDCs, ocurren en DCs, *in vivo*? En esta Tesis se trabajó con BMDCs, que son modelos de mo-DCs inflamatorias. Debido a las diferentes subpoblaciones de DCs presentes *in vivo*, resulta de interés evaluar los efectos de pLL sobre otros modelos de DCs *in vitro*, o directamente sobre DCs *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, Yamila Martínez ha comenzado a explorar el efecto de pLL sobre FltL3-DCs. Además, cuando se inyecta en ratones por vía intraperitoneal, pLL con o sin LPS, las DCs peritoneales recuperadas a las 24 horas muestran cambios en moléculas de superficie similares a los observados en BMDCs *in vitro*, pero con inhibición más débil de

CD40. Sería interesante realizar estudios cinéticos, *in vivo*, analizando si los efectos de pLL son diferentes sobre DCs residentes y reclutadas/inflamatorias, complementando con medidas de la fosforilación de Akt por citometría de flujo.

IX. ¿Cuál es la relevancia del fenotipo de DCs inducido por la CL en la infección por *E. granulosus*? En nuestro modelo se estimula BMDCs con pLL en presencia de un agonista de TLR. Es razonable postular que en infección por *E. granulosus*, las DCs locales también se encuentren estimuladas por agonistas de TLRs, en particular por DAMPs (del inglés, *Damage-associated molecular patterns*) generados por el crecimiento de la hidátide; además, en infecciones localizadas en el hígado también es importante considerar el influjo de LPS vía vena porta (277). El sesgo fenotípico inducido por pLL sobre la maduración inducida por LPS se observa también sobre la maduración inducida por agonistas de TLR2 o TLR9 ((103) y datos de la Dra. Cecilia Casaravilla). Esto incluye una fuerte inhibición de la inducción de CD40. Sería interesante ampliar los estudios sobre señalización a la coestimulación con diferentes agonistas de TLRs, evaluando en particular si pLL inhibe la fosforilación de Akt en presencia de los mismos. Más directamente sería importante analizar el fenotipo y el nivel de fosforilación de Akt de DCs en infecciones por este helminto, y compararlas con nuestro modelo.

6 Referencias

1. Thompson RCA (1995) Biology and systematics of Echinococcus. *Echinococcus and Hydatid Disease*, eds Thompson RCA, Lymbery AJ (CAB International, Wallingford), pp 1–50.
2. Torgerson PR, Carmona C, Bonifacio R (2000) Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol* 94(7):703–13.
3. Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW (2014) Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. *Int J Parasitol* 44(1):9–18.
4. Cucher MA, et al. (2016) Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of Echinococcus granulosus sensu lato in humans and natural domestic hosts. *Trop Med Int Health* 21(2):166–75.
5. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A (2013) Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae). *Int J Parasitol* 43(12–13):1017–1029.
6. Moro P, Schantz PM (2009) Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 13(2):125–33.
7. CDC C f. DC a. PP-E-B (2012) No Title. Available at: <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>.
8. Díaz A, et al. (2011) Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: structure. *Trends Parasitol* 27(5):204–213.
9. Díaz A, Casaravilla C, Allen JE, Sim RB, Ferreira AM (2011) Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology. *Trends Parasitol* 27(6):264–73.
10. Bortoletti G, Ferretti G (1978) Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of Echinococcus granulosus developed in hosts of different species. *Int J Parasitol* 8(6):421–431.
11. Rausch RL, D'Alessandro A, Rausch VR (1981) Characteristics of the larval Echinococcus vogeli Rausch and Bernstein, 1972 in the natural intermediate host, the paca, Cuniculus paca L. (Rodentia: Dasyproctidae). *Am J Trop Med Hyg* 30(5):1043–1052.
12. Reuben JM, Tanner CE, Rau ME (1978) Immunoprophylaxis with BCG of experimental Echinococcus multilocularis infections. *Infect Immun* 21(1):135–9.

13. Richards KS, Arme C, Bridges JF (1983) Echinococcus granulosus equinus: an ultrastructural study of the laminated layer, including changes on incubating cysts in various media. *Parasitology* 86(Pt 3):399–405.
14. Irigoín F, Ferreira F, Fernandez C, Sim RB, Díaz A (2002) myo-Inositol hexakisphosphate is a major component of an extracellular structure in the parasitic cestode Echinococcus granulosus. *Biochem J* 362(Pt 2):297–304.
15. Casaravilla C, et al. (2006) Characterization of myo-inositol hexakisphosphate deposits from larval Echinococcus granulosus. *FEBS J* 273:3192–3203.
16. Irigoín F, et al. (2004) Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval Echinococcus granulosus. *J Cell Biochem* 93(6):1272–1281.
17. Richards KS (1984) Echinococcus granulosus equinus: the histochemistry of the laminated layer of the hydatid cyst. *Folia Histochem Cytobiol* 22(1):21–31.
18. Díaz A, et al. (2009) The major surface carbohydrates of the Echinococcus granulosus cyst: mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures. *Biochemistry* 48(49):11678–91.
19. Lin G, et al. (2013) Further structural characterization of the Echinococcus granulosus laminated layer carbohydrates: the blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains. *Glycobiology* 23(4):438–52.
20. Del Puerto L, et al. (2016) Negligible elongation of mucin glycans with Gal β 1-3 units distinguishes the laminated layer of Echinococcus multilocularis from that of Echinococcus granulosus. *Int J Parasitol* 46(5–6):311–21.
21. Hang HC, Bertozzi CR (2005) The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem* 13(17):5021–5034.
22. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK (2001) Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 6:D1192-206.
23. Parkinson J, et al. (2012) A transcriptomic analysis of Echinococcus granulosus larval stages: implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Negl Trop Dis* 6(12):e1897.
24. Tsai IJ, et al. (2013) The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496(7443):57–63.

25. Zheng H, et al. (2013) The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet* 45(10):1168–1175.
26. Casaravilla C, Díaz A (2010) Studies on the structural mucins of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Mol Biochem Parasitol* 174(2):132–6.
27. Diaz A, Allen JE (2007) Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol* 37(12):3319–3326.
28. Mildner A, Jung S (2014) Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40(5):642–656.
29. O’Garra A, Gabrysova L, Spits H (2011) Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells. *Nat Immunol* 12(4):288–294.
30. Lutz MB (2013) How quantitative differences in dendritic cell maturation can direct T1/T2-cell polarization. *Oncoimmunology* 2(2):e22796.
31. Pletinckx K, Dohler A, Pavlovic V, Lutz MB (2011) Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front Immunol* 2:39.
32. Terhune J, Berk E, Czerniecki B (2013) Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines* 1(4):527–549.
33. Lutz MB (2016) Induction of CD4(+) Regulatory and Polarized Effector/helper T Cells by Dendritic Cells. *Immune Netw* 16(1):13–25.
34. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P (2013) Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol* 4:438.
35. Edelson BT, et al. (2010) Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207(4):823–836.
36. White RR, Artavanis-Tsakonas K (2012) How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence* 3(7):668–677.
37. Reis e Sousa C, et al. (1997) In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell

- areas. *J Exp Med* 186(11):1819–1829.
38. Honda K, et al. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434(7034):772–777.
 39. Pühr S, Lee J, Zvezdova E, Zhou YJ, Liu K (2015) Dendritic cell development-History, advances, and open questions. *Semin Immunol* 27(6):388–396.
 40. Serbina N V, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19(1):59–70.
 41. Segura E, Amigorena S (2013) Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* 34(9):440–445.
 42. Cheong C, et al. (2010) Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143(3):416–429.
 43. Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179(4):1109–1118.
 44. Lutz MB, et al. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223(1):77–92.
 45. Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH (2007) Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 179(11):7577–7584.
 46. Allen JE, Maizels RM (2011) Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol* 11(6):375–388.
 47. Nutman TB (2015) Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunol* 37(6):304–313.
 48. Jia L, Wu C (2014) Differentiation, regulation and function of Th9 cells. *Adv Exp Med Biol* 841:181–207.
 49. Grecis RK (2015) Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Annu Rev Immunol* 33:201–25.

50. Maizels RM, Yazdanbakhsh M (2008) T-cell regulation in helminth parasite infections: implications for inflammatory diseases. *Chem Immunol Allergy* 94:112–123.
51. Yazdanbakhsh M, Matricardi PM (2004) Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin Rev Allergy Immunol* 26(1):15–24.
52. van Rijt LS, et al. (2005) In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201(6):981–991.
53. Phythian-Adams AT, et al. (2010) CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *J Exp Med* 207(10):2089–2096.
54. Ma YL, et al. (2015) IL-4-Producing Dendritic Cells Induced during *Schistosoma japonica* Infection Promote Th2 Cells via IL-4-Dependent Pathway. *J Immunol* 195(8):3769–3780.
55. De Smedt T, et al. (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27(5):1229–1235.
56. Bhattacharyya S, et al. (2004) Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I κ B kinase activity. *Blood* 104(4):1100–9.
57. Pletinckx K, et al. (2011) Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or *Trypanosoma brucei* antigens instruct default Th2-cell responses. *Eur J Immunol* 41(12):3479–3494.
58. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(6):453–460.
59. Lutz MB, Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23(9):445–449.
60. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* 1(4):311–316.
61. Cervi L, MacDonald AS, Kane C, Dzierzinski F, Pearce EJ (2004) Cutting edge: dendritic cells copulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *J Immunol* 172(4):2016–2020.
62. Amsen D, et al. (2004) Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands

- on antigen-presenting cells. *Cell* 117(4):515–526.
63. Jenkins SJ, Perona-Wright G, Worsley AGF, Ishii N, MacDonald AS (2007) Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J Immunol* 179(6):3515–23.
 64. Na H, Cho M, Chung Y (2016) Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells. *Immune Netw* 16(1):1–12.
 65. Williams JW, et al. (2013) Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat Commun* 4:2990.
 66. Takenaka MC, Quintana FJ (2016) Tolerogenic dendritic cells. *Semin Immunopathol*. doi:10.1007/s00281-016-0587-8.
 67. Munn DH, et al. (2002) Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Science (80-)* 297(5588).
 68. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT (2001) Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2(8):725–731.
 69. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685–711.
 70. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ (2016) Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends Immunol* 37(7):427–39.
 71. Mascanfroni ID, et al. (2013) IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol* 14(10):1054–63.
 72. McBride JM, Jung T, de Vries JE, Aversa G (2002) IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol* 215(2):162–172.
 73. Mitra RS, Judge TA, Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ (1995) Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J Immunol* 154(6):2668–77.
 74. Husaarts L, Yazdanbakhsh M, Guigas B (2014) Priming dendritic cells for th2 polarization: lessons learned from helminths and implications for metabolic disorders. *Front Immunol* 5:499.

75. Meevissen MH, Yazdanbakhsh M, Hokke CH (2012) Schistosoma mansoni egg glycoproteins and C-type lectins of host immune cells: molecular partners that shape immune responses. *Exp Parasitol* 132(1):14–21.
76. van Liempt E, et al. (2007) Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol* 44(10):2605–2615.
77. Jankovic D, Steinfeld S, Kullberg MC, Sher A (2006) Mechanisms underlying helminth-induced Th2 polarization: default, negative or positive pathways? *Chem Immunol Allergy* 90:65–81.
78. Kane CM, et al. (2004) Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *J Immunol* 173(12):7454–7461.
79. Rodriguez E, et al. (2015) Glycans from Fasciola hepatica Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells. *PLoS Negl Trop Dis* 9(12):e0004234.
80. Ravid A, et al. (2016) Fasciola hepatica Surface Coat Glycoproteins Contain Mannosylated and Phosphorylated N-glycans and Exhibit Immune Modulatory Properties Independent of the Mannose Receptor. *PLoS Negl Trop Dis* 10(4):e0004601.
81. Carvalho L, et al. (2009) Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology* 126(1):28–34.
82. Everts B, Smits HH, Hokke CH, Yazdanbakhsh M (2010) Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J Immunol* 40(6):1525–1537.
83. Martin I, Caban-Hernandez K, Figueroa-Santiago O, Espino AM (2015) Fasciola hepatica fatty acid binding protein inhibits TLR4 activation and suppresses the inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* 194(8):3924–3936.
84. Shen J, et al. (2014) Gene expression profile of LPS-stimulated dendritic cells induced by a recombinant Sj16 (rSj16) derived from Schistosoma japonicum. *Parasitol Res* 113(8):3073–3083.
85. Terrazas CA, Alcantara-Hernandez M, Bonifaz L, Terrazas LI, Satoskar AR (2013) Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR

- response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB J* 27(11):4547–4560.
86. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn Jr. DA (1999) Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 163(12):6712–6717.
 87. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD (2014) Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol* 16(2):185–194.
 88. Everts B, et al. (2009) Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J Exp Med* 206(8):1673–1680.
 89. Nono JK, et al. (2012) Excretory/Secretory-Products of *Echinococcus multilocularis* Larvae Induce Apoptosis and Tolerogenic Properties in Dendritic Cells In Vitro. *PLoS Negl Trop Dis* 6(2):e1516.
 90. Mejri N, Muller J, Gottstein B (2011) Intraperitoneal murine *Echinococcus multilocularis* infection induces differentiation of TGF-beta-expressing DCs that remain immature. *Parasite Immunol* 33(9):471–482.
 91. Mejri N, Muller N, Hemphill A, Gottstein B (2011) Intraperitoneal *Echinococcus multilocularis* infection in mice modulates peritoneal CD4+ and CD8+ regulatory T cell development. *Parasitol Int* 60(1):45–53.
 92. Pan W, et al. (2013) Surveillance on the status of immune cells after *Echinococcus granulosus* protoscoleces infection in Balb/c mice. *PLoS One* 8(3):e59746.
 93. Rickard MD, Williams JF (1982) Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv Parasitol* 21:229–296.
 94. Tamarozzi F, Mariconti M, Neumayr A, Brunetti E (2016) The intermediate host immune response in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol* 38(3):170–181.
 95. Breijo M, Anesetti G, Martinez L, Sim RB, Ferreira AM (2008) *Echinococcus granulosus*: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Exp Parasitol* 118(2):188–196.
 96. Tuxun T, et al. (2012) Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis. *Parasite Immunol* 34(11):520–527.
 97. Wang H, et al. (2014) *Echinococcus granulosus* infection reduces airway inflammation of mice

- likely through enhancing IL-10 and down-regulation of IL-5 and IL-17A. *Parasit Vectors* 7:522.
98. Pang N, et al. (2014) Th9/IL-9 profile in human echinococcosis: their involvement in immune response during infection by *Echinococcus granulosus*. *Mediat Inflamm* 2014:781649.
 99. Soufli I, et al. (2015) Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *J Inflamm* 12:19.
 100. Steers NJ, Rogan MT, Heath S (2001) In-vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production. *Parasite Immunol* 23(8):411–417.
 101. Amri M, Touil-Boukoffa C (2015) A protective effect of the laminated layer on *Echinococcus granulosus* survival dependent on upregulation of host arginase. *Acta Trop* 149:186–194.
 102. Ferreira AM, Irigoien F, Breijo M, Sim RB, Diaz A (2000) How *Echinococcus granulosus* deals with complement. *Parasitol Today* 16(4):168–72.
 103. Casaravilla C, et al. (2014) Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval *Echinococcus granulosus*. *Infect Immun* 82(8):3164–3176.
 104. Lutz MB (2012) Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Front Immunol* 3:123.
 105. Frick J-S, Grünebach F, Autenrieth IB (2010) Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol* 300(1):19–24.
 106. Beinke S, Ley SC (2004) Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 382(Pt 2):393–409.
 107. Ouaz F, Li M, Beg AA (1999) A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death. *J Exp Med* 189(6):999–1004.
 108. Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M (2001) Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* 13(5):675–683.
 109. Wang J, et al. (2007) Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells. *J Immunol*

- 178(11):6777–6788.
110. Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188(11):2175–2180.
 111. Sun S-C (2011) Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 21(1):71–85.
 112. Cildir G, Low KC, Tergaonkar V (2016) Noncanonical NF-kappaB Signaling in Health and Disease. *Trends Mol Med* 22(5):414–429.
 113. Baer M, et al. (1998) Tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages is attenuated by an autocrine factor that preferentially induces NF-kappaB p50. *Mol Cell Biol* 18(10):5678–89.
 114. Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ (2004) Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 135(1):64–73.
 115. Ishikawa H, et al. (1998) Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *J Exp Med* 187(7):985–96.
 116. Saccani A, et al. (2006) p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res* 66(23):11432–40.
 117. Dumitru CD, et al. (2000) TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103(7):1071–83.
 118. Banerjee A, Gugasyan R, McMahon M, Gerondakis S (2006) Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9):3274–9.
 119. Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, Ley SC (2004) Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Mol Cell Biol* 24(21):9658–67.
 120. Peti W, Page R (2013) Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci* 22(12):1698–710.

121. Krishna M, Narang H (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 65(22):3525–44.
122. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5):373–384.
123. Kaiser F, et al. (2009) TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J Exp Med* 206(9):1863–71.
124. Arthur JSC, Ley SC (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13(9):679–92.
125. Kang YJ, et al. (2008) Macrophage Deletion of p38 Partially Impairs Lipopolysaccharide-Induced Cellular Activation. *J Immunol* 180(7):5075–5082.
126. Risco A, et al. (2012) p38 γ and p38 δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(28):11200–5.
127. Adam E, et al. (2010) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 activates DC and prevents house dust mite allergy through a TLR4-dependent pathway. *Eur J Immunol* 40(7):1995–2005.
128. Liao Y, Hung M-C (2010) Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* 2(1):19–42.
129. Hemmings BA, Restuccia DF (2015) The PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(4). doi:10.1101/cshperspect.a026609.
130. Hawkins PT, Stephens LR (2015) PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1851(6):882–897.
131. Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ (2003) The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 116(Pt 15):3037–40.
132. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(3):195–203.
133. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 5):647–62.
134. Koyasu S (2003) The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4(4):313–9.

135. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23(10):1515–1527.
136. Park D, Lapteva N, Seethammagari M, Slawin KM, Spencer DM (2006) An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol* 24(12):1581–90.
137. Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozucic L, Hemmings BA (2010) Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* 346:31–56.
138. Kloet DEA, Burgering BMT (2011) The PKB/FOXO switch in aging and cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1813(11):1926–1937.
139. Weichhart T, et al. (2009) The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends Immunol* 30(5):218–26.
140. Xie X, et al. (2011) IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(16):6474–9.
141. Joung SM, et al. (2011) Akt Contributes to Activation of the TRIF-Dependent Signaling Pathways of TLRs by Interacting with TANK-Binding Kinase 1. *J Immunol* 186(1):499–507.
142. Mahajan K, Mahajan NP (2012) PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol* 227(9):3178–84.
143. Everts B, et al. (2014) TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKε supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol* 15(4):323–32.
144. Hutti JE, et al. (2012) Development of a high-throughput assay for identifying inhibitors of TBK1 and IKKε. *PLoS One* 7(7):e41494.
145. Antignano F, et al. (2010) SHIP Is Required for Dendritic Cell Maturation. *J Immunol* 184(6):2805–2813.
146. Zhang Y, et al. (2013) Kinase AKT controls innate immune cell development and function. *Immunology* 140(2):143–52.
147. Basquin C, et al. (2013) The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *J Cell Sci* 126(Pt 5):1099–108.
148. Costa C, Germena G, Hirsch E (2010) Dissection of the Interplay between Class I PI3Ks and Rac Signaling in Phagocytic Functions. *Sci World J* 10:1826–1839.

149. Schlam D, et al. (2015) Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating proteins. *Nat Commun* 6:8623.
150. Ni M, et al. (2012) B-cell adaptor for PI3K (BCAP) negatively regulates Toll-like receptor signaling through activation of PI3K. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(1):267–72.
151. Troutman TD, et al. (2012) Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(1):273–8.
152. Troutman TD, Bazan JF, Pasare C (2012) Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* 11(19):3559–67.
153. Hazeki K, Nigorikawa K, Hazeki O (2007) Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biol Pharm Bull* 30(9):1617–1623.
154. Dibble CC, Cantley LC (2015) Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* 25(9):545–55.
155. Hamerman JA, et al. (2016) Negative regulation of TLR signaling in myeloid cells-implications for autoimmune diseases. *Immunol Rev* 269(1):212–227.
156. Sly LM, et al. (2004) LPS-Induced Upregulation of SHIP Is Essential for Endotoxin Tolerance. *Immunity* 21(2):227–239.
157. Zha L, et al. (2014) Soyasaponins can blunt inflammation by inhibiting the reactive oxygen species-mediated activation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *PLoS One* 9(9):e107655.
158. Venkatesan B, et al. (2010) EMMPRIN activates multiple transcription factors in cardiomyocytes, and induces interleukin-18 expression via Rac1-dependent PI3K/Akt/IKK/NF- κ B and MKK7/JNK/AP-1 signaling. *J Mol Cell Cardiol* 49(4):655–63.
159. Li X, Syrovets T, Simmet T (2012) The serine protease plasmin triggers expression of the CC-chemokine ligand 20 in dendritic cells via Akt/NF- κ B-dependent pathways. *J Biomed Biotechnol* 2012:186710.
160. Manna SK, Aggarwal BB (2000) Wortmannin inhibits activation of nuclear transcription factors NF- κ B and activated protein-1 induced by lipopolysaccharide and phorbol ester. *FEBS Lett* 473(1):113–118.

161. Gustin JA, et al. (2004) Cell Type-specific Expression of the I B Kinases Determines the Significance of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling to NF- B Activation. *J Biol Chem* 279(3):1615–1620.
162. Alessandrini A, et al. (2011) Dendritic cell maturation occurs through the inhibition of GSK-3 β . *Cell Immunol* 270(2):114–25.
163. Guha M, Mackman N (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 277(35):32124–32.
164. Fukao T, et al. (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol* 3(9):875–81.
165. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 6(8):777–84.
166. Ohtani M, et al. (2008) Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 112(3):635–43.
167. Turnquist HR, et al. (2010) mTOR and GSK-3 shape the CD4+ T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS. *Blood* 115(23):4758–69.
168. Weichhart T, et al. (2008) The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 29(4):565–77.
169. Wang H, et al. (2011) Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3- β -signaling pathways regulates the innate inflammatory response. *J Immunol* 186(9):5217–26.
170. Ko HR, et al. (2014) P42 Ebp1 regulates the proteasomal degradation of the p85 regulatory subunit of PI3K by recruiting a chaperone-E3 ligase complex HSP70/CHIP. *Cell Death Dis* 5(3):e1131.
171. Wang Z, et al. (2016) NEDD4L protein catalyzes ubiquitination of PIK3CA protein and regulates PI3K-AKT signaling. *J Biol Chem* 291(33):17467–17477.
172. Hopkins BD, et al. (2014) PTEN function: the long and the short of it. *Trends Biochem Sci*

- 39(4):183–190.
173. Sly LM, et al. (2003) SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* 31(12):1170–1181.
 174. Zhang P, Chen J, Guo X (2012) New insights into PTEN regulation mechanisms and its potential function in targeted therapies. *Biomed Pharmacother* 66(7):485–490.
 175. Hawkins PT, et al. (2016) Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P2 in Class I and II PI3K-regulated pathways. *Biochem Soc Trans* 44(1):307–14.
 176. Hakim S, Bertucci MC, Conduit SE, Vuong DL, Mitchell CA (2012) Inositol polyphosphate phosphatases in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 362:247–314.
 177. Li H, Marshall AJ (2015) Phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate-specific phosphatases and effector proteins: A distinct branch of PI3K signaling. *Cell Signal* 27(9):1789–1798.
 178. Wullschleger S, Wasserman DH, Gray A, Sakamoto K, Alessi DR (2011) Role of TAPP1 and TAPP2 adaptor binding to PtdIns(3,4)P2 in regulating insulin sensitivity defined by knock-in analysis. *Biochem J* 434(2):265–74.
 179. Landego I, et al. (2012) Interaction of TAPP adapter proteins with phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate regulates B-cell activation and autoantibody production. *Eur J Immunol* 42(10):2760–70.
 180. Blunt MD, Ward SG (2012) Targeting PI3K isoforms and SHIP in the immune system: new therapeutics for inflammation and leukemia. *Curr Opin Pharmacol* 12(4):444–51.
 181. O'Neill AK, Niederst MJ, Newton AC (2013) Suppression of survival signalling pathways by the phosphatase PHLPP. *FEBS J* 280(2):572–83.
 182. Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353(Pt 3):417–39.
 183. Kuo Y-C, et al. (2008) Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem* 283(4):1882–92.
 184. Ivaska J, et al. (2002) Integrin alpha 2 beta 1 promotes activation of protein phosphatase 2A

- and dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3 beta. *Mol Cell Biol* 22(5):1352–9.
185. Dey R, et al. (2007) Leishmania donovani-induced ceramide as the key mediator of Akt dephosphorylation in murine macrophages: role of protein kinase C ζ and phosphatase. *Infect Immun* 75(5):2136–42.
 186. Byles V, et al. (2013) The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun* 4:2834.
 187. Condé C, Gloire G, Piette J (2011) Enzymatic and non-enzymatic activities of SHIP-1 in signal transduction and cancer. *Biochem Pharmacol* 82(10):1320–34.
 188. Damen JE, et al. (1996) The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4):1689–93.
 189. Blanco-Menéndez N, et al. (2015) SHIP-1 Couples to the Dectin-1 hemITAM and Selectively Modulates Reactive Oxygen Species Production in Dendritic Cells in Response to *Candida albicans*. *J Immunol* 195(9):4466–78.
 190. Coggeshall K., Nakamura K, Phee H (2002) How do inhibitory phosphatases work? *Mol Immunol* 39(9):521–529.
 191. March ME, Ravichandran K (2002) Regulation of the immune response by SHIP. *Semin Immunol* 14(1):37–47.
 192. Phee H, Jacob A, Coggeshall KM (2000) Enzymatic Activity of the Src Homology 2 Domain-containing Inositol Phosphatase Is Regulated by a Plasma Membrane Location. *J Biol Chem* 275(25):19090–19097.
 193. Fang H, et al. (2004) Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J Immunol* 173(1):360–6.
 194. Cekic C, et al. (2011) MyD88-dependent SHIP1 regulates proinflammatory signaling pathways in dendritic cells after monophosphoryl lipid A stimulation of TLR4. *J Immunol* 186(7):3858–65.
 195. Ruschmann J, et al. (2010) Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation. *Exp Hematol* 38(5):392–402, 402.e1.

196. Beutler B, et al. (2004) SHIP, TGF- β , and Endotoxin Tolerance. *Immunity* 21(2):134–135.
197. An H, et al. (2005) Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism. *Blood* 105(12):4685–92.
198. Hirsch E, Ciruolo E, Ghigo A, Costa C (2008) Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay. *Pharmacol Ther* 118(2):192–205.
199. Jean S, Kiger AA (2014) Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci* 127(Pt 5):923–928.
200. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(5):329–341.
201. Rostislavleva K, et al. (2015) Structure and flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes. *Science (80-)* 350(6257):aac7365.
202. Ktistakis NT, Manifava M, Schoenfelder P, Rotondo S (2012) How phosphoinositide 3-phosphate controls growth downstream of amino acids and autophagy downstream of amino acid withdrawal. *Biochem Soc Trans* 40(1):37–43.
203. Simonsen A, Tooze SA (2009) Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* 186(6):773–782.
204. Kuo CC, Lin WT, Liang CM, Liang SM (2006) Class I and III phosphatidylinositol 3'-kinase play distinct roles in TLR signaling pathway. *J Immunol* 176(10):5943–5949.
205. Bago R, et al. (2014) Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* 463(3):413–427.
206. Ronan B, et al. (2014) A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nat Chem Biol* 10(12):1013–1019.
207. Krawczyk CM, et al. (2010) Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 115(23):4742–9.
208. Chang C-H, et al. (2013) Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell* 153(6):1239–1251.

209. Palsson-McDermott EM, O'Neill LAJ (2013) The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays* 35(11):965–73.
210. O'Neill LA, Hardie DG (2013) Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 493(7432):346–355.
211. Everts B, Pearce EJ (2014) Metabolic control of dendritic cell activation and function: recent advances and clinical implications. *Front Immunol* 5:203.
212. Everts B, et al. (2012) Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood* 120(7):1422–31.
213. Helft J, et al. (2015) GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 42(6):1197–211.
214. Guilliams M, et al. (2015) A Death Notice for In-Vitro-Generated GM-CSF Dendritic Cells? *Immunity* 42(6):988–90.
215. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–5.
216. Nicholls DG, et al. (2010) Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *J Vis Exp* (46). doi:10.3791/2511.
217. Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM (1998) Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcγ receptor type I. *J Exp Med* 188(1):217–22.
218. Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM (1997) Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* 185(11):1977–1985.
219. Dhodapkar KM, et al. (2007) Selective blockade of the inhibitory Fcγ receptor (FcγRIIB) in human dendritic cells and monocytes induces a type I interferon response program. *J Exp Med* 204(6):1359–69.
220. Gallo P, Gonçalves R, Mosser DM (2010) The influence of IgG density and macrophage Fc (γ) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol Lett* 133(2):70–7.
221. Laborde EA, et al. (2007) Immune complexes inhibit differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 179(1):673–81.

222. Brown WD (1960) Reduction of protein disulfide bonds by sodium borohydride. *Biochim Biophys Acta* 44:365–367.
223. Hansen RE, Østergaard H, Nørgaard P, Winther JR (2007) Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Biochem* 363(1):77–82.
224. Bouhamdan M, et al. (2015) MEK1 dependent and independent ERK activation regulates IL-10 and IL-12 production in bone marrow derived macrophages. *Cell Signal* 27(10):2068–76.
225. Martin M, et al. (2003) Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Immunol* 171(2):717–725.
226. Bilanges B, et al. (2014) Cinderella finds her shoe: the first Vps34 inhibitor uncovers a new PI3K-AGC protein kinase connection. *Biochem J* 464(2):e7-10.
227. Pao AC, et al. (2007) NH2 terminus of serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 binds to phosphoinositides and is essential for isoform-specific physiological functions. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(6):F1741-50.
228. Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Sheppard KE (2013) AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer Manag Res* 5:281–92.
229. Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Sheppard KE (2010) Second AKT: The rise of SGK in cancer signalling. <http://dx.doi.org/10.3109/089771942010518616>.
230. Sommer EM, et al. (2013) Elevated SGK1 predicts resistance of breast cancer cells to Akt inhibitors. *Biochem J* 452(3):499–508.
231. Zhou H, et al. (2015) Inhibition of serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances TLR-mediated inflammation and promotes endotoxin-driven organ failure. *FASEB J* 29(9):3737–3749.
232. Sherk AB, et al. (2008) Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer Res* 68(18):7475–83.
233. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR (2000) Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20(14):5010–8.

234. Berndt N, et al. (2010) The Akt activation inhibitor TCN-P inhibits Akt phosphorylation by binding to the PH domain of Akt and blocking its recruitment to the plasma membrane. *Cell Death Differ* 17(11):1795–804.
235. Yang L, et al. (2004) Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* 64(13):4394–9.
236. Calleja V, Laguerre M, Parker PJ, Larijani B (2009) Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol* 7(1):e17.
237. Shi Y (2012) To forge a solid immune recognition. *Protein Cell* 3(8):564–70.
238. Ng G, et al. (2008) Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity* 29(5):807–18.
239. Flach TL, et al. (2011) Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* 17(4):479–487.
240. Chaudhary A, Fresquez TM, Naranjo MJ (2007) Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol Cell Biol* 85(3):249.
241. Pittini Á, Casaravilla C, Allen JE, Díaz Á (2016) Pharmacological inhibition of PI3K class III enhances the production of pro- and anti-inflammatory cytokines in dendritic cells stimulated by TLR agonists. *Int Immunopharmacol* 36:213–7.
242. Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN (2014) The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* 14(2):94–108.
243. Naik SH, O’Keeffe M, Proietto A, Shortman HHK, Wu L (2010) CD8+, CD8-, and plasmacytoid dendritic cell generation in vitro using flt3 ligand. *Methods Mol Biol* 595:167–76.
244. Lam QLK, Zheng B-J, Jin D-Y, Cao X, Lu L (2007) Leptin Induces CD40 Expression through the Activation of Akt in Murine Dendritic Cells. *J Biol Chem* 282(38):27587–27597.
245. Escribano C, Delgado-Martin C, Rodriguez-Fernandez JL (2009) CCR7-Dependent Stimulation of Survival in Dendritic Cells Involves Inhibition of GSK3. *J Immunol* 183(10):6282–6295.
246. Rodionova E, et al. (2007) GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109(4):1584–92.

247. Gold MJ, Antignano F, Hughes MR, Zaph C, McNagny KM (2016) Dendritic-cell expression of Ship1 regulates Th2 immunity to helminth infection in mice. *Eur J Immunol* 46(1):122–130.
248. Hadidi S, et al. (2012) Myeloid cell-specific expression of Ship1 regulates IL-12 production and immunity to helminth infection. *Mucosal Immunol* 5(5):535–43.
249. Poe JC, Wagner DH, Miller RW, Stout RD, Suttles J (1997) IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1 β synthesis and rescue from apoptosis. *J Immunol* 159(2):846–52.
250. Gabhann JN, et al. (2010) Absence of SHIP-1 Results in Constitutive Phosphorylation of Tank-Binding Kinase 1 and Enhanced TLR3-Dependent IFN- γ Production. *J Immunol* 184(5):2314–2320.
251. Hsu TL, et al. (2014) The surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* larva interact selectively with the rodent Kupffer cell receptor. *Mol Biochem Parasitol* 192(1–2):55–59.
252. Yang C-Y, et al. (2013) CLEC4F is an inducible C-type lectin in F4/80-positive cells and is involved in alpha-galactosylceramide presentation in liver. *PLoS One* 8(6):e65070.
253. Corr EM, Cunningham CC, Dunne A (2016) Cholesterol crystals activate Syk and PI3 kinase in human macrophages and dendritic cells. *Atherosclerosis* 251:197–205.
254. Cunningham CC, et al. (2012) Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals induce pro-inflammatory cytokines and damage-associated molecules via activation of Syk and PI3 kinase. *Clin Immunol* 144(3):228–36.
255. Gillooly DJ, Simonsen A, Stenmark H (2001) Phosphoinositides and phagocytosis. *J Cell Biol* 155(1):15–18.
256. Yin H, et al. (2016) Syk negatively regulates TLR4-mediated IFN- γ and IL-10 production and promotes inflammatory responses in dendritic cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1860(3):588–598.
257. Pauls SD, et al. (2016) Fc RIIb-Independent Mechanisms Controlling Membrane Localization of the Inhibitory Phosphatase SHIP in Human B Cells. *J Immunol* 197(5):1587–1596.
258. Getahun A, Cambier JC (2015) Of ITIMs, ITAMs, and ITAMis: revisiting immunoglobulin Fc receptor signaling. *Immunol Rev* 268(1):66–73.
259. da Silva FP, et al. (2008) Inhibitory ITAMs: a matter of life and death. *Trends Immunol*

- 29(8):366–373.
260. Wang B, et al. (2014) Glycolysis-dependent histone deacetylase 4 degradation regulates inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* 25(21):3300–7.
261. Huang W-C, et al. (2009) Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells. *Immunology* 128(1 Suppl):e275-86.
262. Chang Y-T, et al. (2013) Regulatory role of GSK-3 β on NF- κ B, nitric oxide, and TNF- α in group A streptococcal infection. *Mediators Inflamm* 2013:720689.
263. Antignano F, et al. (2011) SHIP-deficient dendritic cells, unlike wild type dendritic cells, suppress T cell proliferation via a nitric oxide-independent mechanism. *PLoS One* 6(7):e21893.
264. Moon J-S, et al. (2015) mTORC1-Induced HK1-Dependent Glycolysis Regulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Cell Rep* 12(1):102–15.
265. Covarrubias AJ, et al. (2016) Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *Elife* 5. doi:10.7554/eLife.11612.
266. Wang Y, et al. (2013) Tuberous sclerosis 1 (Tsc1)-dependent metabolic checkpoint controls development of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50):E4894-903.
267. Kamda JD, Singer SM (2009) Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Inhibition of Dendritic Cell Interleukin-12 Production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 77(2):685–693.
268. Hait WN, Wu H, Jin S, Yang JM (2006) Elongation factor-2 kinase: its role in protein synthesis and autophagy. *Autophagy* 2(4):294–296.
269. Hamasaki M, et al. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495(7441):389–393.
270. Briaud I, et al. (2005) Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in ??-cells. *J Biol Chem* 280(3):2282–2293.
271. Kuchay S, et al. (2013) FBXL2- and PTPL1-mediated degradation of p110-free p85 β regulatory subunit controls the PI(3)K signalling cascade. *Nat Cell Biol* 15(5):472–80.

272. Zidovetzki R, Levitan I (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768(6):1311–24.
273. Li H, Nookala S, Re F (2007) Aluminum Hydroxide Adjuvants Activate Caspase-1 and Induce IL-1 and IL-18 Release. *J Immunol* 178(8):5271–5276.
274. Quezada SA, et al. (2003) Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 48(9):2541–54.
275. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ (2004) CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 22:307–28.
276. Bieber K, Autenrieth SE (2015) Insights how monocytes and dendritic cells contribute and regulate immune defense against microbial pathogens. *Immunobiology* 220(2):215–226.
277. Crispe IN (2011) Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol* 54(2):357–365.
278. Bioscience S Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit, User Guide. 1–9.

7 Anexo 1

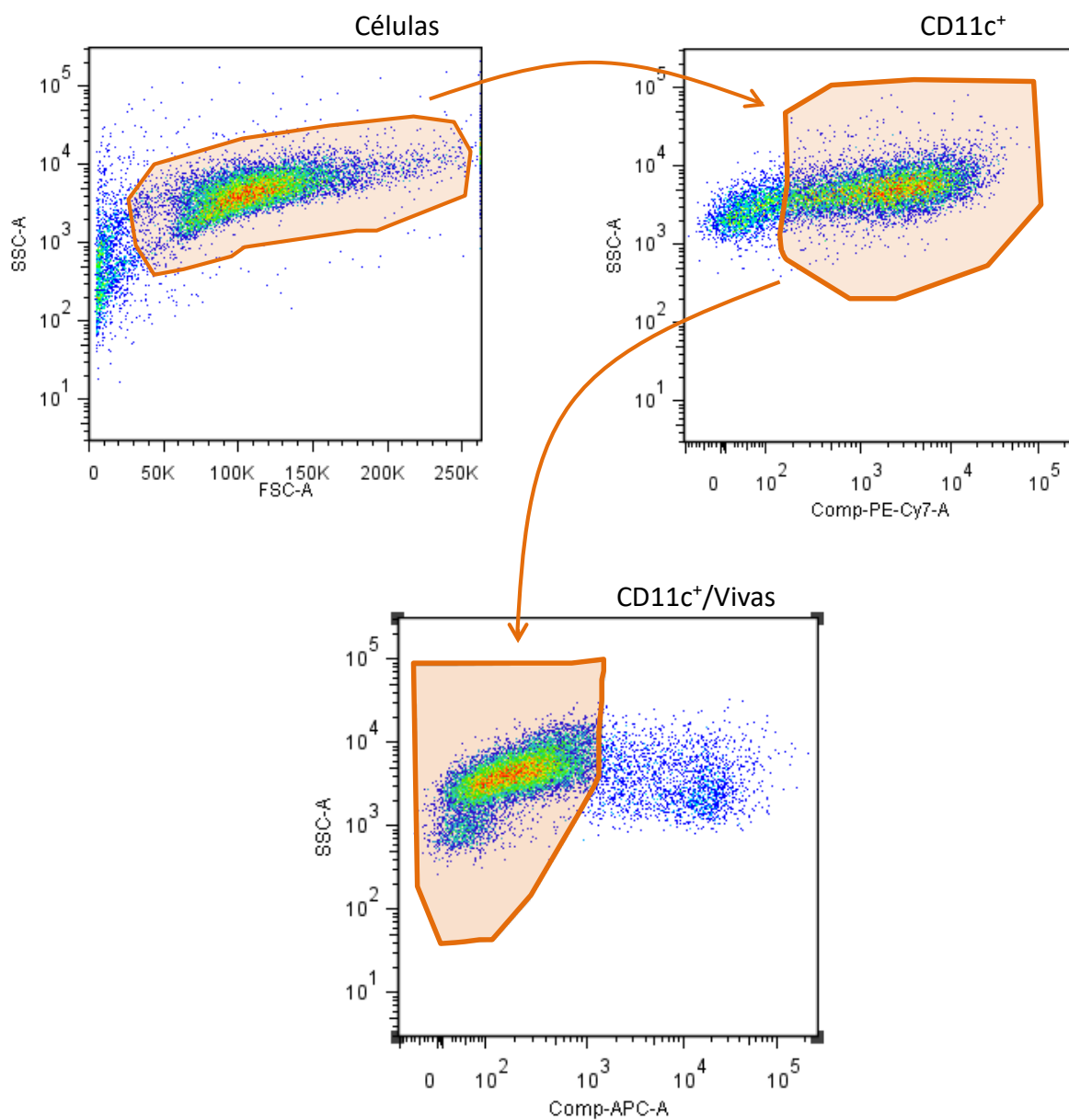


Figura 7.1. Estrategia de *gating* de BMDCs.

Tabla 7.1. Control de la viabilidad celular por TO-PRO-3, para BMDCs tratadas con diferentes estímulos utilizados en este trabajo. Se incubaron BMDCs con los diferentes estímulos utilizados en este trabajo durante 18 horas y se estudió el % de sobrevivencia para cada uno de ellos. Los datos se presentan como el promedio del % de BMDCs vivas (sin incorporación de TO-PRO-3) y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Estímulos (concentración)	Promedio del % de BMDCs vivas ± Desviación estándar
-	93.77 ± 0.33
pLL (10 µg)	93.73 ± 0.45
Lx BSA (30 µg)	94.70 ± 0.22
Lx IgG (30 µg)	94.00 ± 0.16
α-FcγRII/III (5 µg/mL)	97.37 ± 0.29
Ctl Iso α-FcγRII/III (5 µg/mL)	96.27 ± 1.02
Cyt D (5 µM)	91.80 ± 1.13
pLL DTT (10 µg)	95.47 ± 0.37
Péptido Candidato (150 µM)	90.20 ± 0.70
UO126 (5 µM)	93.73 ± 0.45
Wortmanina (100 nM)	92.40 ± 0.65
VPS34-IN1 (1 µM)	95.67 ± 0.50
SAR405 (1 µM)	97.60 ± 0.43
EMD638683 (30 µM)	94.17 ± 1.31
GSK650394 (10 µM)	93.60 ± 2.57
GDC-0941 (5 µM)	91.13 ± 0.09
3α-Aminocolestano (20 µM)	87.90 ± 0.67
Triciribina (1.5 µM)	90.97 ± 0.21
Akt VIII (10 µM)	93.93 ± 1.38
Amlexanox (200 µM)	93.70 ± 0.73
Torin1 (10 µM)	94.27 ± 2.15
Rapamicina (1 nM)	96.67 ± 0.48
SB216763 (10 nM)	90.93 ± 0.25
Piceatanol (25 µM)	96.27 ± 0.90

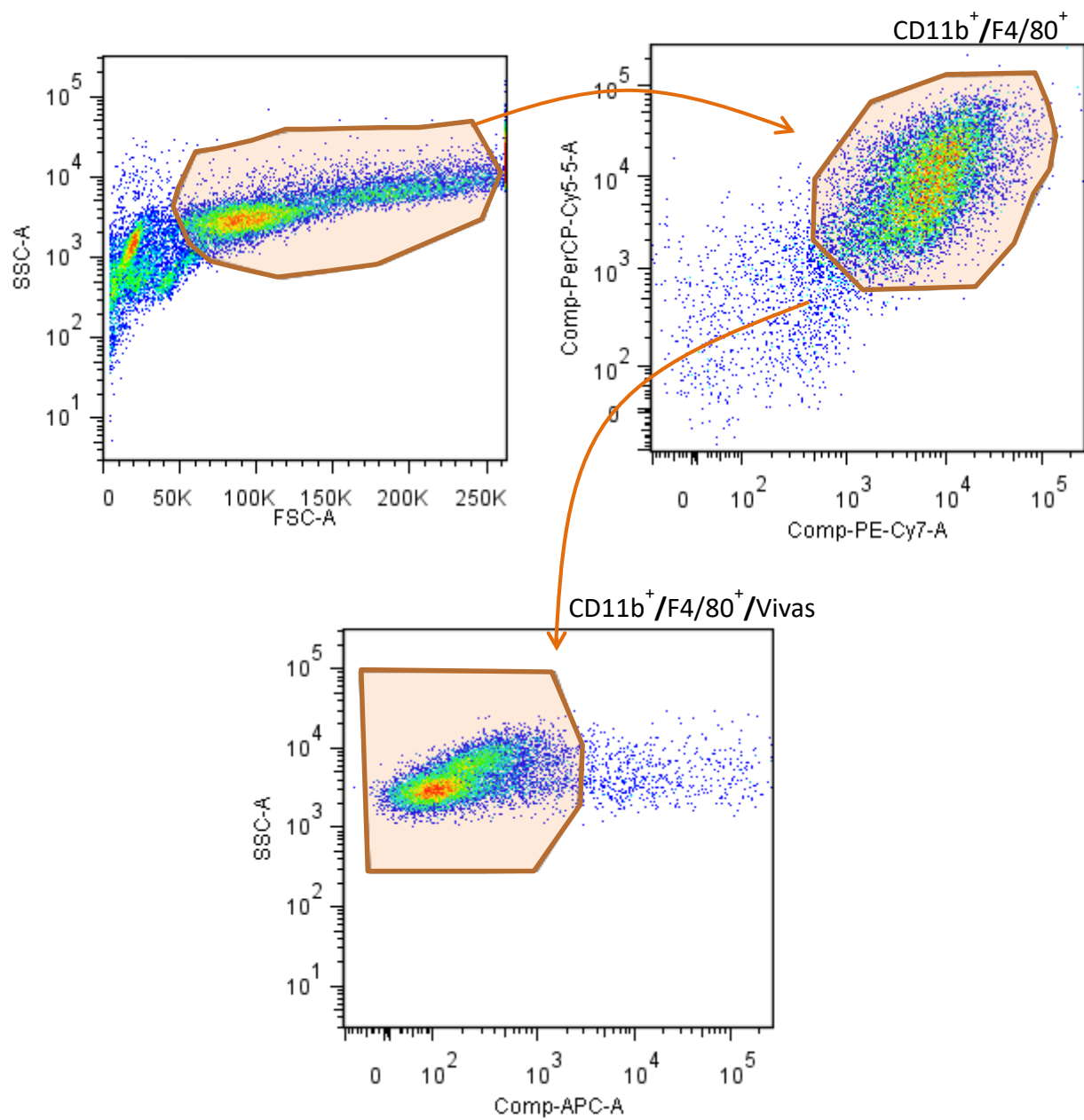


Figura 7.2. Estrategia de *gating* de Tio-Mac.

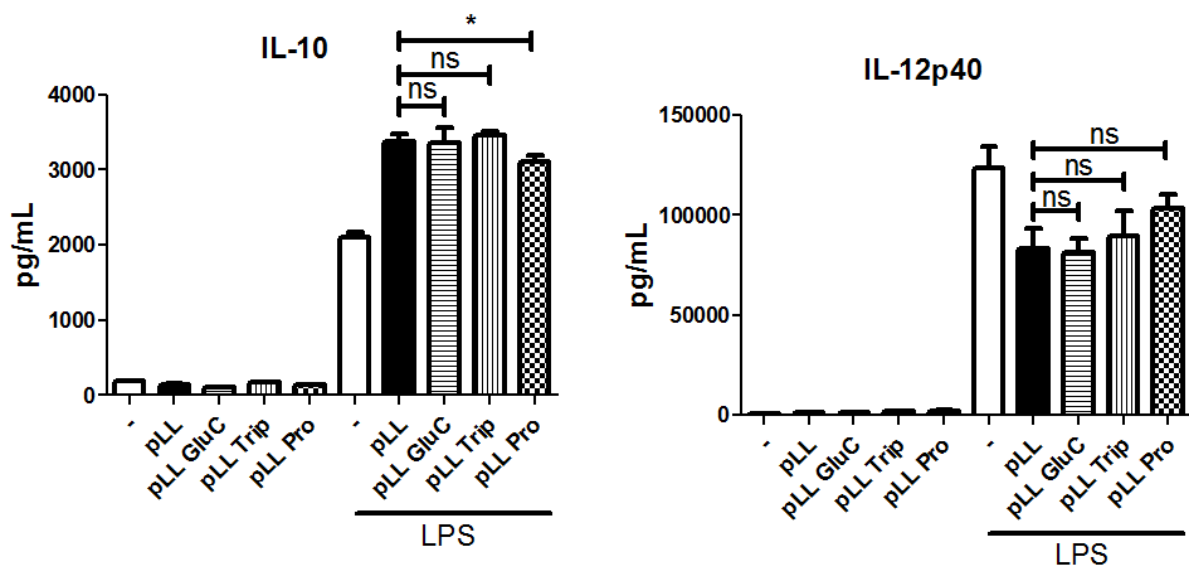


Figura 7.3. Exploración de los efectos de tratamientos con proteasas, sobre el sesgo inducido en citoquinas producidas por BMDCs. Se utilizaron para condicionar a las BMDCs: pLL, pLL tratado con endoproteasa GluC (pLL-GluC), pLL tratado con tripsina (pLL-Trip) y pLL tratado con pronasa (pLL-Pro). Se coestimularon BMDCs con 10 μ g de cada uno de los materiales mencionados, en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-12p40 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo).

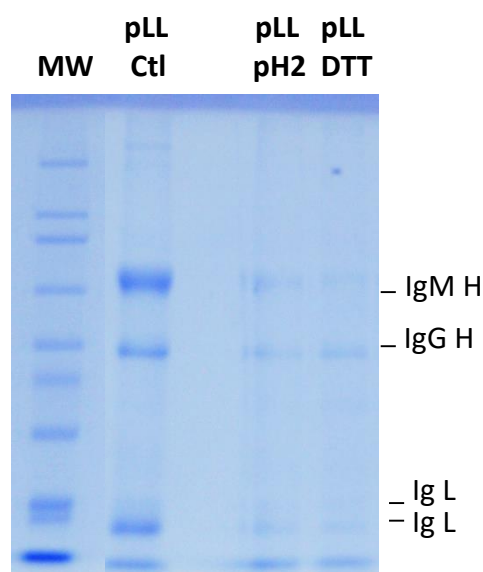


Figura 7.4. Evaluación de la extracción de proteínas del hospedero por tratamientos pH2 y DTT. Se realizó a pLL el tratamiento de extracción de proteínas con buffer 0.2 M Gly pH2 y el tratamiento reductor de enlaces disulfuro con DTT/IAA. Luego se incubaron los diferentes pLL con tampón muestra de electroforesis 1 hora a 37°C, se centrifugó y se analizó el sobrenadante por SDS-PAGE, se utilizó como punto de comparación pLL sin tratar (pLL Ctl). Se analizaron los remanentes de proteínas en pLL. Todos los carriles están cargados con la cantidad de proteínas correspondiente a 1 mg de masa seca de pLL inicial. Los SDS-PAGE corresponden a 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras.

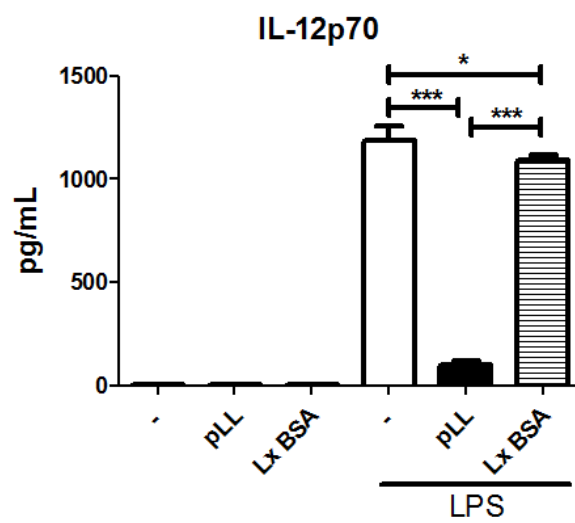


Figura 7.5. pLL inhibe la expresión de IL-12p70 inducida por LPS en BMDCs. Se estimularon BMDCs con 10 μg de pLL y 30 μg de Látex (0.8 μm) adsorbido con BSA (Lx BSA), en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL. Se cuantificó la concentración de IL-12p70 en el sobrenadante a las 18 horas de la estimulación por ELISA. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

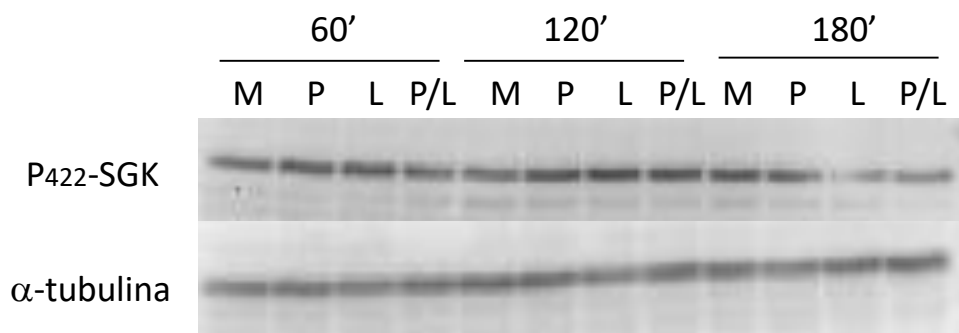


Figura 7.6. Estudio del efecto de la estimulación de BMDCs con pLL sobre la fosforilación de SGK en la posición Ser422. Se estimularon BMDCs con medio de incubación (M), pLL (P), LPS (L) y pLL más LPS (P/L). Se prepararon extractos celulares totales a 60, 120 y 180 minutos. Se analizaron los extractos por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos anti-P-SGK (Ser422). Se utilizó como control de carga α -tubulina. El ensayo representa el único experimento realizado.

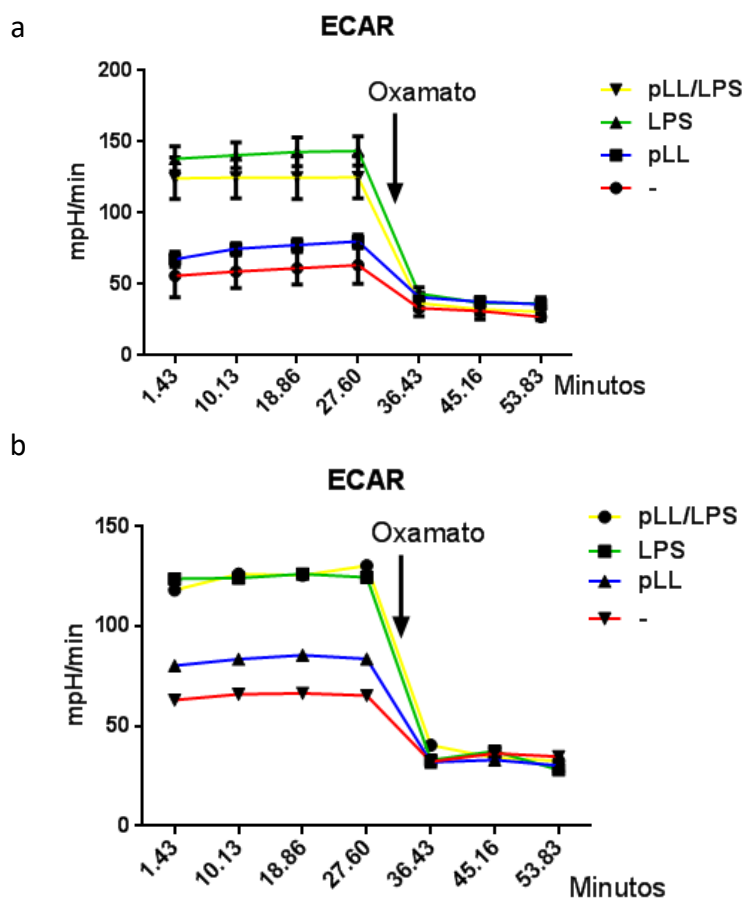


Figura 7.7. El oxamato inhibe el glicólisis aeróbica en BMDCs estimuladas pLL. Se sembraron BMDCs en placas XF-24, y se las estimularon con 10 μ g de pLL en presencia y ausencia de LPS 10 ng/mL por 18 (a) o 22 (b) horas. Luego se determinó el ECAR para cada tiempo indicado. Se indica con una flecha el tiempo al cual se agregó el inhibidor de la lactato deshidrogenasa, oxamato. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados para (a) y como datos sin repeticiones para (b). Los resultados mostrados representan experimentos independientes entre si pero son la única repetición realizada de cada uno de ellos.

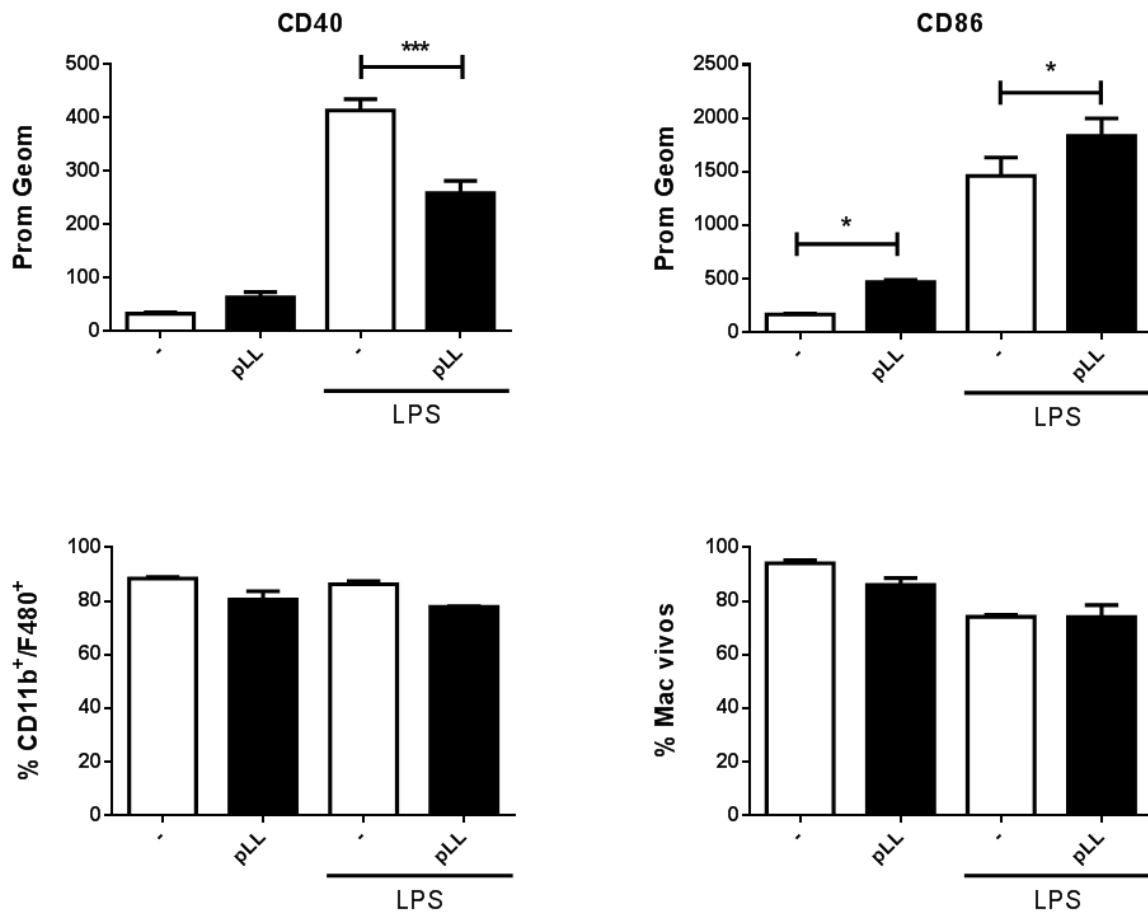


Figura 7.8. Actividad de pLL sobre la expresión de moléculas coestimuladoras en macrófagos reclutados por tioglicolato estimulados con LPS. Se estimularon macrófagos reclutados con tioglicolato con 50 μ g de pLL en ausencia y presencia de LPS 10 ng/mL y a las 18 horas se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD40 y CD86 por citometría. Los datos se presentan como el promedio y la desviación estándar de pocillos triplicados. Los resultados mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la estadística intra-experimento (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns, no significativo). Prom geom, promedio geométrico.

8.Anexo 2



Pharmacological inhibition of PI3K class III enhances the production of pro- and anti-inflammatory cytokines in dendritic cells stimulated by TLR agonists



Álvaro Pittini^a, Cecilia Casaravilla^a, Judith E. Allen^{b,1}, Álvaro Díaz^{a,*}

^a Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias (Facultad de Química) e Instituto de Química Biológica (Facultad de Ciencias), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Institute of Immunology and Infection Research Centre for Immunity, Infection and Evolution, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2016

Accepted 19 April 2016

Available online xxxx

Keywords:

Wortmannin

PI3K

Vps34

Dendritic cells

IL-10

ABSTRACT

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway is known to down-regulate inflammatory cytokine responses in dendritic cells and macrophages stimulated with TLR agonists. This is due to class I PI3Ks causing the activation of Akt, which in turn inactivates GSK3, a kinase that promotes the transcription of IL-12 and represses that of anti-inflammatory IL-10. Using bone marrow-derived dendritic cells we find that whereas pharmacological inhibition of Akt or GSK3 has the expected effects on these cytokines, the widely used PI3K inhibitor wortmannin causes a paradoxical increase in the production of IL-10. Wortmannin inhibits all PI3K classes, including PI3K class III, involved in endosomal function and autophagy, for which specific inhibitors were until recently not available. Using inhibitors specific for PI3K class III vs class I, we show that whereas inhibition of class I PI3K has the expected opposing effects on IL-10 and IL-12 production, inhibition of class III PI3K enhances the production of both of these, plus further cytokines. This explains the paradoxical inhibition of IL-10 production by wortmannin.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The phosphoinositide 3-kinase (PI3K) enzyme family is involved in several central aspects of cell and tissue biology, including cell survival and proliferation, metabolism, autophagy, and inflammation. All PI3Ks are composed of a C2 domain, a helical domain, and a catalytic domain [1]. The PI3K classification depends on the presence of additional protein domains, their interactions with regulatory subunits, and the 3-phosphorylated phosphoinositides that they synthesise. Class I PI3Ks are formed by four different catalytic subunit isoforms, namely PI3K α , PI3K β , PI3K γ and PI3K δ , which heterodimerise with different regulatory subunits. There are three isoforms of class II PI3K, namely PI3K2 α , PI3K2 β and PI3K2 γ . Lastly, there is only one catalytic subunit of class III PI3K called VPS34 (vacuolar protein sorting 34).

Class I PI3Ks generate phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate, PI(3,4,5)P₃ [1]. One of the main effectors of class I PI3Ks is the kinase Akt (PKB). Akt is recruited to membranes by PI(3,4,5)P₃, where it is phosphorylated by PDK-1 (on T308) and mTORC2 (on S473) for its complete activation [2]. This PI3K/Akt pathway regulates cell survival,

translation, metabolism, and immune responses [1]. An important molecular target of this pathway is glycogen synthase kinase 3 (GSK3), which is phosphorylated and inactivated by Akt [3,4]. The PI3K/Akt/GSK3 “sub-pathway” so formed (Supplementary Fig. 1) has an important role in innate immunity. Specifically, it is well known to down-regulate the pro-inflammatory cytokine IL-12 and to up-regulate the anti-inflammatory cytokine IL-10 in myeloid cells stimulated with TLR agonists [5–12]. TLR stimulation is accompanied by PI3K and Akt activation and therefore inactivation of GSK3, the activity of which influences the expression of IL-12 in a positive way and that of IL-10 in a negative way. In this context, Akt has been shown to inactivate GSK3 both directly as mentioned above, and indirectly through P70S6K kinase (P70S6K); P70S6K is activated by the mTOR complex 1, in turn activated downstream of PI3K and Akt [3,11].

In short, through inactivating GSK3, the PI3K/Akt pathway prevents excessive inflammatory responses after TLR activation. For the capacity of the pathway to downregulate IL-12, pharmacological evidence agrees with the evidence generated from gene-targeted mice [5,8,9,13–15]. This includes evidence obtained with wortmannin, the most widely used PI3K inhibitor, known to be free of the specificity problems affecting LY294002 in particular [12]. In contrast, for IL-10 upregulation, results obtained with wortmannin [16,17], often clash with the evidence based on genetically modified mice [14,15,18,19]. However, the results generated using a specific inhibitor of the catalytic subunit p110 δ do agree with the data from genetically modified mice [14]. Thus, it

* Corresponding author.

E-mail address: adiaz@fq.edu.uy (Á. Díaz).

¹ Current address: University of Manchester, AV Hill Building, Faculty of Life Sciences, Manchester, UK M13 9PT.

seems likely that the effects of wortmannin on other targets, including non-class I PI3Ks, could explain these disagreements.

Class III PI3K, VPS34, generates phosphatidylinositol 3-phosphate, PI(3)P [1]. VPS34 is active as part of at least two complexes with different cellular localizations and roles [20]. Thus VPS34 regulates membrane trafficking, autophagy, and it is also proposed to participate in amino acid sensing upstream of mTORC1 activation [20,21]. Whereas VPS34 is targeted by wortmannin and other pan-PI3K inhibitors such as 3-methyladenine, specific inhibitors for this kinase were described only in the last two years [22–24]. In this study, we make use of these new inhibitors to explore the impact of VPS34 inhibition on the cytokine responses of dendritic cells to TLR agonists. Our results help to explain the paradoxical effects of wortmannin on IL-10 production.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies and reagents

Antibodies against Akt and phosphorylated Akt (S473) were purchased from Cell Signaling Technology. Antibody to α -tubulin was from Santa Cruz Biotechnology. Secondary antibodies, anti-IgG and anti-IgM, both HRP-conjugated, were from Calbiochem and Invitrogen, respectively. Wortmannin was purchased from Sigma, Akt inhibitor VIII (Akt VIII) from Merck-Millipore, and GDC-0941 and SB216763 from ApexBio. SAR405 and VPS34IN-1 were purchased from the Division of Signal Transduction Therapy (DSTT) Unit at the University of Dundee. LPS and Pam3CSK4 were purchased from Sigma and InvivoGen, respectively.

2.2. Generation of murine bone-marrow-derived dendritic cells (BMDCs)

BMDCs were obtained by the method of Lutz et al. [25] as described in detail in [26]. Recombinant mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was from PeproTech. All stimuli were added in medium containing 5 ng/mL GM-CSF.

2.3. Immunoblotting

Immunoblotting analysis was performed following standard procedures. BMDCs were lysed in PBS pH 7.2, 0.5% w/v Triton X-100 (Applichem), containing protease and phosphatase inhibitor cocktails from Santa Cruz Biotechnology. Lysates were resolved on SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes from Merck-Millipore. Membranes were blocked in PBS, 0.1% w/v Tween 20 (Sigma) and 0.5% w/v BSA (Sigma), probed with the corresponding antibodies and developed with the SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher).

2.4. Measurement of cytokines

BMDCs were treated with inhibitors 30 min before stimulation with TLR agonists. IL-10, IL-12p70, IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were measured in cultured supernatants, after 18 h of BMDCs stimulation, using ELISA kits from BD Biosciences.

2.5. Statistical analyses

The intra-experiment statistical analyses were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA), with a Tukey post-test. The inter-experiment statistics (*i.e.* putting together the results of repeated independent experiments) were carried out by the restricted maximum-likelihood (REML) method [27], also with a Tukey post-test.

3. Results and discussion

3.1. Wortmannin causes a paradoxical increase in IL-10 production in BMDCs stimulated with TLR agonists

Because the PI3K/Akt/GSK-3 sub-pathway is known to regulate the production of IL-10 and IL-12 in response to TLR agonists in myeloid cells [5–11], we chose to study how the inhibition of each of these kinases affects the production of IL-10 and IL-12 in BMDCs stimulated with LPS (Fig. 1). As expected, a specific inhibitor of GSK-3 (SB216763) increased IL-10 production whereas it decreased IL-12 production (Fig. 1A). Also as expected, the inhibition of Akt (by Akt inhibitor VIII) decreased IL-10 production and increased IL-12 production (Fig. 1B). However, the inhibition of PI3Ks by wortmannin, while increasing IL-12 production as expected, did not decrease IL-10 production, and it actually increased it, both after stimulation with LPS and with the TLR2 agonist Pam3CSK4 (Fig. 1C and D). This is similar to the increase in IL-10 production induced by wortmannin reported previously in macrophages [19].

3.2. VPS34 inhibition enhances the production of both IL-10 and IL-12 in BMDCs stimulated with TLR agonists

Since wortmannin is a pan-PI3K inhibitor, we speculated that the paradoxical increase in IL-10 production caused by this drug may be due to inhibition of VPS34. In order to investigate this issue, we used two structurally unrelated inhibitors of this kinase, namely SAR405 and VPS34-IN1 [22,23]. We verified that the phosphorylation of Akt (S473) was abrogated by wortmannin, Akt inhibitor VIII and the PI3K class I-specific inhibitor GDC-0941, but not by the new VPS34 inhibitors (Supplementary Fig. 2). The VPS34 inhibitors had only a minor negative effect on Akt phosphorylation; this is unlikely to be a direct effect on PI3K class I, since it has been shown that neither inhibitor affects significantly the activity of PI3K class I at the concentration used in our experiments (1 μ M) [22,23]. In contrast to the PI3K class I-specific inhibitor (GDC-0941), which caused the expected decrease in IL-10 production, both VPS34 inhibitors increased IL-10 production in BMDCs stimulated with either LPS or Pam3CSK4 (Fig. 2A). Simultaneous inhibition of PI3Ks class I and III (by the combined use of GDC-0941 and SAR405) had as the net effect an enhancement in IL-10 production. In other words, the combination of specific PI3K class I and III inhibitors imitated the effect of wortmannin. Hence the paradoxical effect of wortmannin on IL-10 production is likely explained by the inhibition of VPS34, which has a negative effect on this cytokine.

We also evaluated whether the VPS34 inhibitors affect the production of IL-12. SAR405 and VPS34-IN1 increased IL-12 production, as did GDC-0941 (Fig. 2B). The effect of VPS34 inhibition was weaker than that of PI3K class I inhibition, a difference that may be at least partially explained by the enhanced production of IL-10, known to down-regulate IL-12 in an autocrine manner [8]. The combination of PI3K class I and class III inhibition induced a large increase in IL-12 production in response to LPS or to Pam3CSK4, suggesting an additive effect of both classes of PI3Ks on the production of this cytokine.

3.3. VPS34 inhibition enhances the production of further cytokines in BMDCs stimulated with TLRs agonists

Finally, we assessed whether the effects of VPS34 are specific to IL-10 and IL-12, or extend to further cytokines. For this purpose, we analyzed the production of TNF- α and IL-6 in BMDCs stimulated with LPS and Pam3CSK4, in the presence of the PI3K class-specific inhibitors (Fig. 2C and D). GDC-0941 did not affect the production of TNF- α or IL-6. This differed from the data obtained by Aksoy et al. [15] using BMDCs carrying a kinase-dead version of PI3K δ , which suggests that different PI3K class I isoforms may influence TNF- α and IL-6 differently. More importantly, both PI3K class III inhibitors significantly increased

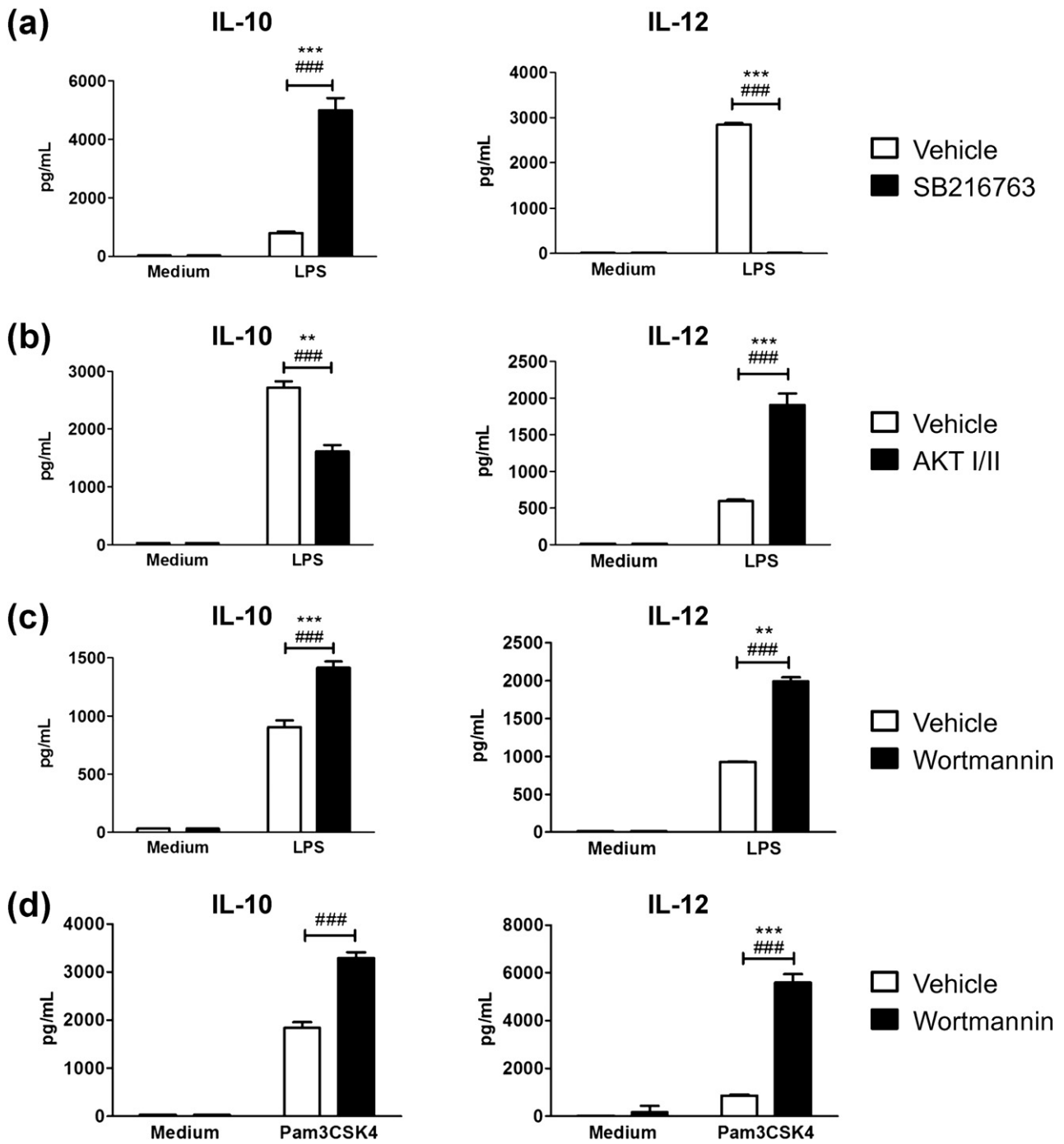


Fig. 1. Wortmannin does not affect IL-10 production in TLR-stimulated BMDCs as expected from the anti-inflammatory nature of the PI3K-Akt-GSK3 sub-pathway. BMDCs were pretreated with inhibitors or vehicle (DMSO) for 30 min before stimulation with 10 ng/mL LPS (a–c) or 200 ng/mL Pam3CSK4 (d). Eighteen hours later, IL-10 and IL-12p70 were quantified by ELISA in supernatants. Inhibitors tested were SB216763 (10 μ M, for GSK3) (a), Akt I/II (10 μ M, for Akt) (b), and wortmannin (100 nM, for PI3K) (c, d). All data are presented as mean \pm SD of triplicate wells. The results shown are representative of 3 independent experiments. Inter-experiment statistics are shown (***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$), along with intra-experiment ones (###, $P < 0.001$; ##, $P < 0.01$; # $P < 0.05$).

the production of TNF- α and IL-6 elicited by either TLR agonist tested. We also analyzed the effects of the PI3K inhibitors on the secretion of the low levels of IL-1 β elicited by TLR agonists in the absence of inflammasome activators (Supplementary Fig. 3). The VPS34 inhibitors, but not the class I-specific inhibitor, significantly increased the production of IL-1 β induced by LPS; a similar enhancement had been previously reported in the presence of 3-methyladenine, which inhibits both PI3K class I and class III [28]. However, the potentiation of IL-1 β output by VPS34 inhibitors was absent when Pam3CSK4 was used as a

stimulus, suggesting that the situation for this cytokine is different than for conventionally secreted cytokines.

3.4. Concluding remarks

Taken together our results show that inhibition of VPS34 causes increases in the production of several conventionally secreted cytokines in BMDCs stimulated with TLR agonists. They also show that this enhancement, which affects both pro- and anti-inflammatory cytokines,

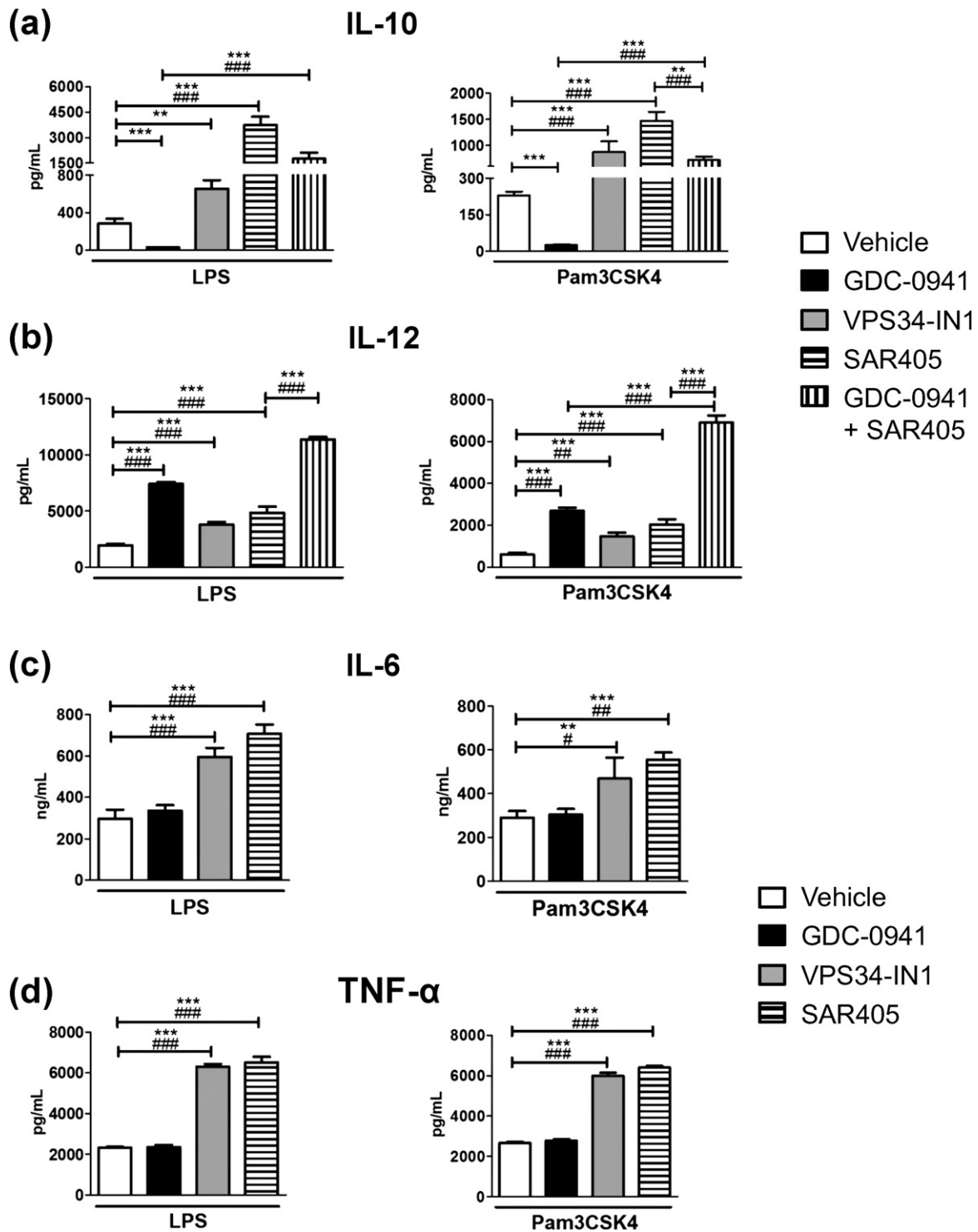


Fig. 2. PI3K class I and class III inhibitors both enhance the production of proinflammatory cytokines in TLR-stimulated BMDCs, but they have opposite effects on the production of IL-10. BMDCs were pretreated with inhibitors or vehicle (DMSO) for 30 min before stimulation with 10 ng/mL LPS or 200 ng/mL Pam3CSK4 as indicated. Inhibitors tested were GDC-0941 (1 μ M, for PI3K class I), VPS34-IN1 (1 μ M, for PI3K class III), SAR405 (1 μ M, for PI3K class III), or a mixture of GDC-0941 and SAR405 (1 μ M each; only in parts (a) and (b)). Eighteen hours later, IL-10 (a), IL-12p70 (b), IL-6 (c) and TNF- α (d) were quantitated by ELISA in the supernatants. No significant levels of cytokines were detected in BMDCs incubated in media without TLRs agonist. All data of results are given as means \pm SD of triplicate wells. Results are representative of 3 independent experiments. Statistical significances are expressed as for Fig. 1.

becomes superimposed on the expected pro-inflammatory effects of inhibiting PI3K class I when an inhibitor targeting both PI3K class I and class III, such as wortmannin, is used. The mechanism underlying the observed effect of VPS34 inhibition is not obvious. VPS34 is necessary for TLR9 signaling, which starts in endosomes [29], but this cannot explain the enhancement of cytokine responses after VPS34 inhibition, nor explain effects in response to TLR family members (TLR2; for pro-

inflammatory responses, TLR4) that signal from the cell surface. The mechanisms underlying our observation may well be complex, as VPS34 inhibition can be expected to have profound effects on the basic cellular functions of autophagy and vesicular trafficking [20]. When using 18 h or similarly long endpoints, as it is the case in our work and many others, such alteration in housekeeping cellular processes is likely to result in effects impacting on many cellular functions.

Therefore our results do not imply necessarily that VPS34 specifically controls the cytokine output of dendritic cells under physiological conditions. However, they do imply that the use of pan-PI3K inhibitors to explore the functionality of the PI3K pathway carries the risk of a confounding general enhancement in the cytokine output of cells as a result of VPS34 inhibition.

Conflict of interest

No conflict of interest declared.

Acknowledgements

This work was funded by Wellcome Trust Project Grant 092752 (to AD and JEA). The authors thank Dr. Nicholas Ktistakis (Babraham Institute, Cambridge, UK) for useful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.028>.

References

[1] P.T. Hawkins, L.R. Stephens, PI3K signalling in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta* 2015 (1851) 882–897.
 [2] L.R. Pearce, D. Komander, D.R. Alessi, The nuts and bolts of AGC protein kinases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 9–22.
 [3] B.D. Manning, L.C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream, *Cell* 129 (2007) 1261–1274.
 [4] H. Wang, J. Brown, M. Martin, Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response, *Cytokine* 53 (2011) 130–140.
 [5] T. Fukao, M. Tanabe, Y. Terauchi, T. Ota, S. Matsuda, T. Asano, et al., PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 875–881.
 [6] M. Martin, K. Rehani, R.S. Jope, S.M. Michalek, Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 777–784.
 [7] M. Martin, R.E. Schifferle, N. Cuesta, S.N. Vogel, J. Katz, S.M. Michalek, Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, *J. Immunol.* 171 (2003) 717–725.
 [8] M. Ohtani, S. Nagai, S. Kondo, S. Mizuno, K. Nakamura, M. Tanabe, et al., Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells, *Blood* 112 (2008) 635–643.
 [9] E. Rodionova, M. Conzelmann, E. Maraskovsky, M. Hess, M. Kirsch, T. Giese, et al., GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells, *Blood* 109 (2007) 1584–1592.
 [10] H. Wang, J. Brown, C.A. Garcia, Y. Tang, M.R. Benakanakere, T. Greenway, et al., The role of glycogen synthase kinase 3 in regulating IFN-beta-mediated IL-10 production, *J. Immunol.* 186 (2011) 675–684.
 [11] H. Wang, J. Brown, Z. Gu, C.A. Garcia, R. Liang, P. Alard, et al., Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3-beta-

signaling pathways regulates the innate inflammatory response, *J. Immunol.* 186 (2011) 5217–5226.
 [12] K. Hazeki, K. Nigorikawa, O. Hazeki, Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1617–1623.
 [13] T. Luft, E. Rodionova, E. Maraskovsky, M. Kirsch, M. Hess, C. Buchholtz, et al., Adaptive functional differentiation of dendritic cells: integrating the network of extra- and intracellular signals, *Blood* 107 (2006) 4763–4769.
 [14] E.C. Steinbach, T. Kobayashi, S.M. Russo, S.Z. Sheikh, G.R. Gipson, S.T. Kennedy, et al., Innate PI3K p110delta regulates Th1/Th17 development and microbiota-dependent colitis, *J. Immunol.* 192 (2014) 3958–3968.
 [15] E. Aksoy, S. Taboubi, D. Torres, S. Delbaue, A. Hachani, M.A. Whitehead, et al., The p110delta isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 1045–1054.
 [16] A. Arcaro, M.P. Wymann, Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses, *Biochem. J.* 296 (Pt 2) (1993) 297–301.
 [17] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. McLauchlan, et al., The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update, *Biochem. J.* 408 (2007) 297–315.
 [18] D. Avni, Y. Glucksam, T. Zor, The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 modulates cytokine expression in macrophages via p50 nuclear factor kappaB inhibition, in a PI3K-independent mechanism, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 106–114.
 [19] K. Hazeki, Y. Kametani, H. Murakami, M. Uehara, Y. Ishikawa, K. Nigorikawa, et al., Phosphoinositide 3-kinase gamma controls the intracellular localization of CpG to limit DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages, *PLoS ONE* 6 (2011), e26836.
 [20] N.T. Ktistakis, M. Manifava, P. Schoenfelder, S. Rotondo, How phosphoinositide 3-phosphate controls growth downstream of amino acids and autophagy downstream of amino acid withdrawal, *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 37–43.
 [21] M.S. Yoon, Vps34 and PLD1 take center stage in nutrient signaling: Their dual roles in regulating autophagy, *Cell Commun. Signal.* 13 (2015) 44.
 [22] R. Bago, N. Malik, M.J. Munson, A.R. Prescott, P. Davies, E. Sommer, et al., Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase, *Biochem. J.* 463 (2014) 413–427.
 [23] B. Ronan, O. Flamand, L. Vescovi, C. Dureuil, L. Durand, F. Fassy, et al., A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy, *Nat. Chem. Biol.* 10 (2014) 1013–1019.
 [24] B. Pasquier, Y. El-Ahmad, B. Filoche-Romme, C. Dureuil, F. Fassy, P.Y. Abecassis, et al., Discovery of (2S)-8-[(3R)-3-methylmorpholin-4-yl]-1-(3-methyl-2-oxobutyl)-2-(trifluoromethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrimido[1,2-a]pyrimidin-6-one: A novel potent and selective inhibitor of Vps34 for the treatment of solid tumors, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 376–400.
 [25] M.B. Lutz, N. Kukutsch, A.L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, et al., An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow, *J. Immunol. Methods* 223 (1999) 77–92.
 [26] C. Casaravilla, A. Pittini, D. Ruckerl, P.I. Seoane, S.J. Jenkins, A.S. MacDonald, et al., Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval *Echinococcus granulosus*, *Infect. Immun.* 82 (2014) 3164–3176.
 [27] S.I. Inc, JMP software manual, Mixed and Random Effect Model Reports and Options. (2014).
 [28] P. de Castro C, J. SA, C. Ni Cheallaigh, H. CA, L. Williams, J. Winter, et al., Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion, *J. Immunol.* 189 (2012) 4144–4153.
 [29] C.C. Kuo, W.T. Lin, C.M. Liang, S.M. Liang, Class I and III phosphatidylinositol 3'-kinase play distinct roles in TLR signaling pathway, *J. Immunol.* 176 (2006) 5943–5949.