



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN Investigación
biomédica**

TESIS DOCTORAL:

**La reprogramación metabólica inducida
por patrones moleculares de la pared
fúngica regula la expresión de
citoquinas**

Presentada por **Cristina Mancebo Tejera** para
optar al grado de

Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Mariano Sánchez Crespo

María Nieves Fernández García

A mi padre

Al finalizar esta increíble etapa de mi vida y tras observar el resultado final de este proyecto, solo se me ocurre una palabra, ¡GRACIAS!

En primer lugar a los doctores Mariano Sánchez Crespo y Nieves Fernández García por su labor como tutores y su apoyo académico, sin el que este trabajo no hubiera sido posible.

A mi madre, por su constante lucha y tesón y su apoyo incondicional y a ti, Samu por ser mi guía e inspiración y por enseñarme a no bajar los brazos nunca. Gracias, también por vuestra paciencia. Sin vosotros esto hoy no sería una realidad.

A Marina, gracias por ver en mi lo que yo no veía y sobre todo, gracias por hacérmelo ver.

A tod@s aquell@s que durante este tiempo han ayudado a que esta tesis sea hoy una realidad; A mis compañer@s del laboratorio, sobre todo, gracias a Sara y Yoli por vuestros consejos, enseñanzas y risas. A las chicas del E10 y a mis otros compañeros del IBGM y de medicina por compartir conmigo campana y poyata, por compartir los maravillosos ratos del “café” y por amenizar los días, a veces grises durante este camino. Pero sobre todo, por compartir conmigo los mejores ratos de ocio y cervezas, de *escape rooms* y vídeos a escondidas que se pueden tener... (No mencionaré nada del cine ;)).

A mi familia, que no han dejado de animarme a seguir y a mis amigos; los de siempre y los nuevos del confinamiento, que han celebrado conmigo cada logro de esta tesis.

A Alfredo, por enseñarme todo lo que se del Seahorse y por los ratos fuera del laboratorio.

Este trabajo es el resultado de un sinfín de acontecimientos que no solo tuvieron que ver con lo académico y nada de esto hubiera sido posible sin vosotros.

¡MUCHÍSIMAS GRACIAS!

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	7
III. INTRODUCCIÓN	11
1. Sistema inmunitario	13
2. Las respuestas inmune innata y adaptativa	13
3. Las células dendríticas	14
3.1. Reconocimiento de PAMPs a través de los PRRs	15
➤ Receptores tipo Toll (TLRs)	16
➤ Receptores tipo lectina-C (CLRs): Dectin-1	17
➤ Efectos de la activación de dectin-1	18
4. Citoquinas implicadas en la polarización de la respuesta inmune	19
4.1. La interleuquina 10	20
4.2. La interleuquina 23	21
4.3. El factor de necrosis tumoral	22
4.4. Interleuquina 1 β	23
5. Inmunometabolismo	25
6. Rutas implicadas en el metabolismo energético	26
6.1. Glucólisis	26
6.2. Ciclo de Krebs	27
6.3. Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa	28
6.4. Las lanzaderas mitocondriales	29
7. Vías alternativas a las rutas canónicas del metabolismo energético	31
7.1. Alternativas al ciclo de los TCA	31
➤ Reacciones de acetilación en el compartimento nucleocitosólico	31
➤ Síntesis de lípidos	32
7.2. Vías alternativas a la glucólisis	33
➤ Ruta de las pentosas fosfato	33
➤ Síntesis de aminoácidos no esenciales	34
7.3. Síntesis de nucleótidos	35
➤ Síntesis de coenzimas	36
8. Metabolismo energético durante la respuesta a patógenos	37
IV. OBJETIVOS	41
V. MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Reactivos	47
2. Cultivos celulares	48
2.1. Obtención de monocitos y diferenciación a células dendríticas	48

ÍNDICE

3. Análisis de la expresión génica	50
3.1. Extracción del ácido ribonucleótido (RNA) total	50
3.2. Síntesis de DNA complementario	50
3.3. PCR cuantitativa en tiempo real	51
4. Análisis de proteínas	53
4.1. Obtención de extractos celulares para la inmunodetección de proteínas	53
4.2. Inmunodetección (Western Blot)	53
4.3. Microscopía de fluorescencia confocal de barrido láser	55
5. Inmunoprecipitación de la cromatina	56
5.1. Fragmentación de la cromatina	56
5.2. Visualización de la cromatina	57
6. Análisis metabólico	58
6.1. Estudios fluxómicos	59
7. Estudios bioenergéticos en tiempo real	60
7.1. Ratios de consumo de oxígeno y actividad glucolítica en tiempo real	60
7.2. Producción de ATP mitocondrial y glucolítico en tiempo real	61
7.3. Flujo de protones glucolíticos (Glycolytic proton efflux rate: "GRA")	62
8. Análisis de ROS	63
9. Análisis estadístico	64
VI. RESULTADOS	65
1. Efectos de la estimulación con zymosan sobre las CDs	67
1.1. Reprogramación metabólica en respuesta al zymosan	67
1.2. Cambios del fenotipo metabólico tras la estimulación	68
1.3. Efectos de la estimulación sobre la liberación de ROS	71
2. Importancia de la lanzadera malato-aspartato en la respuesta inmune	72
2.1. Efecto de la lanzadera malato-aspartato sobre la expresión de citoquinas	72
2.2. Efecto de la lanzadera malato-aspartato sobre el metabolismo energético	74
3. Transporte de piruvato a la mitocondria	75
3.1. Efecto del piruvato mitocondrial sobre la reprogramación metabólica	75
3.2. Efecto del piruvato sobre la expresión de citoquinas	77
3.3. AcCoA en el compartimento nucleocitosólico y acetilación de histonas	78
4. Citrato, ACLY y expresión de citoquinas	80
4.1. Efecto de la adición de citrato sobre el fenotipo metabólico	80
4.2. Efecto de la adición de citrato sobre la expresión de citoquinas	81
5. Succinato	83
5.1. Efecto del succinato exógeno	83
5.2. Efecto del succinato intracelular	84
5.3. Efecto de la inhibición farmacológica de la actividad de la SDH	85
➤ Inhibición de la SDH y reprogramación metabólica	86
➤ Efectos de la inhibición de la SDH sobre el fenotipo metabólico	87
➤ Modulación de la actividad de la SDH y expresión de citoquinas	88

6. Estudios fluxómicos	90
6.1. Rastreo de los ¹³ C derivados de la glucosa	90
6.2. Rastreo de los ¹³ C derivados de la glutamina	94
VII. DISCUSIÓN	97
1. Reprogramación metabólica en células dendríticas	99
2. Lanzaderas mitocondriales	100
3. El papel del piruvato	101
4. Citrato y ACLY	103
5. Succinato	104
6. Estudios fluxómicos	107
VIII. CONCLUSIONES	109
IX. REFERENCIAS	113

I. ABREVIATURAS

α -Cetoglutarato: α -KG

2-DG: 2-desoxi-D-glucosa

3-NPA: Ácido 3-nitropropiónico

AcCoA: Acetil-CoA

ACLY: ATP citrato-liasa

ACSS2: Acil-CoA sintetasa miembro 2

AN: Ácido nicotínico

AOA: Ácido aminooxiacético

Asp: Aspartato

BCR: Receptor de linfocitos B

BSA: Albúmina sérica bovina

CD: Célula dendrítica

cDNA: DNA complementario

Ct: Ciclo umbral

CTLD: Dominio tipo lectina-C

DAMP: Patrón molecular asociado a daño

DAPI: 4'6-diamidin-2-fenilindol dihidroclorhídrico

DCF: Diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína

DMM: Dimetil malonato

DMS: Dimetil succinato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleótido trifosfato

DTT: Ditioneitol

ECAR: Tasa de acidificación extracelular

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETC: Cadena de transporte de electrones

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido

FBS: Suero bovino fetal inactivado

ABREVIATURAS

FBSi: Suero bovino fetal inactivado

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

GABA: Ácido- γ -aminobutírico

GAPDH: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

GRA: Ensayo de flujo de protones glucolíticos

HemITAM: Motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina

HIF: Factor inducible por hipoxia

IL: Interleuquina

IMP: Inosinamonofosfato

LPS: Lipopolisacárido bacteriano

MPC: Transportador mitocondrial de piruvato

mRNA: RNA mensajero

NAD⁺: Nicotín adenin dinucleótido oxidado

NADH: Nicotín adenin dinucleótido reducido

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras κ de células B activadas

NRF2: Factor nuclear eritroide 2

OAA: Oxaloacetato

OCR: Tasa de consumo de oxígeno

OXPPOS: Fosforilación oxidativa

PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno

Pb: Pares de bases

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDC: Complejo de la piruvato deshidrogenasa

PDK: Piruvato deshidrogenasa kinasa

PRPP: fosfo-ribosil-1-pirofosfato

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Rot/AA: Rotenona/antimicina

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

RT: Transcriptasa inversa

SDH: Succinato deshidrogenasa

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: Error estándar de la media

TCA: Ácidos tricarboxílicos

TCR: Receptor de linfocitos T

Th: Linfocito T colaborador

TLR: Receptor tipo *Toll*

TNF α : Factor de necrosis tumoral

TTFA: 4,4,4-trifluoro-1-(2-fenil)-1,3-butanodiona

UPLC/MS: Cromatografía líquida de ultra-rendimiento de fase reversa acoplada a espectrometría de masas

II. RESUMEN

Las células dendríticas (CDs) desarrollan funciones fundamentales para la defensa del individuo y la homeostasis tisular por su capacidad para responder a las modificaciones del microentorno, pero pueden producir respuestas nocivas si no se controlan adecuadamente. Sus funciones efectoras están íntimamente ligadas a cambios en el metabolismo celular. Las primeras investigaciones en lo que se denomina inmunometabolismo, desvelaron una reprogramación metabólica inducida por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones de daño intracelular (DAMPs) similar a la observada en células tumorales, donde se produce glucólisis anaeróbica incluso en presencia de oxígeno. Este fenómeno se conoce como metabolismo Warburg. Sin embargo, los estudios más recientes han mostrado que los PAMPs producen cambios metabólicos mucho más complejos, que dependen del tipo de estímulo y del tiempo. Las CDs estimuladas con el patrón fúngico denominado zymosan, aumentan la glucólisis y la fosforilación oxidativa (OXPHOS), en un proceso dependiente de glucosa y glutamina. En consonancia con estos cambios, la modulación farmacológica de la lanzadera mitocondrial malato-aspartato, que regenera el poder reductor del sistema NAD^+/NADH nucleocitosólico, mantiene ambas vías energéticas e influye sobre el patrón transcripcional de las citoquinas IL-23 e IL-10. El mantenimiento de la OXPHOS a través de los flujos de los intermediarios metabólicos del ciclo de Krebs, regula la expresión de citoquinas inducida por los PAMPs. El flujo de piruvato a la mitocondria y su descarboxilación por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC) es necesario para la transcripción de las citoquinas IL-23 e IL-10, al permitir la acetilación de histonas en los promotores de los genes que codifican estas citoquinas. Este proceso depende del transporte de citrato desde la mitocondria al compartimento nucleocitosólico, lo que produce una discontinuidad en el ciclo de Krebs. Asimismo, la estimulación con zymosan reduce la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH) y junto a la anaplerosis de glutamina eleva los niveles de succinato y modifica la razón α -cetoglutarato (α -KG)/succinato. Tomados en conjunto, los resultados permiten asociar la regulación transcripcional de la expresión de citoquinas en respuesta al zymosan con los flujos de intermediarios metabólicos de la glucólisis, el ciclo de los TCA y la OXPHOS.

III. INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario está constituido por células y elementos humorales cuya función es la detección y eliminación de los microorganismos patógenos que amenazan la supervivencia de los organismos pluricelulares. Esta capacidad del sistema inmunitario cristalizó en los años 60 del pasado siglo en el concepto de reconocimiento de lo propio frente a lo extraño, *self non-self model* en la terminología inglesa. Más recientemente, Charles Janeway modificó esta idea añadiendo que la propiedad característica de las células inmunes es su capacidad para distinguir “Lo propio no infeccioso de lo infeccioso no propio”, lo que condujo a identificar los patrones moleculares como elementos fundamentales en el reconocimiento de microorganismos patógenos.

En los organismos superiores se distinguen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, aunque ambas están íntimamente relacionadas. Estas persiguen la detección y eliminación del patógeno y utilizan una estrategia común que consiste en identificar al patógeno, activar la célula o molécula adecuada y desplegar la función efectora asociada a esa célula o sistema de activación.

2. LAS RESPUESTAS INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA

La respuesta inmune innata es inespecífica e inmediata y se organiza alrededor de una serie de elementos celulares como son las células presentadoras de antígenos, entre las que se incluyen CD_s y macrófagos. Ambas son capaces de identificar moléculas comunes a grandes grupos de patógenos, lo que constituye la primera línea de defensa del huésped (1). Además, se incluyen otro tipo de elementos celulares como células *natural killer*, neutrófilos y monocitos, así como sistemas de activación humorales como los sistemas del complemento, la coagulación y la fibrinólisis.

La respuesta inmune adaptativa es específica y adquirida, y se organiza alrededor de dos clases de células especializadas, los linfocitos T y los linfocitos B, que expresan receptores altamente específicos: TCR (receptor de linfocitos T) y BCR (receptor de linfocitos B). Ambos son capaces de diferenciar moléculas muy similares caracterizadas por contener estructuras concretas a las que se denomina antígenos. Esto permite eliminar el patógeno de forma selectiva a través de elementos humorales como los anticuerpos y generar memoria inmunológica que protege frente a futuras reinfecciones. Ambas respuestas se conectan por las células presentadoras de antígenos, que reconocen, procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T (2).

3. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las CDs reciben este nombre por su morfología característica que incluye pseudópodos de gran envergadura. Esta característica permitió a Steinman y Cohn distinguirlas de los macrófagos y clasificarlas como células profesionales presentadoras de antígenos (3).

Las CDs se encuentran en órganos linfoides secundarios y órganos no linfoides como la piel, músculos, pulmones y riñones, y en la mayoría de los tejidos. Todas las células nucleadas del organismo expresan complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I en su membrana y son, por lo tanto, susceptibles de presentar péptidos a los linfocitos T. Sin embargo, solo unos pocos tipos celulares con funciones inmunológicas expresan moléculas MHC de clase II en su superficie. Estas células privilegiadas serán las únicas capaces de presentar péptidos a los linfocitos T *helper*, por lo que se reconocen con el nombre de células presentadoras de antígenos “profesionales”. Además, proporcionan señales co-estimuladoras a través de moléculas de membrana y citoquinas que polarizan la respuesta inmunitaria (4). Existen tres subclases principales de CDs en humanos: Células dendríticas convencionales, células dendríticas plasmacitoides y células de Langerhans.

Sus precursores en la médula ósea se movilizan al torrente sanguíneo en el curso de infecciones y migran a los tejidos, donde sufren procesos de diferenciación en el foco inflamatorio, para convertirse en macrófagos y CDs maduras (5). El proceso de diferenciación de monocitos a CDs se controla por citoquinas que actúan como factores de crecimiento y diferenciación. En presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleuquina-4 (IL-4), se pueden generar CDs *in vitro*. Estas células poseen la capacidad de capturar y procesar los antígenos y presentan en su superficie altos niveles de MHC, CD1, Fc γ RII, CD40, complejo B7 (CD80/CD86), CD44, ICAM-1 y CD11c. A diferencia de los monocitos, expresan niveles escasos de CD14 (6).

El proceso de maduración que ocurre en CDs al entrar en contacto con un patógeno, implica la disminución de la capacidad fagocítica, la translocación a la membrana externa de MHC de clase II, la migración a los ganglios linfáticos y la liberación de citoquinas (7).

Para iniciar la respuesta inmune, las células presentadoras de antígenos poseen en la superficie una serie de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que interactúan con moléculas comunes de los patógenos, denominados PAMPs (8) y con señales endógenas asociadas con daño tisular denominadas DAMPs (9). Estas

moléculas activan distintas vías intracelulares de señalización que inducen la liberación de citoquinas, quemoquinas y otros mediadores que promueven la activación y polarización de la respuesta inmune adaptativa, permitiendo la diferenciación de linfocitos T y la expansión clonal para dar lugar a una respuesta inmune a gran escala (10).

Los linfocitos T vírgenes o *naive* se diferencian a linfocitos T colaboradores o *helper* tras el reconocimiento de los antígenos asociados al complejo MHC de clase II de las CDs de forma dependiente al patrón de citoquinas liberado por las CDs. De esta forma, la respuesta inmune adaptativa puede polarizarse a los tipos Th1 (5), Th17 (11), Th2 (12) o Treg (Figura 1).

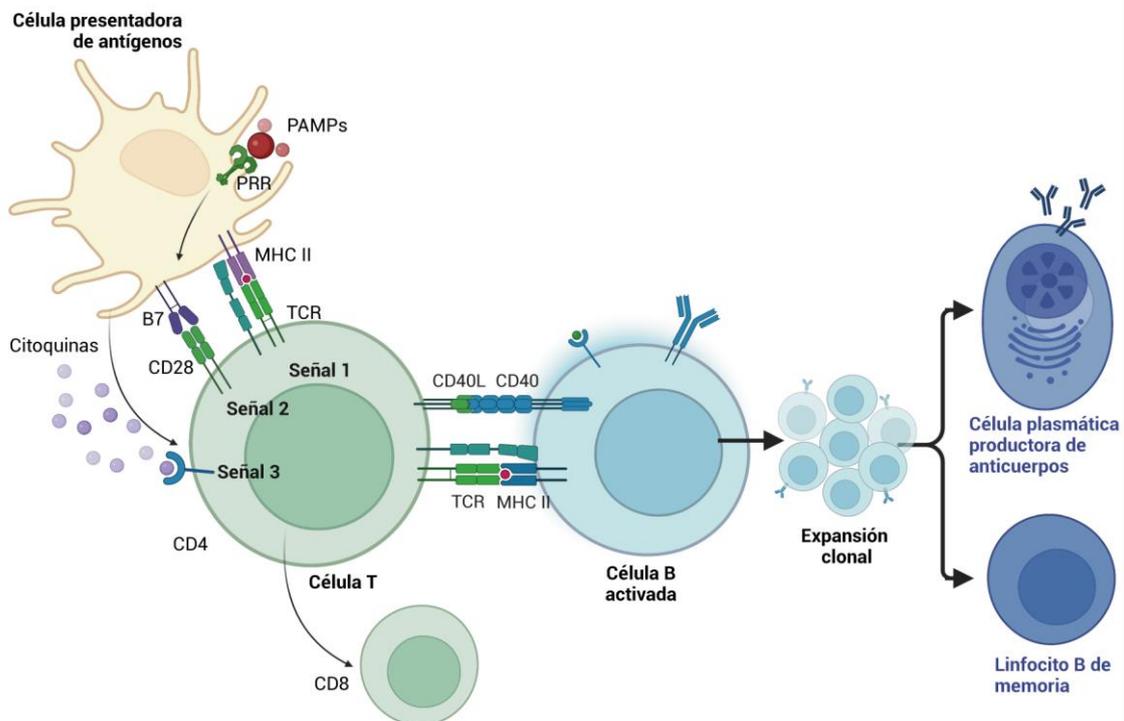


Figura 1. La conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Las células presentadoras de antígenos reconocen patrones moleculares a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los antígenos captados se transforman en péptidos capaces de unirse a moléculas MHC de clase II. Los linfocitos T se activan tras el reconocimiento de los péptidos presentados en MHC de clase II por el TCR. De esta forma se inicia la respuesta inmune adaptativa con sus dos componentes: La diferenciación de los linfocitos T y la activación de los linfocitos B por el receptor BCR. El tipo de respuesta dependerá del patrón de citoquinas liberadas por las células presentadoras de antígenos.

3.1. RECONOCIMIENTO DE PAMPS A TRAVÉS DE LOS PRRS

Las células del sistema inmune innato poseen un conjunto de receptores codificados por la línea germinal que son esenciales para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva en respuesta a los patógenos. Dichos receptores se expresan por el huésped

como proteínas transmembrana o citoplasmáticas y reconocen estructuras altamente conservadas presentes en los patógenos (13). Los PAMPs poseen distinta composición química: Lípidos, hidratos de carbono, proteínas o ácidos nucleicos, que se comparten por grupos de microorganismos. No se encuentran en los mamíferos, por lo que representan una diana ideal para el reconocimiento de lo “infeccioso no propio”. Son estructuras altamente conservadas a lo largo de la evolución porque intervienen en mecanismos indispensables para la supervivencia del microorganismo. Ejemplo de ellos son el lipopolisacárido bacteriano (LPS), que se encuentra en la membrana exterior de la mayoría de las bacterias Gram negativas y está formado principalmente por polisacáridos y cadenas de ácidos grasos; y el zymosan, que es una preparación particulada de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se compone principalmente de polisacáridos $\beta(1-3)$ y $\beta(1-6)$ glucanos y α -mananos, además de quitinas, proteínas y lípidos. Se utiliza desde hace más de 50 años como modelo de estímulo fagocítico e inflamatorio.

En general, los PRRs comprenden cualquier receptor de PAMP capaz de generar una respuesta inmune efectora como por ejemplo la fagocitosis. Sin embargo, solo algunos receptores pueden generar cascadas de señalización intracelular que regulan la expresión de genes implicados en la respuesta inmune innata, incluyendo los que codifican para moléculas co-estimuladoras, citoquinas y quemoquinas (14). Entre los PRRs capaces de regular la expresión génica se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs) (15) y dectin-1, que forma parte de la familia de receptores tipo lectina-C (CLRs). Sin embargo, en células mieloides es particularmente importante la fagocitosis no opsonica dependiente de receptores de tipo lectina-C (14).

➤ RECEPTORES TIPO TOLL (TLRS)

Los TLRs se consideran los principales receptores de detección del sistema inmune innato y están implicados en la defensa frente a bacterias, virus y hongos. Son los receptores mejor caracterizados y han sido ampliamente estudiados. Hasta la fecha se han caracterizado 13 miembros de TLRs, de los cuales el conjunto TLR1-9 está presentes en las células humanas (13).

Cada TLR tiene la capacidad de reconocer un número discreto de ligandos, entre los que se encuentran componentes de la pared celular de bacterias, como el LPS presente en las bacterias gram negativas, que es reconocido por el TLR4 (16), el peptidoglycano presente en las bacterias Gram positivas y negativas (13) y las manosas de la pared externa de los hongos (17). En ambos casos, el TLR2 es el receptor implicado en su reconocimiento (13).

Los TLR son receptores transmembrana de tipo I que poseen un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina que reconocen el ligando y una cola citoplasmática con similitud estructural con el receptor de IL-1 denominado dominio Toll/IL-1R (TIR), que media la señalización intracelular a través de la unión con adaptadores que contienen dominios TIR como Myd88 (13), lo que activa diversos factores de transcripción como NF- κ B, dando lugar a numerosas respuestas celulares entre las que se incluyen la producción de citoquinas y quemoquinas.

➤ RECEPTORES TIPO LECTINA-C (CLRS): DECTIN-1

Los receptores tipo lectina-C están divididos en 17 grupos. Uno de ellos es el clúster dectin-1, que forma parte del grupo V de receptores de tipo lectina-C que comprende un subgrupo de 7 receptores entre los que se incluye el receptor dectin-1. Son esenciales para la supervivencia y desarrollan funciones que incluyen desde el desarrollo embrionario hasta la regulación de la inflamación (18). Dectin-1 se encuentra principalmente en células mieloides, incluyendo monocitos, macrófagos, CD8 y neutrófilos (19,20). Reconoce hidratos de carbono como los β -glucanos, presentes en levaduras y en partículas derivadas de levaduras como zymosan (21,22). Asimismo, reconoce ligandos endógenos como son N-glucanos, inmunoglobulinas galactosiladas y galectinas (23,24).

Dectin-1 es un receptor transmembrana tipo II que posee un reducido número de residuos de aminoácidos implicados en la unión de ligandos dependiente de iones calcio. Estructuralmente contiene en su extremo C-terminal extracelular un único dominio que le permite reconocer hidratos de carbono y se denomina CTLD, acrónimo derivado del inglés *C-type lectin-like domain*, y un dominio transmembrana unido al extremo N-terminal intracelular o dominio hemITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Tras la unión del ligando, el motivo ITAM se fosforila en tirosina por kinasas de la familia Src, lo que permite el reclutamiento de la tirosina kinasa de bazo (SYK), que se une a Src e inicia una cascada de señalización. Syk activa enzimas GTPasas de la familia Rho, lo que desencadena la polimerización de la actina y la extensión de pseudópodos alrededor de la partícula. La habilidad de los CLRs para mediar la endocitosis del ligando implica no sólo el aclaramiento del patógeno, sino también la degradación de los antígenos en fragmentos peptídicos para la presentación a los linfocitos T (14). Asimismo, la kinasa Syk recluta el adaptador CARD9 (*caspa recruitmen domain 9*), que se une al complejo BC110-Malt1, y activa el factor de transcripción NF- κ B, que regula la expresión de numerosos genes implicados en la respuesta inmune innata frente a hongos (19) (Figura 2).

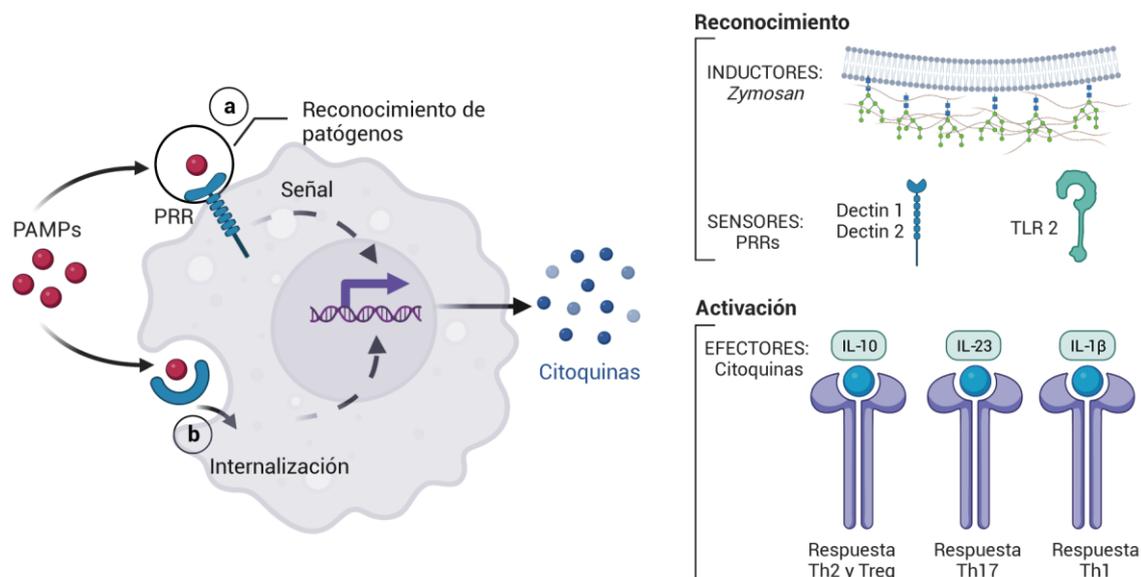


Figura 2. Reconocimiento de patógenos por células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos a través de receptores de membrana. Tras el reconocimiento del patógeno se produce una cascada de señalización que conduce a la liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios. La activación a través de receptores tipo lectina-C: dectin-1 y 2 y receptores tipo Toll: TLR2 con el patrón fúngico zymosan, una preparación particulada de la pared de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* promueve la liberación de las citoquinas IL23p19, asociada a respuestas de tipo Th17 y de IL-10, que se asocia con las respuestas de tipo Th2 y Treg.

En células mieloides, dectin-1 es el principal receptor implicado en el reconocimiento de β -glucanos. Sin embargo, aunque los β -glucanos no son reconocidos directamente por los TLRs, estos hidratos de carbono pueden promover respuestas de TLRs. En particular, TLR2 forma pares funcionales con TLR6, lo que induce la producción de citoquinas y quemoquinas en respuesta a zymosan (25). De hecho, un estudio reciente ha demostrado que la señalización dectin-1/Syk y TLR/MyD88 aumenta la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B en respuesta a zymosan (26).

➤ EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE DECTIN-1

Por su papel central en el reconocimiento de β -glucanos, dectin-1 desempeña un papel fundamental en el reconocimiento de hongos como *Candida albicans*, *Aspergillus* (27) y *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente *carinii*), por lo que la pérdida de función de este receptor se ha relacionado con el riesgo de sufrir micosis invasivas. Asimismo, la activación con DAMPs como son los N-glucanos altamente expresados en células tumorales se ha relacionado con la inmunidad antitumoral mediada por macrófagos y CDs al promover la respuesta antitumoral de linfocitos NK (28). Aunque éste es un tema controvertido, ya que otros estudios relacionan dectin-1 con tumorigénesis a través de la galectina-9 derivada de carcinomas pancreáticos, puesto que induce macrófagos tolerogénicos y supresión de la respuesta inmune adaptativa (23). Es conocido que la

activación de dectin-1 promueve los fenotipos Th1 y Th17 y que la hiperactividad del fenotipo Th17 se relaciona con enfermedades autoinmunes e inflamatorias, lo que puede ser especialmente relevante en el intestino por la posibilidad de reconocimiento de β -glucanos procedentes de la microbiota o derivados de la dieta (29,30). En modelos murinos de enfermedad inflamatoria intestinal, la inactivación de la expresión de dectin-1 parece relacionarse con la remisión de la enfermedad (31). Otros estudios han mostrado su participación en modelos murinos de artritis reumatoide, en los que la inactivación de dectin-1 evita el desarrollo de la enfermedad (32). Sin embargo, recientemente se ha mostrado que la inactivación de dectin-1 produce formas graves de encefalomiелitis autoinmune en modelos murinos, mientras la expresión de dectin-1 limita la extensión de la enfermedad (33).

Independientemente de la relación que tengan las citoquinas liberadas tras la activación de dectin-1 con cada una de las patologías, la regulación de su expresión parece ser importante para el control de la enfermedad tanto por defecto como por exceso de citoquinas. La aplicación de anticuerpos monoclonales dirigidos a disminuir la liberación de citoquinas o antagonizar sus efectos, aunque han demostrado su eficacia en algunas enfermedades producidas por exceso de citoquinas son mucho más costosas que las terapias habituales. Por otro lado, la aplicación de terapias basadas en la administración de citoquinas no ha llegado a satisfacer las expectativas por las elevadas dosis requeridas para producir efectos terapéuticos significativos, como ocurre en el caso de colitis asociada al déficit de la IL-10 en el intestino (34). Esto explica recientes iniciativas, como son las estrategias dirigidas a aumentar la concentración de la IL-10 endógena en el intestino (35).

4. CITOQUINAS IMPLICADAS EN LA POLARIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, a menudo glicosiladas y generalmente monoméricas, sintetizadas por las células del sistema inmunitario en respuesta a los patógenos, a sus productos o a otras señales relacionadas. Para ejercer su función necesitan unirse a receptores de membrana en las células diana, que suelen ser glicoproteínas compuestas por varias subunidades, cuya función es transmitir las señales de activación al interior de la célula para iniciar cambios en la expresión génica y funciones complementarias que determinan las características de la respuesta inmune (36).

Se ha descrito que la estimulación del TLR2 y de los receptores tipo lectina-C por el zymosan induce una elevada producción de las citoquinas IL-23 e IL-10 (37,38) e inducción de la IL-1 β (39).

La liberación de citoquinas por las células inmunes innatas y adaptativas está estrechamente regulada para evitar la aparición el daño tisular por exceso o por defecto. La regulación se realiza a través de mecanismos moleculares que incluyen la activación de vías de señalización específicas, la activación de factores de transcripción y crecimiento, así como modificaciones postraduccionales. Sin embargo, la evidencia reciente muestra que las células inmunes también regulan la producción de citoquinas en respuesta a PAMPs y DAMPs a través de cambios metabólicos que incluyen la regulación al alza de la glucólisis y la acumulación de intermediarios metabólicos como succinato y citrato (40).

4.1. LA INTERLEUQUINA 10

La IL-10 se produce por numerosos tipos celulares, entre los que destacan las CD4, los macrófagos y los linfocitos T y B. Es una citoquina típicamente anti-inflamatoria, ya que limita la activación y diferenciación de los linfocitos en los ganglios linfáticos al disminuir la capacidad presentadora de antígenos de las CD4 e inhibir la liberación de citoquinas por los linfocitos T y NK (41), por lo que bloquea la respuesta Th1 y favorece las respuestas Th2 o Treg (42). En células mieloides, la expresión de la IL-10 acompaña a la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias (35), lo que reduce el daño tisular causado por la inflamación. La regulación de su expresión es fundamental para controlar la respuesta inmune, ya que puede facilitar la evasión del sistema inmunitario si se produce en exceso, o el daño tisular tras la infección, si se reduce su presencia en los tejidos. La estimulación de TLR4 por LPS (43) o TLR2 con polisacáridos derivados de *Helicobacter hepaticus* (44) aumenta la expresión de la IL-10 a través de los factores de transcripción CREB y ATF1. En CD4 estimuladas con zymosan la unión de CREB al sitio CRE del promotor de la IL-10 permite el reclutamiento de los co-activadores CBP y CRTC/TORC2, dando lugar al complejo nuclear P-CREB/TORC2/CBP necesario para la trans-activación del gen *IL10* (45).

Alteraciones en las vías metabólicas y la acumulación de metabolitos inducida por distintos estímulos regulan la producción de IL-10. El LPS aumenta la expresión de la isoforma M2 de la piruvato quinasa. Esta enzima posee la propiedad de comportarse como un regulador metabólico y puede inhibir la actividad glucolítica y la producción de IL-1 β , frente a la producción de IL-10 (46). Asimismo, la activación de mTOR, un

regulador fundamental del metabolismo celular, aumenta la expresión de IL-10 en CD4 (47). Dado que la IL-10 es un modulador negativo de la respuesta inmune, la regulación de su transcripción es importante para controlar la respuesta inmune y evitar el daño tisular. La administración de IL-10 en modelos murinos de enfermedad inflamatoria intestinal alivia el curso de la enfermedad (48). Además, existen ensayos pre-clínicos y clínicos con resultados prometedores en el tratamiento de otras enfermedades inflamatorias como psoriasis y artritis reumatoide (49), a pesar de que una elevación descontrolada de los niveles de IL-10 puede favorecer la evasión de los patógenos y el desarrollo tumoral al bloquear la actividad del sistema inmunitario (50).

4.2. LA INTERLEUQUINA 23

La IL-23 pertenece a la familia de la IL-12 y se secreta en forma de heterodímero. Las citoquinas de esta familia están formadas por dos cadenas, una de ellas común a IL-12 e IL-23 es la subunidad p40 (codificada por el gen *IL12B*). La otra subunidad es específica de cada citoquina: La subunidad p19 para la IL-23 (gen *IL23A*) y la p35 para la IL-12 (gen *IL12A*). Estas se producen por macrófagos y CD4 tras la estimulación de los TLRs y dectin-1 (38).

A pesar de sus similitudes estructurales, la IL-12 y la IL-23 impulsan diferentes procesos inmunológicos. La IL12 favorece la polarización a Th1 mientras que la IL-23 facilita el desarrollo de células con fenotipo Th17. El hecho de que cada una posea una subunidad específica hace que la regulación transcripcional de esas cadenas sea el principal mecanismo de regulación del balance IL-12 p70/IL-23p19 y, en consecuencia, el que determina la polarización de la respuesta inmune hacia los tipos Th1 y Th17.

El estudio de los factores de transcripción que promueven la regulación transcripcional de la expresión de la IL-23 p19 ha demostrado que la señalización de los TLRs a través de la proteína adaptadora MyD88 y la activación de TRIF, activan factores de transcripción de la familia NF- κ B que se unen al menos a dos sitios distintos del promotor. Paralelamente, se activan las vías clásicas de las MAP kinasas, que promueven la unión del dímero ATF2/c-Jun al sitio AP-1 del promotor de *IL23A*. La señalización por SYK promovida por dectin-1 y dectin-2 activa el sistema NF- κ B, en particular la proteína c-Rel, que se une al promotor de *IL23A* y permite la transcripción (51). Además de la implicación de c-Rel, la activación de la transcripción de *IL23A* por el zymosan requiere la participación del factor ATF2, que se regula mediante dos fosforilaciones complementarias que dependen inicialmente de las proteínas quinasas

C y A, y de la cascada Ras/Raf/MEK/ERK, que fosforila la treonina 71, y de la MAPK p38 que fosforila la treonina 69 (52).

Existen pocos estudios que muestren la regulación de la expresión de IL-23p19 por factores metabólicos. Sin embargo, algunos laboratorios han destacado la importancia de los ácidos grasos de cadena corta como butirato y propionato, los cuales suprimen la producción de IL-12p40 en CDs estimuladas con LPS (53), lo que se explica por la capacidad del butirato para inhibir las histonas desacetilasas (54). De esa forma se facilitaría el fenotipo Tregs frente al fenotipo Th1 (55). Por otro lado, se ha demostrado que la disponibilidad de acetil-CoA (acCoA) en el compartimento nucleocitosólico regula la expresión de IL-12p40 a través de cambios transcripcionales asociados a la acetilación de histonas, mientras que antagoniza la expresión de IL-10, lo que indica la existencia de un mecanismo de regulación selectivo de la expresión de citoquinas dependiente de la reprogramación metabólica (56).

La hiperactivación de los linfocitos con fenotipo Th17 se ha relacionado con el crecimiento tumoral por el aumento de la expresión de IL-23 que fomenta la respuesta pro-inflamatoria local en el microentorno tumoral (57) y la disminución de la IL-12 que promueve la infiltración de linfocitos citotóxicos y la inmunovigilancia (58), aunque es un tema controvertido puesto que otros autores relacionan el fenotipo Th17 con una respuesta antitumoral (59) y en determinados procesos cancerosos, la estimulación de la producción de la IL-23 puede ser de relevancia clínica (60). Estos hechos son también relevantes en la patogenia de enfermedades inflamatorias (61), como psoriasis (62), artritis reumatoide (63) y enfermedad inflamatoria intestinal.

La inhibición de la expresión de las citoquinas con fármacos biológicos como anticuerpos humanizados se ha convertido en una buena terapia para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y cáncer, lo que explica el creciente desarrollo de anticuerpos humanizados frente a la IL-12 p40 (64) y que se estén llevando a cabo numerosos ensayos clínicos con anticuerpos frente a la cadena p19.

4.3. EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

El factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) es una citoquina pro-inflamatoria producida mayoritariamente por macrófagos, CDs y monocitos, además de por linfocitos T, células endoteliales y adipocitos. Se reconoce por los receptores TNFR1 y TNFR2, ampliamente distribuidos en los tejidos, lo que facilita la liberación de otras citoquinas pro-inflamatorias (65) y la activación de factores de transcripción de la familia NF- κ B (66). Un estudio reciente ha mostrado que los macrófagos residentes del microentorno

tumoral pueden activarse por el proteoglicano versican a través del receptor TLR2 y liberar $TNF\alpha$, lo que puede producir apoptosis en células cancerosas (67). El sistema NF- κ B es el mayor regulador de la transcripción del gen *TNF* (68), principalmente por la unión de los heterodímeros p50/p65 al sitio κ B3 y c-Jun al promotor del *TNF* (69). En consecuencia, el $TNF\alpha$ es un mediador implicado en la patogenia de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y artritis psoriásica, y ello ha conducido al desarrollo de antagonistas como son infliximab, adalimumab y etanercept. También se está estudiando el empleo de anticuerpos anti- $TNF\alpha$ en inmunoterapia antitumoral (70).

El aumento del flujo glucolítico favorece la regulación postraduccional de $TNF\alpha$ como consecuencia del aporte de carbonos glucolíticos a la síntesis de *nov*o de ácidos grasos, necesaria para la expansión del Golgi y el retículo endoplásmico que aumenta la secreción de proteínas tras la estimulación (71). Los niveles de NAD^+ también regulan la secreción de $TNF\alpha$ por un mecanismo desconocido que parece ser transcripcional (72). La utilización del piruvato en las mitocondrias también se ha descrito como un factor necesario para la producción de $TNF\alpha$ (73).

4.4. INTERLEUQUINA 1 β

La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria producida predominantemente por monocitos y macrófagos que juega un papel central como mediador inflamatorio en la respuesta Th1 (74), aunque también se ha relacionado con la respuesta Th17 en el microentorno tumoral (75). Numerosas enfermedades inflamatorias están relacionadas con la liberación de IL-1 β , por lo que se han desarrollado anticuerpos bloqueantes de su actividad como el canakinumab (anti-pro-IL-1 β). Su acumulación se ha relacionado con la inflamación crónica y el riesgo de desarrollar cáncer (76), al promover la angiogénesis e invasión tumoral en el microentorno tumoral (77). El bloqueo de sus efectos es el objetivo de numerosos ensayos clínicos (78).

La producción de IL-1 β requiere dos señales independientes. Inicialmente, la activación de los PRRs induce la transcripción del precursor inactivo (pro-IL-1 β), que, a su vez, debe sufrir un procesamiento enzimático, generalmente, a través de la proteína intracelular caspasa 1, que genera la proteína bioactiva. Diferentes formas de proteínas multiméricas denominadas inflamomas, las cuales se ensamblan en respuesta a señales de daño, son las responsables de la auto-activación de la caspasa-1. La vía SYK/CARD9 iniciada por dectin-1 favorece la reprogramación glucolítica lo que activa el

inflammasoma, sobre todo el NLRP3 y, en consecuencia, induce la producción de IL-1 β (79).

La estimulación de macrófagos por LPS produce la acumulación de succinato, que a su vez, puede abandonar la mitocondria y modificar el curso de las reacciones catalizadas por prolil hidroxilasas. Estas enzimas evitan la estabilización del factor inducible de respuesta a hipoxia (HIF1 α), fomentando su degradación en el proteasoma, por lo que su inhibición estabiliza la proteína. Dado que existe un dominio de unión de HIF1 α al promotor de *IL1B*, el aumento de succinato en el compartimento nucleocitosólico conduce a la secreción de la proteína IL-1 β inducida por el LPS (80). También se ha referido que las especies reactivas de O₂ (ROS) estabilizan HIF1 α y aumentan la liberación de la proteína IL-1 β (81). Asimismo, los ROS generados en el complejo III de la cadena de transporte de electrones (ETC) en la primera hora post-estimulación pueden dañar el DNA y consumir el NAD⁺, lo que implicaría la necesidad de su repleción mediante la vía de síntesis *salvage* para mantener el flujo glucolítico a nivel de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la traducción de la IL-1 β (72). Existe evidencia de mecanismos metabólicos adicionales implicados en la producción de IL-1 β dependientes de la utilización del piruvato en la mitocondria (73) y de la disponibilidad de niveles adecuados de acCoA nucleocitosólicos (82) (Figura 3).

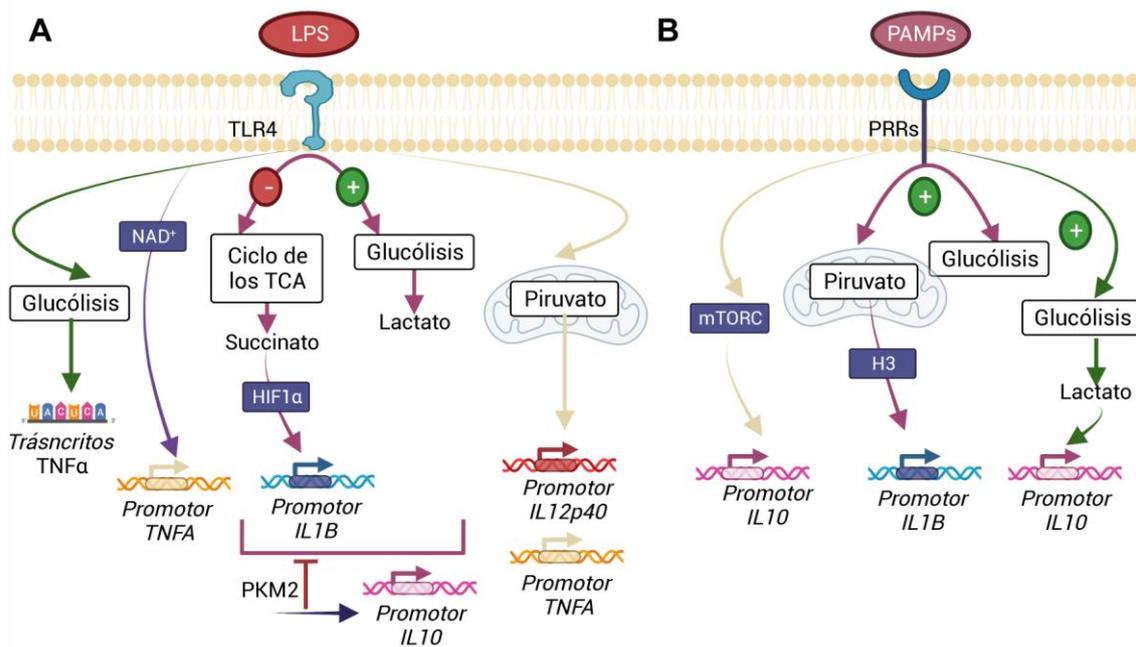


Figura 3. Regulación metabólica y producción de citoquinas.

A, en respuesta al LPS, el refuerzo de la glucólisis y la interrupción del ciclo de los TCA producen, respectivamente, la acumulación de lactato y succinato. Esto permite la estabilización de HIF1α y la expresión de la IL-1β (líneas rosas). La inhibición de este cambio metabólico mediante la función reguladora de la isoforma M2 de la piruvato quinasa (PKM2) favorece la expresión de IL-10 frente a IL-1β. El flujo de piruvato a la mitocondria facilita la expresión de las citoquinas IL-12p40 y TNFα (líneas amarillas). El TNFα también se regula postraduccionalmente a partir de cambios en la glucólisis (verde) y en presencia de NAD⁺ (morado).

B, Otros PAMPs, además de aumentar la glucólisis, estimulan la utilización del piruvato en la mitocondria, lo que aumenta la expresión de IL-1β al favorecer la acetilación de histonas asociada al transporte de citrato al compartimento nucleocitosólico (rosa). Reguladores metabólicos como mTOR (amarillo) o intermediarios metabólicos como lactato (verde) favorecen la expresión de la IL-10.

5. INMUNOMETABOLISMO

Las funciones del sistema inmunitario son energéticamente costosas y dependen de la actividad de las vías metabólicas. Tradicionalmente, se ha considerado el metabolismo como un conjunto de reacciones químicas necesarias para procesar los nutrientes para obtener energía y las macromoléculas necesarias para una correcta homeostasis. Sorprendentemente, a principios del siglo pasado Otto Warburg observó una característica particular de las células tumorales, que consistía en el aumento del flujo glucolítico y la producción de lactato incluso en presencia de oxígeno. Fenómeno que se denominó metabolismo Warburg (83). Estas observaciones propiciaron el interés por el metabolismo en la fisiología celular y sentaron las bases de estudios posteriores, puesto que años más tarde varios laboratorios demostraron que las células inmunes aumentaban el flujo glucolítico de forma análoga a lo que ocurría en células tumorales y que ello tenía una repercusión directa en la respuesta pro-inflamatoria de los macrófagos (84,85). La evidencia más reciente indica que la activación de los PRRs

implica una reprogramación metabólica necesaria para llevar a cabo funciones inmunes, como la producción de citoquinas y la polarización de la respuesta de los linfocitos T.

La aplicación de tratamientos con citoquinas se ha desarrollado durante más de 30 años, pero su aplicación es muy costosa y puede generar efectos adversos. Sin embargo, el inmunometabolismo es un concepto muy reciente que ya ha permitido desarrollar medicamentos utilizados en la clínica (86). El dimetilfumarato es un antimetabolito usado en el tratamiento de esclerosis múltiple y psoriasis, cuyo mecanismo de acción se asocia con la activación del factor nuclear eritroide 2 (NRF2), el principal factor de transcripción de genes implicados en la respuesta antioxidante y el control del daño oxidativo ocasionado por los ROS (87). Un fármaco utilizado en el tratamiento de diabetes tipo 2 es la metformina, cuya actividad como inhibidor del complejo I de la ETC se asocia con efectos anti-inflamatorios (88). El metotrexato es un análogo de nucleótidos que regula su síntesis y se usa como tratamiento anticancerígeno. Sin embargo, a bajas dosis se usa como tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn's y psoriasis (89). La aplicación de antimetabolitos como terapia inmune es también una opción favorable, ya que se administran a dosis bajas que obvian los efectos nocivos y reducen el tiempo de intervención (90).

6. RUTAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO

6.1. GLUCÓLISIS

La utilización de la glucosa en la glucólisis tiene lugar en el citoplasma tras la captación de la glucosa por el transportador de glucosa tipo 1. En la glucólisis se metaboliza la glucosa a piruvato, lo que implica la transformación de una molécula de seis carbonos en dos de tres. El destino del piruvato puede ser su entrada en la mitocondria para su oxidación por el PDC o su reducción a lactato. Lo que depende, en principio, de la cantidad de oxígeno disponible, de forma que la presencia de O_2 permite la entrada del piruvato en la mitocondria y su oxidación total a CO_2 y H_2O en el ciclo de los TCA y la ETC, mientras que la ausencia de oxígeno forzaría la reducción de piruvato a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). En la glucólisis, el gliceraldehído 3-fosfato es oxidado hasta 1,3-bisfosfoglicerato por la enzima GAPDH. Esta transformación está acoplada con la reducción de NAD^+ citosólico hasta $NADH$ citosólico, por lo que la regeneración del NAD^+ citosólico es necesaria para mantener la actividad de la GAPDH y continuar la glucólisis. Existen tres mecanismos distintos para oxidar el $NADH$ en el citosol y regenerar el NAD^+ necesario para la reacción catalizada por la GAPDH. Los dos primeros mecanismos dependen de las enzimas citosólicas malato deshidrogenasa

1 y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 1 que son componentes de las lanzaderas malato-aspartato y glicerol-3-fosfato, respectivamente. El tercer mecanismo para oxidar el NADH es reducir el piruvato hasta lactato por la LDH, sin embargo, esto supone para la célula la pérdida de los carbonos derivados de la glucosa, puesto que el lactato es generalmente secretado fuera de la célula.

La glucólisis es una vía poco eficaz desde el punto de vista energético, ya que solo genera dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, sin embargo, permite la obtención de intermediarios metabólicos importantes: ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos, serina para la síntesis de purinas y otros aminoácidos, piruvato para la síntesis de ácidos grasos a través del citrato formado en el ciclo de los TCA y equivalentes de reducción en forma de NADH. El mantenimiento de la actividad glucolítica durante la activación de células fagocitarias (91) y en linfocitos B para la producción de anticuerpos (92) parece ser una constante conocida desde hace décadas. También se utiliza en presencia de oxígeno en otras células, por lo que el metabolismo Warburg está más extendido de lo que a primera vista pudiera pensarse (46).

6.2. CICLO DE KREBS

Cuando el oxígeno está disponible, el piruvato generado en la glucólisis atraviesa los poros de la membrana mitocondrial externa por difusión y se transporta por el transportador de piruvato mitocondrial (MPC) a través de la membrana mitocondrial interna. En la matriz mitocondrial es oxidado hasta acCoA y CO₂ por el PDC. La reacción global catalizada por el PDC es una descarboxilación oxidativa, un proceso de oxidación irreversible en el que el grupo carboxilo se elimina del piruvato en forma de CO₂ y los dos carbonos restantes se convierten en el grupo acetilo del acCoA. El NADH formado en esta reacción cede un ión hidruro al complejo I de la ETC, que transporta los electrones hasta el oxígeno. La oxidación de acCoA es una transformación química que se lleva a cabo en el ciclo de Krebs, también llamado ciclo de los ácidos tricarbóxicos. 4 de las 8 reacciones químicas que conforman el ciclo de los TCA son oxidaciones, en las que la energía de oxidación se conserva eficazmente en forma de coenzimas reducidos, NADH y FADH₂. Para comenzar un ciclo, el acCoA dona su grupo acetilo al compuesto de 4 carbonos, oxaloacetato (OAA), para que la citrato sintasa ensamble los 6 carbonos del citrato. El citrato mitocondrial resultante puede salir de la mitocondria a través del transportador *SLC25A1*, que intercambia citrato mitocondrial por malato citosólico o bien continuar en el ciclo de los TCA a través de su conversión a isocitrato por la aconitasa. El ciclo de los TCA está conectado con la ETC y una de las enzimas del ciclo, la succinato deshidrogenasa, que forma fumarato a partir de la oxidación de

succinato, tiene la propiedad única de formar parte del ciclo y ser a la vez el complejo II de la ETC.

6.3. CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Todos los pasos oxidativos que tienen lugar durante la degradación de hidratos de carbono, grasas y aminoácidos convergen en una etapa final de respiración en la que la energía de oxidación impulsa la síntesis de ATP. La OXPHOS comienza con la entrada de electrones en la ETC. La ETC está formada por una serie de transportadores de electrones, cuatro de ellos son proteínas integrales (complejos) con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar uno o dos electrones. La mayoría de estos electrones surgen de la acción de las deshidrogenasas que recogen los electrones de las vías catabólicas y los incorporan a aceptores universales de electrones: Nucleótidos de nicotinamida (NAD^+ o NADP^+) y nucleótidos de flavina (FMN o FAD). Además, existen otras moléculas transportadoras de electrones como son la ubiquinona (También llamada coenzima Q o simplemente Q) y los citocromos. Los complejos I y II catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona a partir de dos donantes distintos, NADH para el complejo I y succinato para el complejo II. El complejo II o succinato deshidrogenasa acopla la oxidación de succinato con la reducción de la ubiquinona. Esto se explica por la estructura de la enzima, que contiene cuatro subunidades: Las subunidades A y B constituyen el sitio de unión para el sustrato, el succinato. Las subunidades C y D son proteínas integrales de membrana que contienen el sitio de unión para la ubiquinona, el aceptor final de electrones en la reacción catalizada por el complejo II. El complejo III transporta los electrones desde la ubiquinona hasta el citocromo C y el complejo IV completa la secuencia transfiriendo los electrones desde el citocromo C hasta el aceptor final de electrones, el O_2 . El flujo de electrones a través de la ETC está acoplado a la síntesis de ATP, es decir, ninguno de los dos procesos puede llevarse a cabo sin el otro. La transferencia de electrones desde el NADH y otros sustratos oxidables a través de la ETC va acompañada del movimiento de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente químico y un gradiente eléctrico, que en combinación crean una fuerza protón-motriz, que conduce de nuevo los protones a la matriz mitocondrial a través del complejo V o ATP sintasa, lo que aporta la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

La **Figura 4** muestra una representación esquemática de los tres procesos descritos en los que se produce la transformación completa de la glucosa en CO_2 y H_2O .

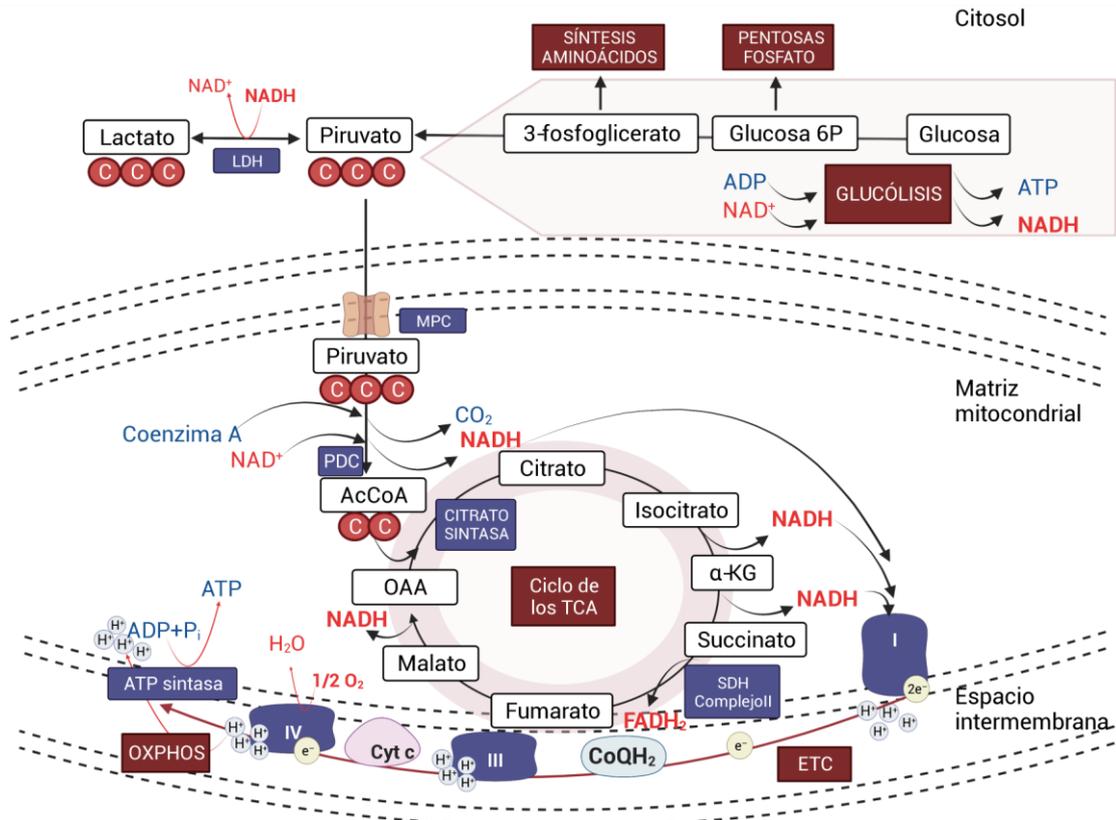


Figura 4: Representación esquemática de la degradación completa de una molécula de glucosa hasta CO₂ y H₂O.

La glucosa se capta del medio extracelular por el transportador de glucosa tipo 1 y se metaboliza en la glucólisis hasta piruvato. El piruvato puede entrar en la mitocondria a través del MPC si existe disponibilidad de O₂, o bien metabolizarse por la LDH a lactato. La glucólisis genera coenzima reducido en forma de NADH y dos moléculas de ATP y permite la actividad de otras rutas anabólicas. En el interior de las mitocondrias el piruvato se descarboxila por el PDC para producir acCoA, que cede su grupo carbonilo al OAA para formar citrato e iniciar la actividad del ciclo de los TCA. Una serie de reacciones oxidantes generan coenzimas reducidos en forma de NADH y FADH₂ que serán usados por los complejos I y II de la ETC, respectivamente. Los electrones vehiculados en la ETC reaccionan con el O₂ para producir H₂O. Por último, el ADP se fosforila generando ATP en el complejo V en un proceso denominado OXPHOS.

6.4. LAS LANZADERAS MITOCONDRIALES

Los equivalentes de reducción generados en el ciclo de los TCA entran en la ETC a través del complejo I y II de la cadena, sin embargo, la membrana mitocondrial interna es poco permeable y los NADH generados durante la glucólisis pueden precisar sistemas lanzadera para regenerar el NADH en el interior de la mitocondria. La lanzadera malato-aspartato transfiere los equivalentes de reducción del NADH citosólico al OAA citosólico para generar malato por la malato deshidrogenasa citosólica. El malato generado se transporta a través de la membrana mitocondrial interna por la lanzadera malato-aspartato. En el interior mitocondrial el malato se transforma en OAA por la malato deshidrogenasa mitocondrial formando NADH, que cede los electrones directamente al complejo I de la ETC.

INTRODUCCIÓN

Otra lanzadera mitocondrial, es la lanzadera glicerol-3-fosfato. Esta difiere de la anterior en que los equivalentes de reducción en forma de NADH se transfieren a la dihidroxiacetona por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citosólica formando glicerol-3-fosfato y posteriormente los electrones pasan desde el glicerol-3-fosfato hasta la ubiquinona, que incorpora directamente los electrones al complejo III en lugar de hacerlo al complejo I. Como se ha dicho anteriormente, estas lanzaderas también regeneran el NAD⁺ citosólico necesario para mantener la GAPDH, y son energéticamente más eficientes en comparación con la reacción catalizada por la LDH, ya que permiten que el piruvato derivado de la glucólisis se oxide en las mitocondrias y mantienen la producción de ATP vía OXPHOS (Figura 5).

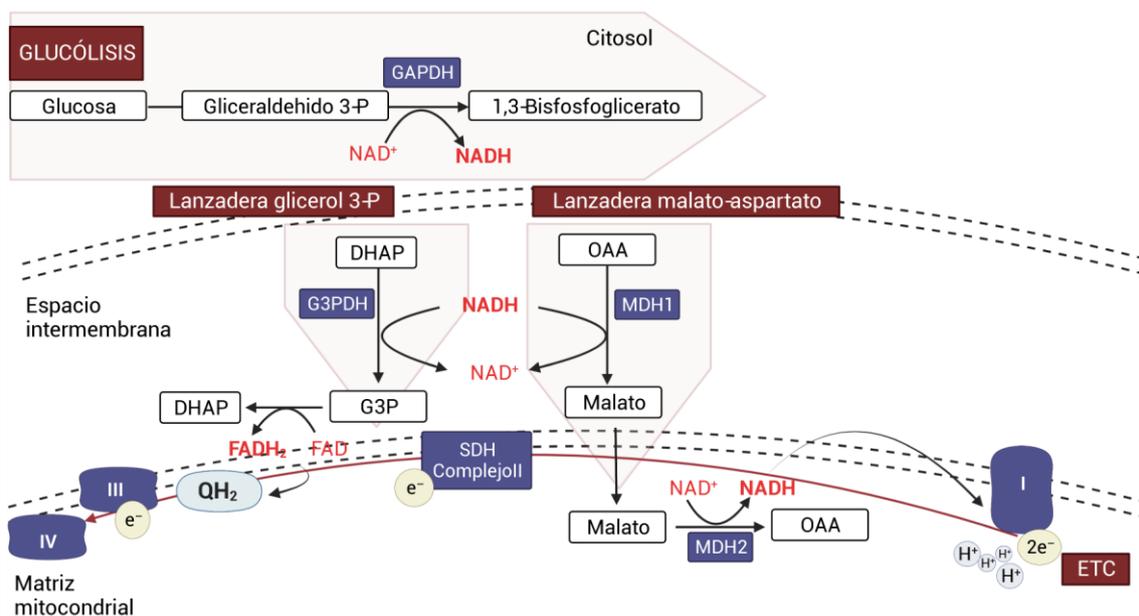


Figura 5: Representación esquemática de las lanzaderas mitocondriales.

El NADH generado en la glucólisis precisa sistemas lanzadera para atravesar la barrera mitocondrial interna. La lanzadera malato-aspartato transfiere los electrones del NADH al OAA para generar malato en la reacción catalizada por la malato deshidrogenasa citosólica (MDH1). El malato atraviesa la membrana mitocondrial interna y en el interior de la mitocondria se oxida por la malato deshidrogenasa mitocondrial (MDH2) y regenera NADH que cede los electrones al complejo I de la ETC. La lanzadera glicerol-3-fosfato, mediante la conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en glicerol 3-fosfato (G3P) por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), transfiere los electrones del NADH hasta la ubiquinona (Q) y alimenta el complejo III de la ETC.

7. VÍAS ALTERNATIVAS A LAS RUTAS CANÓNICAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

7.1. ALTERNATIVAS AL CICLO DE LOS TCA

Como se ha mencionado, el citrato mitocondrial puede continuar en el ciclo de los TCA o salir de la mitocondria a través del transportador SLC25A1. Una vez en el citosol, el citrato puede utilizarse por la ATP citrato-liasa (ACLY) para formar acCoA y OAA. Ninguno de ellos puede volver a entrar en la mitocondria. Por un lado, el OAA se convierte en malato por la malato deshidrogenasa citosólica, generando NAD^+ . El malato resultante puede volver a entrar en la mitocondria por el transportador SLC25A1 o bien procesarse hasta piruvato por la enzima málica, generando NADPH. El piruvato resultante puede transportarse a la mitocondria por el MPC o bien procesarse hasta lactato por la LDH, en una reacción que genera NAD^+ . Este proceso se conoce como lanzadera citrato-piruvato. Por otro lado, el acCoA resultante puede seguir los caminos alternativos que se desglosan a continuación.

➤ REACCIONES DE ACETILACIÓN EN EL COMPARTIMENTO NUCLEOCITOSÓLICO

La cromatina está formada por filamentos que contienen proteínas y DNA. El DNA de la cromatina está estrechamente asociado a las histonas que empaquetan y ordenan el DNA en unidades estructurales denominadas nucleosomas. La accesibilidad del DNA y la estructura de la cromatina se regula, principalmente, por modificaciones dinámicas de las histonas. Estas modificaciones incluyen numerosos grupos reactivos que permiten metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y sumoilaciones (93). Durante la transcripción, las histona acetiltransferasas incorporan un grupo acetilo al extremo amino terminal de las histonas lo que reduce la carga eléctrica positiva y debilita la unión histona-DNA relajando la estructura de la cromatina. Esto facilita la interacción con factores de transcripción y, en general, con proteínas implicadas en la transcripción. Es una modificación reversible, lo que la hace muy adecuada para la regulación de la actividad de las proteínas en respuesta a cambios metabólicos (94). Cuando la transcripción de un gen ya no es necesaria, las enzimas histonas desacetilasas (sirtuinas dependientes de NAD^+), desacetilan los residuos de lisina de las histonas (95). El efecto de la remodelación de la cromatina en el contexto de la transcripción es hacer que un segmento del cromosoma sea más accesible y “etiquetar” (modificarlo químicamente) para facilitar la unión y la actividad de los factores de transcripción que regulan la expresión de genes.

Tradicionalmente se pensaba que la acetilación de las histonas se determinaba por el simple equilibrio entre las histonas acetiltransferasas y las histonas desacetilasas. Sin embargo, dada la dependencia de estas reacciones de sus sustratos, las interpretaciones más recientes relacionan también la acetilación de histonas y la transcripción génica con la disponibilidad de nutrientes y los niveles de acCoA (96), lo que desvela la importancia del mantenimiento de los niveles de acCoA en el compartimento nucleocitosólico durante la respuesta inmune (82). Un estudio reciente ha mostrado que cuando los niveles de acCoA se limitan por la baja disponibilidad de oxígeno, la enzima Acil-CoA sintetasa miembro 2 (ACSS2) nuclear mantiene la acetilación de histonas gracias a la captación del acetato liberado por las histonas desacetilasas, su conversión en acCoA y su utilización por las histonas acetiltransferasas (97). En vista de la importancia de esta vía para la regulación transcripcional de la expresión de genes, un estudio muy reciente plantea la posibilidad de referirse a ella con nombre propio (98).

➤ SÍNTESIS DE LÍPIDOS

El acCoA citosólico es el sustrato para la síntesis de lípidos en un proceso que se inicia por su conversión en malonil-CoA por la enzima acCoA carboxilasa. El malonil-CoA puede procesarse por el complejo ácido graso sintasa en una serie de reacciones repetitivas que progresivamente aumentan en dos el número de átomos de carbono en cada paso, hasta llegar a sintetizar palmitato (C16:0) en un proceso que requiere NADPH (Figura 6).

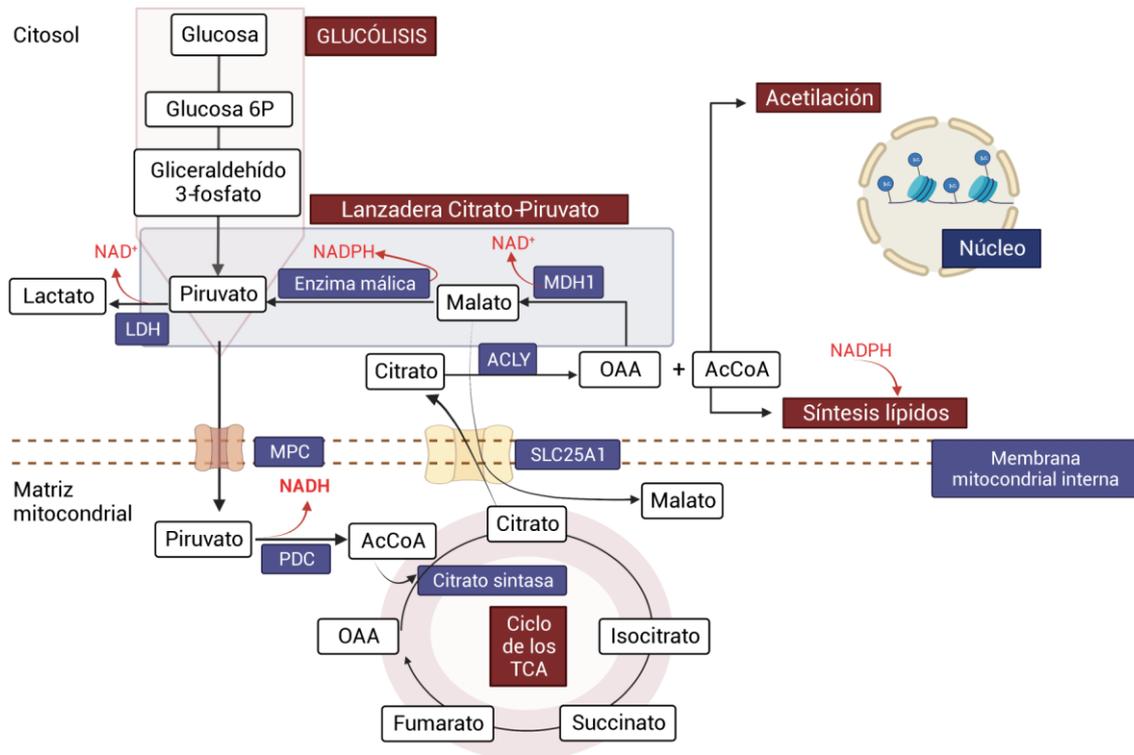


Figura 6. Metabolismo del piruvato.

El piruvato se descarboxila en el interior de las mitocondrias para formar acCoA por el PDC. La condensación con el OAA genera citrato. El citrato puede intercambiarse por malato en el transportador SLC25A1 y en el citosol metabolizarse por la ACLY para producir OAA y acCoA. El primero de los productos puede generar malato por la malato deshidrogenasa citosólica (MDH1) y transportarse a las mitocondrias por el transportador SLC25A1 o bien convertirse por la enzima málica en piruvato, en una reacción que produce NADPH, y que forma parte de la denominada lanzadera citrato-piruvato. El acCoA puede usarse en reacciones de acetilación en el compartimento nucleocitosólico y para sintetizar lípidos.

7.2. VÍAS ALTERNATIVAS A LA GLUCÓLISIS

➤ RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

El primer paso de la glucólisis transforma la glucosa en glucosa 6-fosfato por la actividad de la hexoquinasa, que fosforila la glucosa en el carbono 6 en una reacción irreversible dependiente de ATP. En la mayoría de los tejidos animales, el principal destino catabólico de la glucosa 6-fosfato es la descomposición glucolítica en piruvato, gran parte del cual se oxida a través del ciclo de los TCA, lo que conduce finalmente a la formación de ATP. Sin embargo, la glucosa 6-fosfato tiene otros destinos como es su incorporación a la ruta de las pentosas fosfato. La ruta se divide en dos etapas: Una etapa inicial oxidativa en la cual la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa cede los electrones al NADP^+ y genera NADPH, necesario para la síntesis de lípidos (71), para las NADPH oxidasas implicadas en la eliminación de patógenos (99) y para la generación de glutatión reducido para controlar los niveles de ROS.

El otro producto de la etapa oxidativa es la ribosa 5-fosfato, que sirve como precursor de nucleótidos, coenzimas como ATP, NADH y FADH₂ y coenzima A. En las células que no se requiere ribosa 5-fosfato, la etapa final no oxidativa a través de interconversiones de azúcares recicla la ribosa 5-fosfato en glucosa 6-fosfato, lo que permite continuar la producción de NADPH.

➤ SÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES

El 3-fosfoglicerato generado durante la glucólisis puede desviarse hasta la síntesis de aminoácidos no esenciales como serina y glicina. El 3-fosfoglicerato sufre una oxidación seguida de una transaminación con glutamato como donante del grupo amino y produce serina tras la hidrólisis del grupo fosfato. A partir de la serina se sintetiza glicina por la transferencia del carbono β de la serina al tetrahidrofolato. En células en fase de proliferación, como son las células tumorales, la inhibición de la transferencia de carbonos al tetrahidrofolato se utiliza como tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, lo que bloquea la síntesis de nucleótidos purínicos y permite la remisión de la enfermedad (100). Sin embargo, los leucocitos precisan la incorporación de carbonos al tetrahidrofolato para la síntesis de nucleótidos purínicos, lo que es esencial para mantener la proliferación (101). La **Figura 7** muestra una representación esquemática de los posibles destinos de la glucosa.

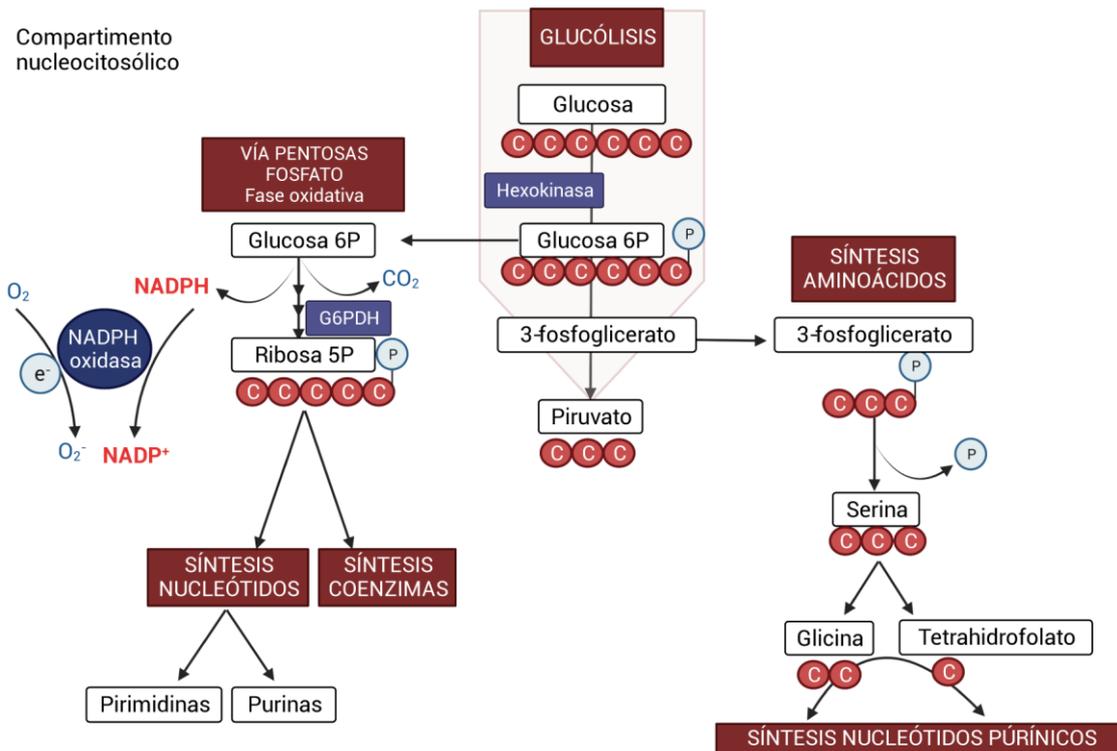


Figura 7. Metabolismo de la glucosa 6-fosfato y 3-fosfoglicerato.

La primera reacción de la glucólisis es la fosforilación de la glucosa en el carbono 6 por la hexoquinasa para producir glucosa 6-fosfato, que puede derivarse de la glucólisis a la vía de las pentosas fosfato. La vía de las pentosas fosfato genera NADPH a través de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que sirve de sustrato a las NADPH oxidasas citosólicas para generar ROS. Se produce también ribosa 5-fosfato que se utiliza en la síntesis de nucleótidos y en la síntesis de coenzimas. Por otro lado, si la glucosa 6-fosfato sigue la vía glucolítica hasta la producción de 3-fosfoglicerato, éste puede derivarse a la síntesis de aminoácidos no esenciales como serina. La serina puede transformarse en glicina y tetrahidrofolato que se emplean para la síntesis del anillo de adenina de nucleótidos purínicos.

7.3. SÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS

La ribosa 5-fosfato, la glicina y el tetrahidrofolato son precursores metabólicos para la síntesis de nucleótidos. Éstos tienen una serie de funciones importantes en todas las células del organismo. Son precursores del DNA y el RNA, son portadores esenciales de energía química, una función que desempeña principalmente el ATP. Son componentes de cofactores como el NAD y el FAD y del coenzima A. La síntesis de *novo* de los nucleótidos comienza con sus precursores metabólicos: i) Aminoácidos (Como glicina, glutamina y aspartato), ii) Ribosa 5-fosfato, iii) CO₂ y iv) NH₃. El precursor común de ribonucleótidos purínicos y pirimidínicos es el fosfo-ribosil-1-pirofosfato (PRPP), generado a partir de la ribosa 5-fosfato. El PRPP conserva los cinco carbonos de la ribosa 5-fosfato procedentes de la glucosa. A partir de PRPP se genera la base nitrogenada purínica (adenina y/o guanina) gracias al aporte de carbonos de la glicina y el tetrahidrofolato, y grupos amino, de la glutamina y el aspartato. Por el contrario,

durante la síntesis de la base nitrogenada pirimidínica (citosina y/o uracilo) no se precisa glicina ni tetrahidrofolato. Entre los ribonucleótidos púricos más comunes se encuentran, la adenosina 5'-monofosfato (AMP) con base nitrogenada de adenina y la guanosina 5'-monofosfato (GMP) con base nitrogenada de guanina. Entre los ribonucleótidos pirimidínicos más comunes se encuentran 5'-monofosfato de citidina (CMP) con base nitrogenada de citosina y el 5'-monofosfato de uridina (UMP) con base nitrogenada de uracilo.

➤ SÍNTESIS DE COENZIMAS

Los nucleótidos son componentes de coenzimas redox, como NAD^+ y NADH . La síntesis de estos coenzimas precisa el precursor PRPP, además de nicotinamida o ácido nicotínico dependiendo de la vía de síntesis utilizada, vía *salvage* o *Preiss-Handler*, respectivamente. Lo cual genera dos intermediarios mononucleótidos que tras la incorporación de un ribonucleótido de adenina se transforman en NAD^+ . Tradicionalmente, los coenzimas NAD^+ y NADH se han estudiado en reacciones de óxido-reducción y como cofactores de enzimas clave en las reacciones metabólicas. El NAD^+ es necesario para la actividad de la GAPDH glucolítica, mientras que el NADH se precisa en el complejo I de la ETC para impulsar el transporte de electrones y la síntesis de ATP. Los metabolitos de las vías del NAD^+ tienen importantes funciones no oxidativas en vías de señalización, modificaciones postraduccionales y cambios epigenéticos (102). Por ejemplo, el NAD^+ es un cofactor de las poli(ADP)ribosa polimerasa 1 y de desacetilasas dependientes de NAD^+ (sirtuinas o histonas desacetilasas de clase III), implicadas en la reparación de daño del DNA y el silenciamiento transcripcional, respectivamente.

La síntesis de CoA también precisa el ribonucleótido de adenina, además de vitamina B5 y el grupo tiol reactivo (103). La **Figura 8** muestra una representación esquemática de la síntesis de nucleótidos y coenzimas.

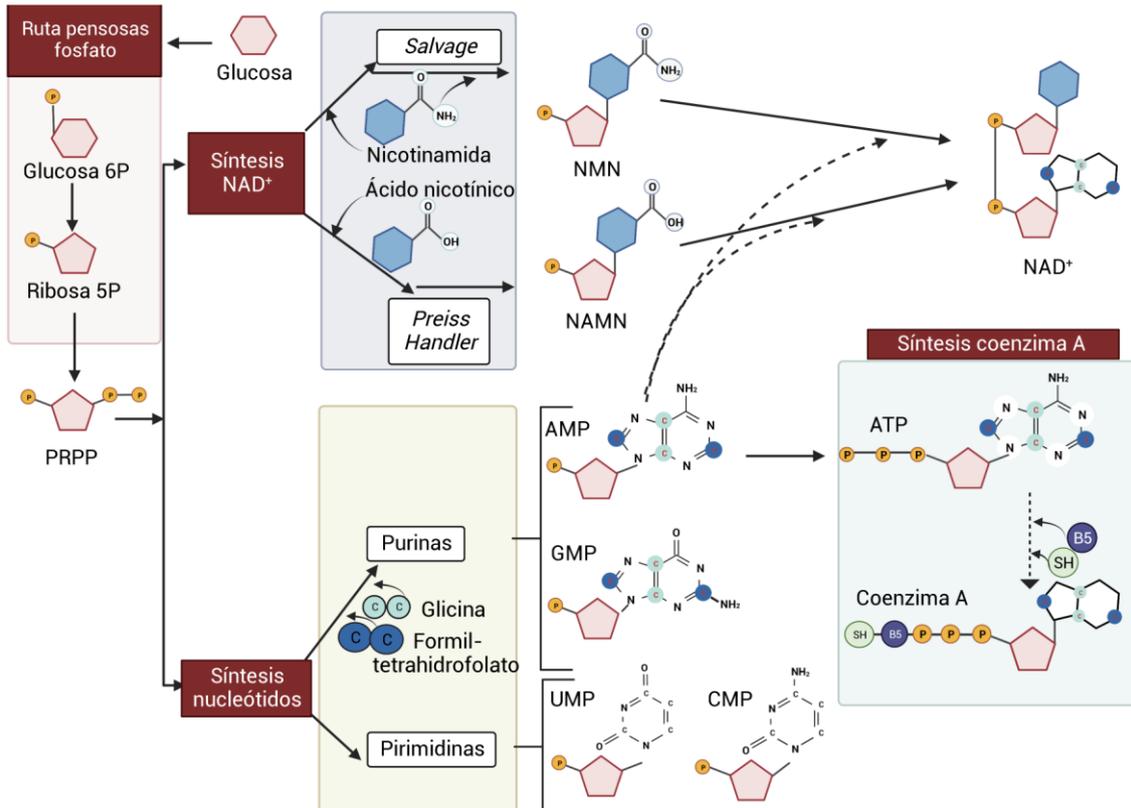


Figura 8: Rutas de síntesis de nucleótidos y coenzimas. La síntesis de nucleótidos y coenzimas precisa un precursor común derivado de la ribosa 5-fosfato, el PRPP. En la síntesis de NAD⁺ se precisan también los precursores nicotinamida y ácido nicotínico que pueden obtenerse de la dieta y convertirse en NAD⁺ por dos vías principales. En la vía de *salvage*, la nicotinamida se convierte en NAD⁺ mediante la producción de nicotinamida mononucleótido (NMN) por la nicotinamida fosforribosil transferasa. En la vía de *Preiss-Handler*, el ácido nicotínico se convierte en ácido nicotínico mononucleótido (NAMN) por la ácido nicotínico fosforribosil transferasa. Ambos precursores son finalmente transformados en NAD⁺ por la incorporación de un ribonucleótido de adenina. El anillo de adenina y guanina de las purinas se genera a partir de glicina y formil-tetrahidrofolato derivado del 3-fosfoglicerato glucolítico, para formar los nucleótidos adenina 5´ monofosfato (AMP) y guanina 5´ monofosfato (GMP). En la síntesis de pirimidinas, el PRPP genera 5´ monofosfato de uridina (UMP) y 5´ monofosfato de citidina (CMP). El coenzima A se obtiene de un ribonucleótido trifosfato de adenina, vitamina B5 y el grupo tiol reactivo (SH). El coenzima A se precisa en la síntesis de acCoA por el PDC.

8. METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE LA RESPUESTA A PATÓGENOS

En los últimos años, el papel de la reprogramación metabólica en la función de las células inmunes ha permitido considerar el inmunometabolismo como un campo emergente de investigación, susceptible de aplicación para la búsqueda de dianas terapéuticas (104,105).

La activación por los PAMPs aumenta la demanda de nutrientes necesarios para iniciar una respuesta efectiva. Estos son proporcionados por rutas metabólicas que desarrollan tres funciones principales: i) Obtención de energía, ii) producción de “bloques de construcción” necesarios para el mantenimiento y la proliferación celular y iii) modulación de la respuesta celular. Además, algunos metabolitos funcionan como

moléculas de señalización durante la estimulación celular (106) y otros son necesarios para llevar a cabo modificaciones epigenéticas que regulan la expresión de genes de interés para la respuesta inmune (107).

Sin embargo, esta reprogramación metabólica no es igual en todas las situaciones y puede influirse por la disponibilidad de nutrientes del medio, por el tipo de estímulo, el tiempo de estimulación y los requisitos funcionales de cada tipo celular, lo que en última instancia producirá una reprogramación metabólica característica (108).

Las investigaciones iniciales mostraron que la estimulación de las CDs por el sistema TLR4/LPS en presencia de oxígeno mimetiza el efecto de la hipoxia con aumento del flujo glucolítico y producción de lactato, junto a la caída concomitante de la OXPHOS. Este mecanismo conduce a la estabilización de HIF1 α (109) y, en el caso de las células murinas, a la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible que produce óxido nítrico, un inhibidor del complejo V de la ETC y por tanto del consumo de oxígeno (110,111). Sin embargo, investigaciones posteriores mostraron que el efecto Warburg en células inmunes es un efecto específico del LPS a través de la señalización de TLR4 en macrófagos y que ligandos de otros TLRs producen cambios metabólicos mucho más complejos (112) como ocurre en el caso de la estimulación de monocitos humanos con hifas y conidias de *Candida albicans*. Mientras que las hifas aumentan el flujo glucolítico y promueven un metabolismo Warburg propiamente dicho, la estimulación con conidias favorece la actividad glucolítica y la OXPHOS, lo que se debe, en parte a la distinción en los patrones moleculares asociados a cada uno de los patógenos, que activan receptores distintos (113) por lo que la caída de la OXPHOS paralela al aumento glucolítico tras la estimulación, no es una respuesta universal a todos los estímulos patógenos y depende del tipo celular, del tiempo y del tipo de estímulo (71). De hecho, la noción de que el aumento glucolítico se asocia con la supresión de la OXPHOS, ha sido cuestionada también en un estudio reciente, en el que se ha demostrado que las células en proliferación que muestran aumento del consumo de glucosa y liberación de lactato, también aumentan el consumo de oxígeno y la eficiencia del acoplamiento mitocondrial (114). La evidencia más reciente sugiere que la actividad mitocondrial sustenta la inducción de genes tardíos de la respuesta inmune (56,73), de tal forma que el flujo de piruvato al interior mitocondrial es necesario para la actividad pro-inflamatoria de los macrófagos, puesto que cuando éste se inhibe, se produce una disminución de la expresión de TNF α (73). No solo la entrada de piruvato en la mitocondria ha mostrado ser esencial para la respuesta inmune. Un estudio reciente mostró que el intercambiador SLC25A1 aumenta su expresión tras la estimulación (115), lo que es determinante para

umentar la disponibilidad de acCoA nucleocitosólico y activar la expresión de genes pro-inflamatorios tras cuatro horas de estimulación (82). Este mecanismo evita la conversión de citrato en isocitrato en la mitocondria, lo que dificulta la progresión del ciclo de los TCA en ausencia de otras fuentes anapleróticas (116).

El ciclo de los TCA no solo tiene una solución de continuidad a nivel del citrato, sino que tras la estimulación de los macrófagos, el ciclo de los TCA se interrumpe a nivel de la SDH y se produce la acumulación de succinato (116,117). El succinato es el responsable de la estabilización de HIF1 α al inhibir la proil hidroxilasa. El importante papel de HIF1 α en la regulación de la expresión de las enzimas de la glucólisis explica el aumento del flujo glucolítico y la producción de IL-1 β (80). Dado que el ciclo de los TCA tiene una discontinuidad a nivel de citrato, el succinato se produce por anaplerosis de glutamina, que en el proceso de glutaminólisis genera α -KG y mantiene los pasos finales del ciclo de los TCA (80,110). Esto explica que tras la glucosa, la glutamina sea la fuente más importante de carbono en el ciclo de los TCA.

Mantener activas la glucólisis y la OXPHOS requiere la presencia de NAD⁺ y NADH, respectivamente, por lo que la compartimentalización de las coenzimas es indispensable para mantener el balance energético. De hecho, el desequilibrio del balance redox NAD⁺/NADH favorece la proliferación celular *in vitro* y la tumorigénesis *in vivo* (118–120).

Las coenzimas se regeneran gracias a dos sistemas lanzadera que comparten actividades enzimáticas en el citosol y la mitocondria. Estudios recientes han mostrado la importancia de ambas lanzaderas en el control de la respuesta inmune innata y adaptativa. La activación temprana de los linfocitos T requiere proliferación y remodelación epigenética dependientes de la actividad de la lanzadera malato-aspartato (121). Asimismo, un estudio reciente ha mostrado su importancia en la regulación del balance entre Th17 y Treg en modelos experimentales de encefalomiелitis autoinmune y su posible utilización como estrategia terapéutica (122).

La lanzadera del glicerol 3-fosfato regula la reprogramación metabólica en macrófagos estimulados con LPS desde un estado pro-inflamatorio a un estado de tolerancia dependiente de la oxidación de la glucosa y de la producción de acCoA nucleocitosólico, la acetilación de histonas y la expresión de genes pro-inflamatorios como *IL6* e *IL1B* (82). En células NK, el aumento de la demanda glucolítica tras la estimulación se acompaña del incremento del consumo de oxígeno y de la salida del citrato mitocondrial al citosol, que a través de la lanzadera citrato-piruvato impulsa la OXPHOS a través del piruvato generado por la enzima málica (123).

INTRODUCCIÓN

El aumento del flujo glucolítico se acompaña de un aumento de la actividad de la ruta de las pentosas fosfato (80) lo que tiene dos consecuencias: La producción de ribosa 5-fosfato para la generación de nucleótidos y coenzimas, y la generación de NADPH. Estudios recientes han mostrado en macrófagos estimulados con LPS el aumento de la expresión de la enzima limitante de la ruta de síntesis *salvage* del NAD (124–127). La caída de la concentración de NAD⁺ se relaciona con un consumo excesivo por las poli(ADP)ribosa polimerasa que reparan el daño en el DNA ocasionado por los ROS, por lo que la vía de *salvage* tendría un papel fundamental en la reparación del daño producido en la célula huésped durante la respuesta a los patógenos (72). Estudios previos han demostrado que los niveles de NAD⁺ en el núcleo aumentan tras la estimulación con zymosan en CDs, lo que se acompaña de la regulación de la actividad de la proteína sirtuina 1, que precisa NAD⁺ como cofactor, desmetila la histona 3 y regula el balance IL-12/IL-23 (128). La Figura 9 muestra una representación esquemática de la reprogramación metabólica mencionada anteriormente.

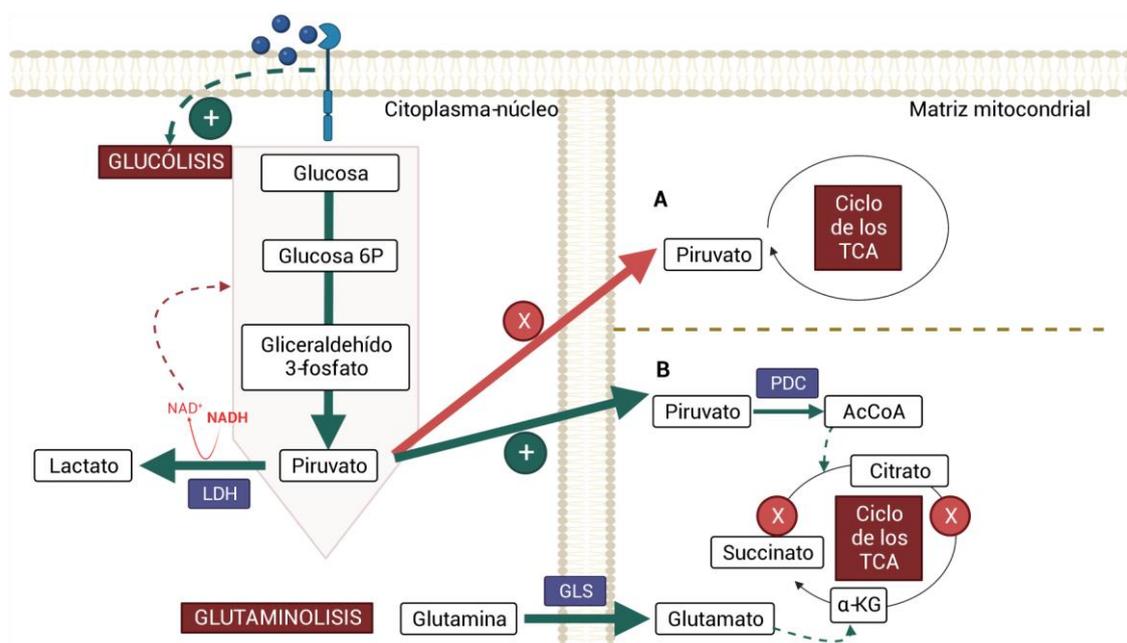


Figura 9. La reprogramación metabólica iniciada por los PAMPs.

El aumento de la glucólisis tras la estimulación de las células inmunes refuerza la producción de lactato por la LDH, incluso en presencia de oxígeno, y reduce la OXPHOS. La Figura representa esta reprogramación metabólica como situación (A). Algunos ligandos de receptores de CLR y TLR producen cambios metabólicos mucho más complejos y el aumento del flujo glucolítico no se acompaña de la caída de la OXPHOS, siendo la entrada de piruvato en la mitocondria imprescindible para una adecuada respuesta inmune. El ciclo de los TCA tiene discontinuidades a nivel del citrato y del succinato. La acumulación de succinato en el ciclo de los TCA es consecuencia de la anaplerosis de glutamina, que mediante la glutaminasa (GLS) produce glutamato y en última instancia α-KG. Este aporte permite el mantenimiento de los pasos finales del ciclo de los TCA. La Figura representa esta reprogramación como situación (B).

IV. OBJETIVOS

El objetivo general ha sido caracterizar el comportamiento metabólico de las CDs estimuladas por el patrón fúngico zymosan y determinar los efectos que la modulación de este metabolismo ejerce sobre la regulación transcripcional de la producción de citoquinas. Se ha pretendido analizar el comportamiento de la glucólisis, la OXPHOS, los intermediarios del ciclo de los TCA y la ETC. Con este propósito se fijaron los siguientes objetivos específicos.

1. Caracterizar la reprogramación metabólica de las CDs estimuladas con el patrón fúngico zymosan:

1.1 Perfil metabólico inducido por la estimulación y análisis de los niveles intracelulares de los intermediarios metabólicos.

1.2 Estudiar las fuentes energéticas necesarias para la reprogramación metabólica.

1.3 Estudiar el efecto de las lanzaderas mitocondriales durante la estimulación, su relación con el mantenimiento de la reprogramación metabólica y con la producción de citoquinas.

2. Analizar los efectos de la modulación de los intermediarios metabólicos sobre la expresión de citoquinas:

2.1 Definir el papel del metabolismo mitocondrial del piruvato sobre la transcripción de las citoquinas IL-23, IL-10, IL-1 β y TNF α .

2.2 Estudiar la dependencia del piruvato de la acetilación de histonas en los promotores de las citoquinas IL-23 e IL-10.

2.3 Determinar el efecto de la suplementación con citrato sobre la regulación transcripcional de las citoquinas.

2.4 Determinar el efecto del succinato extracelular y el receptor GPR91.

2.5 Estudiar el efecto de análogos permeables del succinato sobre los niveles de intermediarios metabólicos y la expresión de citoquinas.

2.6 Analizar los efectos de la modulación farmacológica de la actividad de la succinato deshidrogenasa sobre el fenotipo metabólico, los niveles de intermediarios y la expresión de citoquinas.

3. Estudiar la incorporación de carbonos de la glucosa y la glutamina en la glucólisis, el ciclo de los TCA y nucleótidos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

Agilent technologies: XF RPMI pH 7.4 sin rojo fenol, etomoxir

Bio-rad: Poliacrilamida

Biotium: *GelRed nucleic acid stain*

Cambridge Isotope Laboratories: U-¹³C₆(Glucosa), U-¹³C₅(L-Glutamina)

Fluca: Nonidet-P-40

GE Healthcare: *Ficoll-Paque*

Gibco: Suero bobino fetal (FBS)

Hyclone™: RPMI 1650 con 2mM L-glutamina

Ibiantech: Zymosan deplecionado

Invitrogen: TRIzol®, transcriptasa inversa, oligos N6, MitoSOX™

Lonza: L-glutamina, penicilina/estreptomicina

Merck: Tris-HCL, KCL, Tris, KH₂PO₄, MgCl₂

Miltenyi Biotec: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-4

Promega: RNAsin

Santa Cruz: Reactivos para los estudios de inmunoprecipitación de la cromatina

Scharlab: Cloroformo, isopropanol, metanol, etanol, acetonitrilo, glicina, NaCl, Na₂HPO₄

Sigma-Aldrich: Albúmina de suero bovino (BSA), SyBr Green I Master Mix, zymosan de *Saccharomyces cerevisiae*, formaldehido, 2-Desoxi-D-glucosa (2-DG), dicloroacetato, EDTA, EGTA, dodecilsulfato sódico (SDS), ortovanadato, *Tween-20*, HEPES, poli-L-lisina, Tritón, ditiotreitól (DTT), citrato sódico, acetato sódico, β-glicerofosfato, L-ácido aspártico, dimetilmalonato (DMM), BMS-303141, 4,4,4-trifluoro-1-(2-tienil)-1,3-butanodiona (TTFA), ácido 3-nitropropiónico (3-NPA), sal disódica del ácido succínico, UK-5099, ácido aminooxiacético (AOA), dimetilsuccinato, BPTES, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), oligomicina, rotenona, antimicina, diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína (DCF).

Stemcell: OptiPrep

Thermo Scientific: ECL, dNTPs, marcadores de peso molecular.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. OBTENCIÓN DE MONOCITOS Y DIFERENCIACIÓN A CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células sanguíneas se obtuvieron de la capa leuco-plaquetaria que aparece entre el plasma y los glóbulos rojos tras la centrifugación de sangre anticoagulada. Esta fracción de células sanguíneas se conoce habitualmente con el término inglés *buffy coat*. Los *buffy coats* obtenidos de donantes sanos con grupo sanguíneo 0 se proporcionaron por el BioBanco del Centro Regional de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.

Los *buffy coats* se diluyeron 1:1 (v:v) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄). Unos 30 ml de esta mezcla se añadieron cuidadosamente sobre *Ficoll-Paque* en proporción 1:3 (muestra:*Ficoll-Paque*). Las muestras se centrifugaron a 20°C y 700 x g durante 30 minutos, sin freno, lo que permite la correcta separación de las diferentes fases. En la región superior se encuentra la fase líquida que contiene el plasma diluido y debajo de ésta se encuentran sucesivamente, un anillo de células mononucleares, el *Ficoll-Paque* y, finalmente, los polimorfonucleares mezclados con los eritrocitos en el fondo del tubo. Las células mononucleares se recogieron por aspiración con pipeta Pasteur y se añadieron a un tubo con PBS para su lavado por centrifugación a 440 x g, durante 10 minutos. La fracción celular se resuspendió en 3 ml de OptiPrep (Iodixanol 60%), sobre el que se añadieron 7 ml de *Ficoll-Paque* de densidad 1.072 g/ml para crear un gradiente discontinuo por la adición de una solución de OptiPrep de densidad 1.068 g/ml, suplementada con 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) y una solución tamponada con HEPES y EDTA 1 mM. La mezcla se centrifugó a 700 x g, durante 25 minutos a 20°C.

Este tratamiento permite una separación en varias fases en función de la densidad. La fase superior se compone de un anillo de monocitos que se encuentra sobre la solución de OptiPrep de densidad 1.068 g/ml, seguida de otro anillo de linfocitos y del *Ficoll-Paque*. El anillo de monocitos se lava con PBS y el proceso de separación usando soluciones de OptiPrep y *Ficoll-Paque* se repite para conseguir la eliminación completa de los linfocitos.

Tras la última fase de separación, se hace el recuento microscópico de los monocitos en una cámara de Malassez. Los monocitos se resuspenden en medio RPMI suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina y 1% penicilina/estreptomicina, se distribuyen en placas de cultivo de 100 mm y se cultivan a 37°C. Al cabo de dos horas, los monocitos adheridos se seleccionan tras eliminarse por aspiración del medio con los

linfocitos que permanecen en suspensión. Posteriormente, se inicia el proceso de diferenciación a células dendríticas inmaduras en presencia de medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FBSi), 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, 500 U/ml de IL-4 y 800 U/ml de GM-CSF. La diferenciación se mantiene durante 5 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. El FBSi se mantuvo al 10 % durante el proceso de diferenciación y se redujo al 2% antes del comienzo de los experimentos (Figura 10).

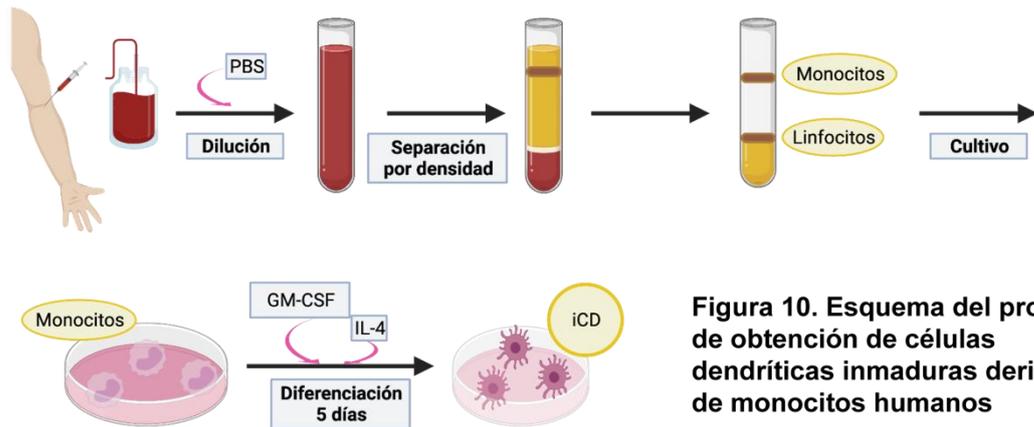


Figura 10. Esquema del proceso de obtención de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos humanos

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.1. EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO RIBONUCLEÓTIDO (RNA) TOTAL

La extracción del RNA se realizó siguiendo el protocolo descrito por Chomezynski y Sacchi utilizando TRIzol[®]. Este método se basa en la diferente solubilidad de los ácidos nucleicos y el resto de los componentes de la muestra en dos fases no miscibles. El TRIzol[®] se compone de una mezcla de fenol, en la que los ácidos nucleicos son insolubles, y tiocianato de guanidina, que actúa como agente desnaturante de proteínas e inhibidor de las proteasas a pH 4.5. De esta forma, se mantiene el RNA íntegro durante el proceso de extracción. Se añadió 1 ml de TRIzol[®] para cada 10×10^6 de CDs a las placas de 100 mm de diámetro en las que se sedimentaron las CDs por centrifugación a $12000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C. Tras conseguir una solución homogénea, se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente y se mantuvo la mezcla durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C, para obtener dos fases: la superior acuosa, que contiene el RNA, la inferior roja con la mezcla fenol y cloroformo y una interfase orgánica que contiene el DNA y las proteínas. Se recogió la fase acuosa, y se añadieron 250 μ l de isopropanol y 250 μ l de solución salina (0,8 M citrato sódico y 1,2 M cloruro sódico) si las muestras contienen alto contenido en polisacáridos, o bien, 500 μ l de isopropanol para muestras normales. La muestra se centrifugó de nuevo a $12000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C, lo que permite la precipitación del RNA. Se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 75% con H₂O DEPC (H₂O desionizada (Milli-Q), 0,01% dietilpirocarbonato) dos veces y se dejó secar al aire. Finalmente, se resuspendió en 15 μ l de H₂O DEPC y se almacenó a -80°C hasta su uso. La cantidad de RNA presente en la muestra se determinó en un NanoDrop[™] utilizando la razón de absorbancias $A_{260/280}$.

3.2. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO

Se partió de muestras de 3 μ g de RNA para obtener DNA complementario mediante la enzima transcriptasa inversa. Los 3 μ g de muestra RNA se diluyeron en 11,1 μ l de H₂O DEPC y se calentaron a 68°C durante 10 minutos, lo que permite la completa disociación del RNA. Posteriormente, se añadió al RNA diluido la mezcla de retrotranscripción: tampón 5x, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 4 μ M de N6 (mezcla de hexanucleótidos), 1 U/ μ l RNAsin, 10 U/ μ l de RT del virus de la leucemia murina y H₂O DEPC hasta completar el volumen de 20 μ l. Las muestras se incubaron a 37°C durante una hora. El cDNA se almacenó a -20°C.

3.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Las secuencias específicas de cDNA correspondientes a los genes de interés se amplificaron mediante reacciones en cadena de la polimerasa. Los cebadores se diseñaron según las secuencias humanas obtenidas en *GeneBank* (Tabla 1) y se eligieron en distintos exones con el fin de descartar la contaminación genómica.

Nombre	Secuencias (5'-3')	
	Sentido	Antisentido
<i>IL23A</i>	CATGGGCCTTCATGCTATTT	TTTGCATTGTCAGGTTTCCA
<i>IL10</i>	GAGAACAGCTGCACCCACTT	GGCCTTGCTCTTGTTTTTCCAC
<i>TNF</i>	GTTGTAGCAAACCCTCAAGC	TTGAAGAGGACCTGGGAGTA
<i>IL1B</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA
<i>GAPDH</i>	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGAGATTTCAGTGTGGTG
<i>NADPH oxidasa 2</i>	TGTTTCAGCTATGAGGTGGTGA	TCAGATTGGTGGCGTTATTG
<i>NADPH oxidasa 5</i>	ACTATCTGGCTGCACATTCG	ACACTCCTCGACAGCCTCTT
<i>SDHA</i>	CAGCATGTGTTACCAAGCT	GGTGTCTAGAAATGCCAC
<i>SLC13A2</i>	TTCGAGCTCCAGGAACCAAG	GGGTGAGGTGGAGATGCTT
<i>SLC13A3</i>	CAAAGGCTGTGAGGAATCGG	AGTGAAGAAGGCGATGACCA
<i>SLC13A5</i>	TTCCTGACAGCAAGGACCTC	TACTCCTCCTGCAGCACCTT
<i>SUCNR1</i>	CTGGCAGAGTTCCTGTCAAG	CAGCATGTCTAGTTGTTCA

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección de transcritos humanos.

Para realizar la PCR se emplearon 12,5 µl de SyBr Green I Master (Roche), que posee la propiedad de aumentar su fluorescencia tras la unión al DNA, 1,5 µl del cDNA y 10 µM de cada cebador. La mezcla se completó hasta un volumen final de 25 µl con H₂O Milli-Q. Se utilizó un equipo de PCR LightCycler 480 (Roche). Las condiciones estándares usadas se resumen en la tabla 2, si bien el programa se modificó en función del fragmento amplificado y de los oligonucleótidos usados.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial (<i>Hot start</i>)	95	5'	1x
Desnaturalización	95	15"	45x
Hibridación	60	20"	
Elongación	72	5"	
Melting	55 a 95	5"	1x
Cooling	40	10'	1x

Tabla 2. Condiciones estándares usadas en PCR.

La curva de fusión se obtuvo midiendo la emisión de fluorescencia de SyBr Green durante el cambio progresivo de temperatura entre 60°C y 95°C, a razón de 0,2°C/seg. Para verificar la eficiencia del proceso, se amplificó como gen de expresión constitutiva *GAPDH*. Esto permite valorar la abundancia relativa de los diferentes mRNAs usando el método comparativo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los resultados se expresaron como la media del ciclo de

umbral (Ct) del gen que se analiza con respecto a los Ct de la *GAPDH* (ΔCt condición x = Ct gen diana – Ct *GAPDH*) y a este valor se le resta el ΔCt del control ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ condición x - ΔCt control). La **Figura 11** muestra una representación esquemática del abordaje experimental del análisis de la expresión génica.

1. Extracción de RNA total



2. Síntesis de DNA complementario



3. Análisis mediante PCR en tiempo real

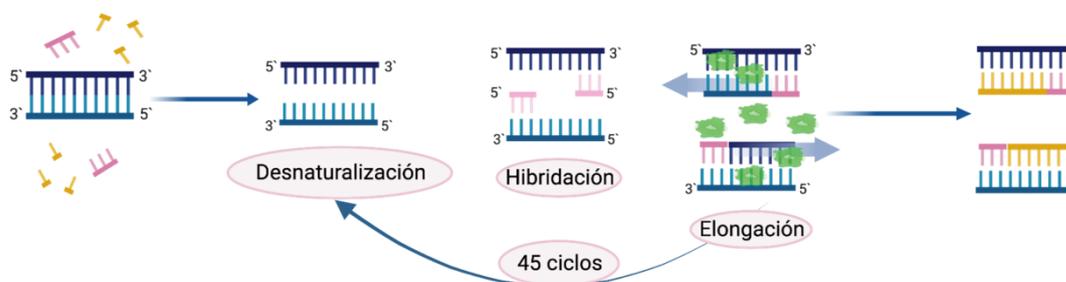


Figura 11. Esquema del proceso de análisis de expresión génica por qPCR

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES PARA LA INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

En general, se partió de 5×10^6 células por condición. Las células se lavaron con PBS por centrifugación a $440 \times g$ durante 5 minutos y se lisaron tras la adición de $50 \mu\text{l}$ de un medio compuesto por 20 mM HEPES, 2 mM ortovanadato, 2,5 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, 40 mM β -glicerofosfato, 1 mM DTT y 1% Nonidet P-40, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1 mg/ml leupeptina, 5 mg/ml aprotinina, 0,1 M PMSF, 1 M NaF, 0,1 M pNPP, 0,1 M DTT y 200 mM ortovanadato). Tras una incubación en hielo de 30 minutos, se centrifugó el lisado a $12000 \times g$ durante 10 minutos para obtener los sobrenadantes con los extractos proteicos. El método colorimétrico descrito por Bradford (129), permite la cuantificación de las proteínas por el desplazamiento del máximo de absorción (entre 465-595 nm) del colorante azul de Coomassie G-250 unido a las proteínas. La concentración de proteínas se midió valorando la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, utilizando como referencia una curva patrón construida con BSA.

4.2. INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT)

Para la separación de las proteínas, se cargaron 50-100 μg de muestra y se sometieron a electroforesis en condiciones de desnaturalización y reducción según el protocolo de Laemmli (130). De esa forma se separan las proteínas en función de su tamaño por migración hacia el polo positivo. Se usaron geles de poliacrilamida al 8,10 ó 12% en función del peso molecular de la proteína de interés en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 0,2 M glicina, 1 g/l SDS). Junto con las muestras, se desarrollaron estándares preteñidos de tamaños moleculares conocidos para poder localizar la proteína problema por su relación con un tamaño molecular conocido del estándar. La electroforesis se desarrolló en 110 minutos a 25 mA en tampón de electroforesis.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en condiciones de humedad y frío en una cubeta de electroforesis Bio-Rad, usando un tampón de transferencia (25 mM Tris, 0,2 M glicina, 20% metanol (v/v), 1 g/l SDS) a 100 V durante 90 minutos. La membrana de nitrocelulosa se lavó con TTBS (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,6) y se bloqueó por incubación en una solución rica en proteínas compuesta por TTBS y 5% (p/v) de BSA o leche desnatada en función de las especificaciones del anticuerpo primario. La incubación se realizó en agitación suave a temperatura ambiente durante una hora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se incubaron en agitación lenta con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche en cámara fría a 4°C. Tras lo cual, se procedió a lavar la membrana con TTBS tres veces durante 10 minutos para eliminar el anticuerpo primario no adherido específicamente a la membrana. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo durante una hora en agitación lenta a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se procedió a lavar la membrana de nuevo con TTBS para eliminar el anticuerpo secundario no adherido específicamente a la membrana. Las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL, en agitación durante 1 minuto, lo que permite la detección de anticuerpos conjugados específicamente con peroxidasa, y se expusieron a películas auto-radiográficas que se revelaron con un equipo Curix-60 de AGFA. La relación de anticuerpos utilizados para *Western Blot* se resumen en la **Tabla 3**. La **Figura 12** muestra una representación esquemática del abordaje experimental del análisis de proteínas.

Anticuerpo	Características	
	Casa comercial	Dilución
β -actina	Sigma-Aldrich	1:5000
HIF1 α	Novus Biologicals	1:500
Histona H3	Abcam	1:1000
Pro-IL1 β	Cell signaling	1:1000
β -Tubulina	Sigma-Aldrich	1:20000
Acetil-K14-histona H3	Millipore	1:1000
Acetil-K9-histona H3	Millipore	1:500
P-S10-histona H3	Millipore	1:1000
PDC-E1- α	Abcam	1:1000
P-S293-PDC- E1- α	Abcam	1:1000
SLC13A2	Thermo Fisher Scientific	1:250
SLC13A5	Thermo Fisher Scientific	1:250

Tabla 3. Anticuerpos, casas comerciales y concentraciones usadas.

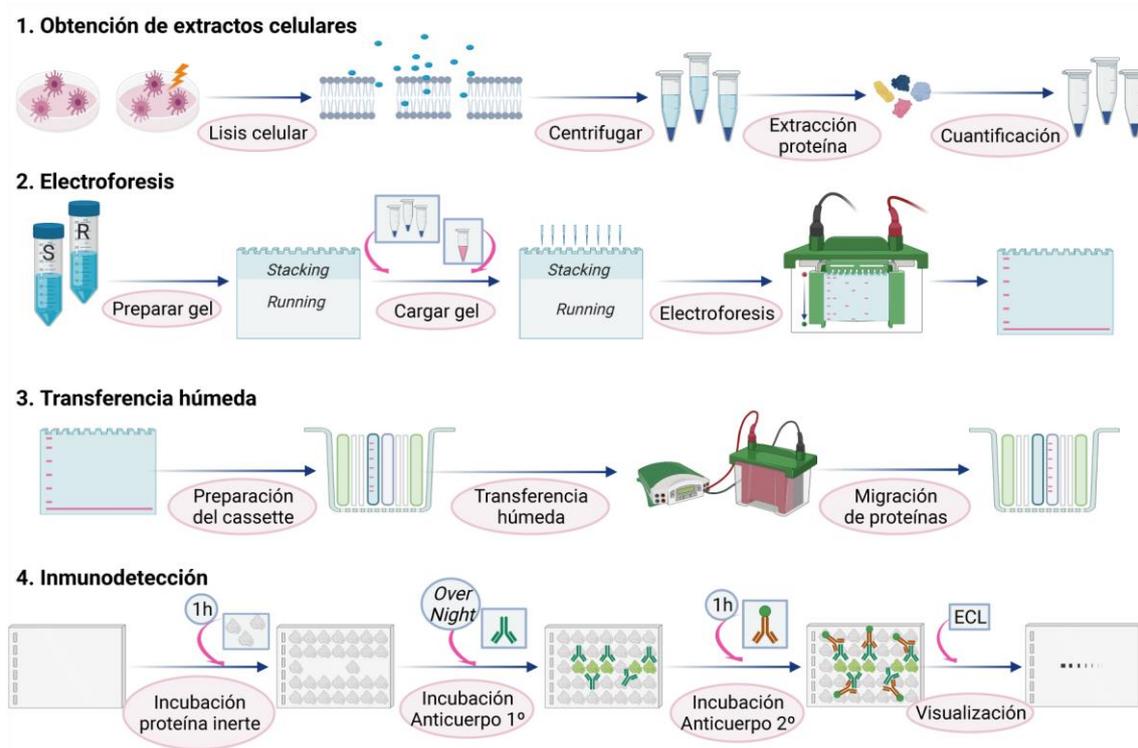


Figura 12. Esquema del proceso de análisis de proteínas por Western Blot

4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER

La suspensión de células a la concentración de 4×10^5 células/ml se aplicó sobre cristales de 12 mm de diámetro cubiertos con poli-L-lisina para lograr su adherencia durante al menos 12 horas. Tras la estimulación, se lavaron con una solución de BSA al 0,2% en PBS y se añadió formaldehído al 10% en PBS durante 30 minutos, para su fijación. Los cristales se volvieron a lavar 2 veces y se añadió Tritón al 0,3% para obtener la permeabilización. Tras una incubación de 10 minutos, la preparación se bloqueó con FBS durante 20 minutos. Los cristales se lavaron durante 5 minutos con PBS/BSA y se incubaron con el anticuerpo anti-SUCNR1/GPR91 (Novus Biologicals, dilución 1:50 en PBS suplementado con el BSA al 1%) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, los cristales se lavaron 3 veces durante 5 minutos y se añadieron el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo generado en cabra marcado con Alexa-Flúor® 480, dilución 1:100) y el DAPI (Dilución 1:1000) para teñir los núcleos. Las preparaciones se lavaron por última vez y se montaron sobre una gota de Gelvatol en un portaobjetos de tamaño 26 x 76 mm y se sellaron con esmalte. Los cristales se observaron en un microscopio Leica TCS SP5 con un láser de luz blanca y un objetivo de aceite de inmersión Leica 63PL APO NA 1.40. El análisis de las imágenes y los fluorogramas de co-localización subcelular se realizaron utilizando el *software* LAS AF Lite del confocal Leica y el *software* Adobe Photoshop CS5.1

5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA

Con el fin de analizar modificaciones específicas en las histonas de los nucleosomas localizados en las regiones de los promotores de los genes a estudiar, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Los reactivos utilizados fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) siguiendo el protocolo *Chip Lysis Buffer High SALT*: cs-45001, con anticuerpo frente a anti-lisina 9-histona 3. Los *primers* utilizados para PCR de ChIP fueron los siguientes:

Promotor	Secuencias (5' - 3')	
	Sentido	Antisentido
IL23A sitio κB	CTGGGTTTCCGATTTTCTCA	CCCATGTGACGAAATGACTG
IL10 sitio CRE	GGCAATTTGTCCACGTCACT	TGATTTCTGGGGAGAACAG

5.1. FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA

Se cultivaron 2×10^7 CDs por condición en placas de 100 mm de diámetro. Tras la estimulación, se añadió formaldehído al 1% al medio de cultivo durante 15 minutos para fijar las uniones entre las proteínas y el DNA. Para detener el entrecruzamiento proteína-DNA, se añadió glicina 0.125 M durante 5 minutos. Las células se lavaron con PBS frío, se recogieron en tubos y se dejaron 30 minutos a 4°C con el tampón de lisis. Se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y se lavó el precipitado con PBS frío. El precipitado celular se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C durante toda la noche. Para la fragmentación de la cromatina, se utilizó un sonicador tipo Bioruptor™ (Diagenode). La frecuencia de ultrasonidos producida por el Bioruptor™ equivale a 20 kHz. Las muestras se descongelaron y se resuspendieron en 300 μ L de tampón de lisis de alta salinidad. Se sonicaron durante 5 minutos en 4 tandas en presencia de hielo para obtener fragmentos de DNA de tamaño comprendido entre 100 y 1000 pares de bases. Tras la sonicación, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 9300 x g a 4°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante que contiene la cromatina y parte de éste se utilizó como control (*input*). Las muestras de cromatina se incubaron en un agitador orbital a 4°C durante una hora en presencia de 50 μ L de proteína A/G Plus agarosa para disminuir las uniones inespecíficas. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad y se añadieron 10 μ g del anticuerpo correspondiente. La incubación se mantuvo durante la noche en rotación a 4°C. Posteriormente se añadieron 50 μ L de la solución de proteína A/G Plus agarosa durante 2 horas a 4°C y la mezcla se centrifugó a 13400 x g. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las bolas de A/G Plus Agarosa dos veces con un tampón de alta salinidad y cuatro lavados con un tampón de lavado comercial. Para deshacer los entrecruzamientos proteína-DNA y liberar el DNA,

se añadió medio de elución. Se tomaron 50 μL de la solución de cromatina fragmentada sin incubación con el anticuerpo y se añadieron 300 μL de H_2O Milli-Q y 16 μL de NaCl al 5%, para el control de la fragmentación de la cromatina. La muestra se mantuvo durante 4 horas a 68°C para revertir el entrecruzamiento proteína-DNA. Se dejaron atemperar las muestras y se añadieron 400 μL de la solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó 3 minutos a $14000 \times g$ a temperatura ambiente. Se obtuvo una fase acuosa a la que se le añadieron 40 μL de acetato sódico 3 M y 1 ml de etanol al 100% y se mantuvo a -20°C durante toda la noche para precipitar el DNA, tras lo cual las muestras se centrifugaron durante 25 minutos a $14000 \times g$ a 4°C . El precipitado resultante se resuspendió en 100 μL de H_2O estéril.

5.2. VISUALIZACIÓN DE LA CROMATINA

Para llevar a cabo la visualización, se tomaron 15 μL de solución de cromatina y se cargaron en un gel de agarosa al 1% con marcadores de DNA. Su visualización se realizó mediante tinción con GelRed para confirmar que la fragmentación se había realizado correctamente. Tras la purificación de DNA, se realizaron las amplificaciones por qPCR en 25 μL de mezcla de reacción empleando los *primers* especificados anteriormente. La **Figura 13** muestra una representación esquemática del abordaje experimental de la inmunoprecipitación de la cromatina.

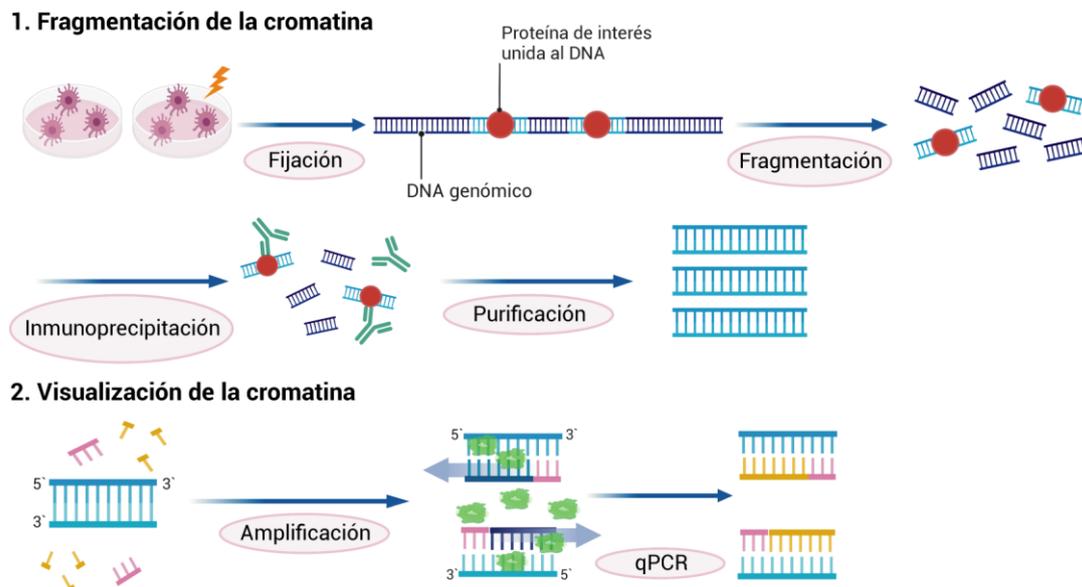


Figura 13. Esquema del proceso de experimentación de la técnica inmunoprecipitación de la cromatina

6. ANÁLISIS METABOLÓMICO

Se aplicó este abordaje para determinar la concentración intracelular de los intermediarios metabólicos producidos en la glucólisis, el ciclo de los TCA, la ruta de las pentosas fosfato y la síntesis de nucleótidos y coenzimas. Con este propósito se utilizaron 2×10^7 células por condición y se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra-rendimiento de fase reversa acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS). El proceso implica tres fases igualmente importantes: i) Preparación de las muestras, ii) separación cromatográfica y análisis metabolómico, iii) análisis de datos.

Las células se lavaron mediante centrifugación en PBS frío y se resuspendieron en la mezcla acetonitrilo:metanol:agua (2:2:1, v/v/v) que permite la desnaturalización de las enzimas y la desproteinización. Posteriormente se agitó la mezcla en vórtex durante 30 segundos y se congeló en nitrógeno líquido a -192°C durante un minuto para detener el metabolismo. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se sonicaron durante 15 minutos. Proceso que se repitió dos veces. Finalmente, se incubaron durante 1 hora a -20°C y se centrifugaron a $16000 \times g$ durante 15 minutos para la desproteinización. Todo el proceso se realiza en frío para evitar la degradación de los intermediarios metabólicos. El contenido del *pellet* proteico se cuantificó usando el método de Bradford y el sobrenadante se evaporó a sequedad en un evaporador tipo *SpeedVac*. El residuo sólido se resuspendió en la mezcla acetonitrilo:agua (1:1, v/v). Se sonicó durante 10 minutos a 4°C y se centrifugó a $16000 \times g$ durante 15 minutos para eliminar el material insoluble. Previamente al análisis por UPLC-MS, las muestras se volvieron a evaporar a sequedad y se resuspendieron en H_2O Milli-Q.

La separación cromatográfica se llevó a cabo usando una columna Acquity CORTECS UPLC® C18, 100 x 2.1 mm, con partículas de $1.6 \mu\text{m}$ (Waters), conectada a una fuente de ionización por electrospray asociada a un espectrómetro de masas Q-TOF SYNAPT HDMS G2 (Waters). El gradiente de elución incluye como fases líquidas: (A) H_2O :metanol:ácido fórmico (95:5:0.1, v/v/v) con 5 mM de formiato de amonio, y (B) acetonitrilo 100% con ácido fórmico 0.1% y 5 mM de formiato de amonio. El análisis metabolómico se llevó a cabo según el modo de ion negativo usando el método MS^E que permite la detección simultánea de analitos en alta (escaneo completo) y baja energía (energía de colisión) con fragmentación parcial del ion. Todos los metabolitos se detectaron como $(\text{M}+\text{H})^-$ excepto el OAA, que se detectó como ion $(\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H})^-$.

La separación cromatográfica del coenzima A y el acCoA se llevó a cabo usando una columna Luna® Omega Polar C18, 50 x 2,1mm, con partículas de $1,6 \mu\text{m}$ (Phenomenex). El eluyente para la separación se compone de las fases: (A) H_2O Milli-

Q con 15 mM de acetato de amonio y (B) metanol:acetonitrilo (2:8, v/v) con 8.3 mM de acetato de amonio. Los analitos se detectaron en el modo de ion positivo.

6.1. ESTUDIOS FLUXÓMICOS

El análisis de incorporación de carbonos derivados de la glucosa y la glutamina se realizó mediante UPLC/MS. Dado que la cromatografía separa los analitos en función de la razón masa/carga, los carbonos M=13 se distinguen de los carbonos M=12 por la diferencia de masa.

Los experimentos se realizaron con 2×10^7 CDs preincubadas con [$^{13}\text{C}_6$ -glucosa] 10 mM durante una hora y se añadieron controles con [$^{12}\text{C}_6$ -glucosa] en las mismas condiciones experimentales, tras lo cual se estimularon con 1 mg/ml de zymosan durante 30 minutos. El mismo esquema se utilizó en los experimentos con [$^{13}\text{C}_5$ -glutamina] 4 mM. La preparación de las muestras, la separación cromatográfica y análisis metabolómico se realiza como se ha descrito en el caso de los análisis metabolómicos. La Figura 14 muestra una representación esquemática del abordaje experimental del análisis

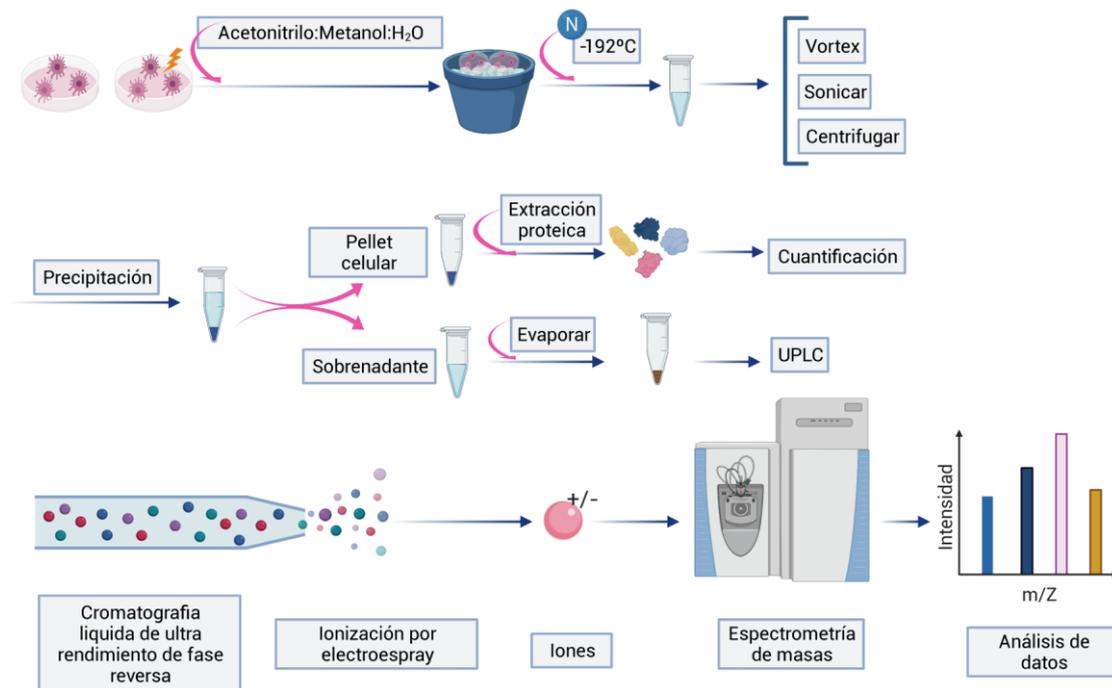


Figura 14. Esquema del análisis de intermediarios metabólicos mediante estudios metabolómicos.

7. ESTUDIOS BIOENERGÉTICOS EN TIEMPO REAL

El análisis bioenergético se realizó con el analizador de flujo extracelular *Seahorse* XF HS mini de 8 pocillos, para la mayoría de los experimentos y en otros casos con un *Seahorse* XFp24 de 24 pocillos cuando se trató de definir los parámetros energéticos con mayor detalle. En ambos casos se pre-trataron las placas de cultivo tipo *Seahorse* con poli-L-lisina durante 30 minutos y se lavaron cinco veces durante un minuto con H₂O Milli-Q, para permitir la adhesión de las células a las placas. Tras este tratamiento, se aplicaron en cada pocillo 3×10^5 células en el analizador XFp24 y 1×10^5 en el analizador XF HS mini, en un volumen de 100 μ l. Se centrifugaron a 200 x g durante 1 minuto y se completó el medio de cultivo hasta alcanzar el volumen final de 300 μ l en el caso de XF HS mini y 500 μ l en el caso de XFp24. Los fármacos utilizados para analizar los mecanismos bioquímicos se incubaron a 37°C sin CO₂ durante una hora. El medio de cultivo en ambos casos fue RPMI de Agilent sin rojo fenol, suplementado con 10 mM de glucosa, 2 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato. En el caso de los experimentos con etomoxir, el medio de cultivo no contenía estas adiciones. Una vez preparadas las placas del análisis con las células adheridas, se cargaron los cartuchos con los fármacos controles según cada protocolo y el zymosan a la concentración de 0.4 mg/ml.

7.1. RATIOS DE CONSUMO DE OXÍGENO Y ACTIVIDAD GLUCOLÍTICA EN TIEMPO REAL

La OCR se considera un indicador fidedigno de la OXPHOS, mientras que la ECAR refleja la actividad glucolítica. Los valores de OCR y ECAR se midieron siguiendo el protocolo XF *Cell Mito Stress Test Acute Injection* que determina variaciones en el pH y presión de O₂ bajo condiciones basales y en respuesta a los compuestos que se van adicionando secuencialmente desde los cartuchos cargados previamente con: oligomicina 1 μ M, que inhibe el complejo V de la ETC o ATP sintasa, FCCP 2 μ M, que desacopla la mitocondria y permite el paso de protones a través de la membrana y la mezcla rotenona/antimicina (Rot/AA) 0,5 μ M, las cuales inhiben los complejo I y III de la ETC, respectivamente. La inyección aguda en todos los casos se realizó utilizando como estímulo 0.4 mg/ml zymosan. La **Figura 15** muestra una representación esquemática del orden de inyección del estímulo y de los distintos compuestos y los efectos derivados de los mismos en OCR y ECAR.

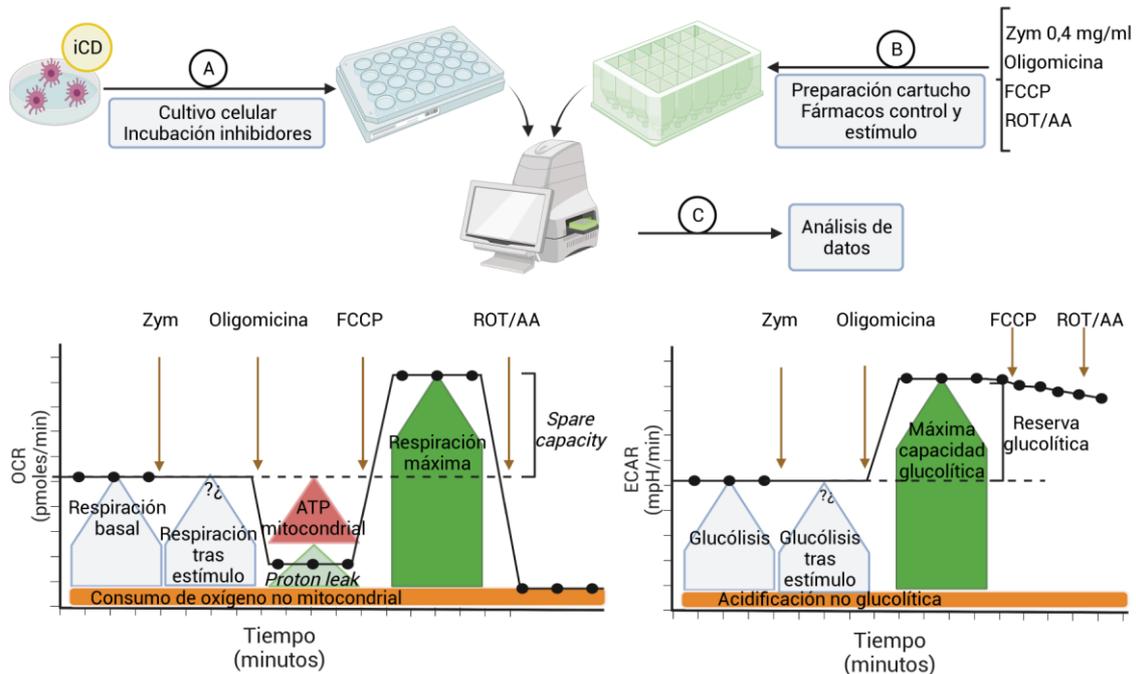


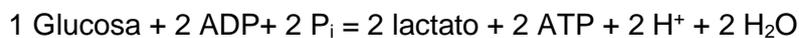
Figura 15. Esquema del estudio bioenergético mediante la tecnología Seahorse: La OCR y la ECAR.

7.2. PRODUCCIÓN DE ATP MITOCONDRIAL Y GLUCOLÍTICO EN TIEMPO REAL

Los niveles de ATP mitocondrial y glucolítico se midieron siguiendo el protocolo *XF ATP Production Rate Acute Injection*, que discrimina el ATP producido durante la glucólisis del obtenido tras la respiración mitocondrial gracias a la adición en serie de oligomicina 1,5 μM y la mezcla Rot/AA 0,5 μM . La adición de oligomicina permite el cálculo de la ratio de consumo de oxígeno acoplado a la producción de ATP durante la OXPHOS (OCR_{ATP}) según la ecuación;

$\text{OCR}_{\text{ATP}} = \text{OCR}_{\text{Total}} - \text{OCR}_{\text{Oligo}}$, el OCR_{ATP} se transforma posteriormente en mitoATP.

Asimismo, el ATP glucolítico se determina gracias a la relación estequiométrica que existe tras la conversión de una molécula de glucosa hasta lactato según la ecuación;



De tal manera que el *glycoATP* es igual a la ratio de flujo de protones glucolíticos, *glycoPER*.

Así, el *ATP production rate* (pmol ATP/min) = *mitoATP production rate* (pmol ATP/min) + *glycoATP production rate* (pmol ATP/min)

7.3. FLUJO DE PROTONES GLUCOLÍTICOS (GLYCOLYTIC PROTON EFFLUX RATE: "GRA")

La actividad glucolítica en CDs se midió usando el protocolo *XF Glycolytic Proton Efflux Rate Induced Assay (GRA)* que discrimina el flujo de protones glucolíticos del producido en la mitocondria. La conversión de una molécula de glucosa hasta CO₂ y H₂O puede liberar H⁺ al medio extracelular a partir de:

A. La oxidación de piruvato hasta lactato en el citosol:



B. La liberación de CO₂ desde la mitocondria que puede acidificar parcialmente el medio extracelular: CO₂+H₂O = HCO₃⁻ + H⁺

A partir de la medida de la cantidad de O₂ consumido, se puede determinar la cantidad de CO₂ liberado al medio extracelular, discriminando la acidificación por lactato (*glycoPER*) de la mitocondrial (*mitoPER*). Esto es importante en los casos donde el estímulo produce una gran actividad mitocondrial y pueden de esta forma falsear los datos atribuidos a la glucólisis.

La adición de la mezcla Rot/AA 0,5 μM suprime la liberación de protones derivados de la mitocondria y permite determinar la acidificación que proviene del lactato según la ecuación: $\text{GlycoPER} = \text{PER}_{\text{total}} - \text{PER}_{\text{ROT/AA}}$. La inyección posterior de 2-DG 50 mM, un análogo de la glucosa que inhibe la glucólisis al unirse de forma competitiva a la hexokinasa, evita la acidificación glucolítica.

La **Figura 16** muestra una representación esquemática del orden de inyección del estímulo y de los distintos compuestos, y los efectos derivados de los mismos en la OCR y la ECAR.

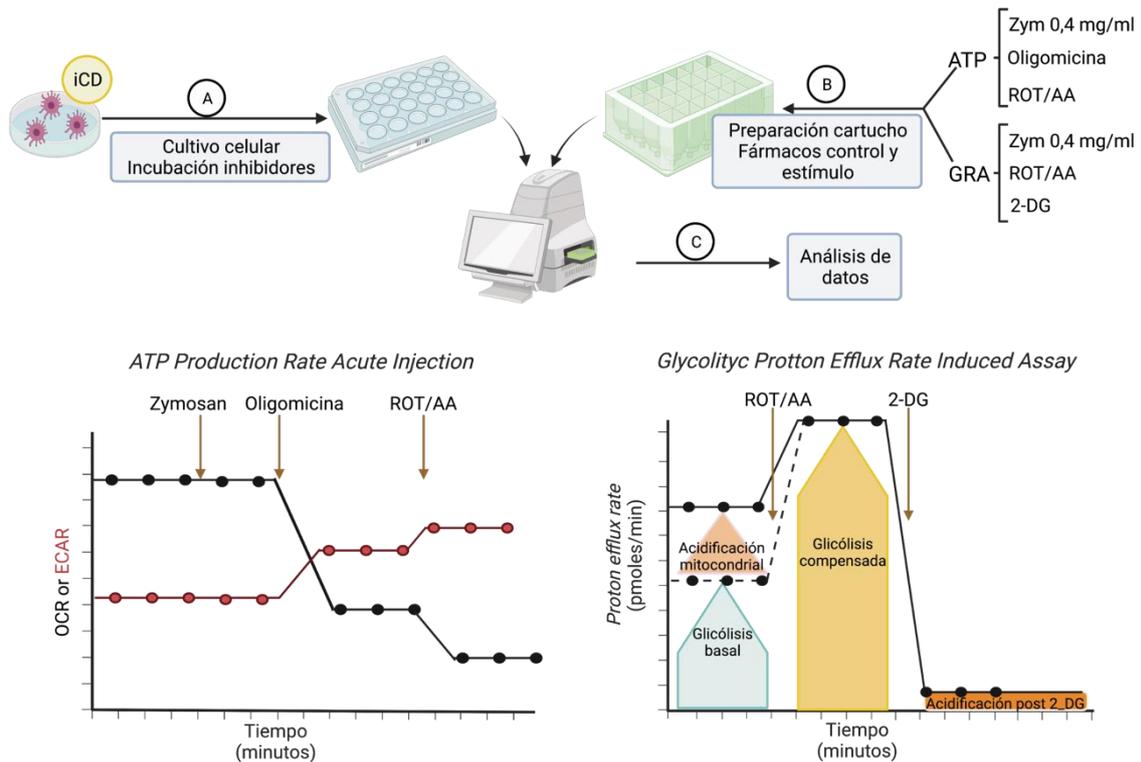


Figura 16. Esquema del análisis bioenergético: GRA y ATP.

8. ANÁLISIS DE ROS

Las CDs se preincubaron con los inhibidores de la SDH durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se estimularon con zymosan sonificado (5 partículas/célula) durante 30 minutos. Para el ensayo de los ROS citoplasmáticos, las CDs se recogieron en frío a la concentración de 10^6 células/ml y se marcaron con $10 \mu\text{M}$ de DCF en la oscuridad a 37°C durante 30 minutos. Trascendido este período, las células se lavaron dos veces con PBS. Para el ensayo de los ROS mitocondriales, 10^6 CDs/ml se preincubaron en la oscuridad con $2.5 \mu\text{M}$ de MitoSOX™ durante 10 minutos a 37°C , tras lo cual, las células se lavaron dos veces con medio HBSS suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} para optimizar la incorporación. La formación de DCF por la oxidación de DCFH y la formación de hidroetidina por la oxidación de MitoSOX™ se analizaron en un citómetro de flujo Galios usando el láser azul de 488-nm para DCF (λ_{ex} 502 nm/ λ_{em} 523 nm) y para MitoSOX™ (λ_{ex} 510 nm/ λ_{em} 580 nm). El análisis cuantitativo de los datos se llevó a cabo usando el *software* Kaluza 1.1(Beckman Coulter).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico Prisma 9.0 (GraphPad Software, Inc.) y se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se realizaron análisis ANOVA de una y dos vías. Cuando los datos no seguían una distribución normal ni tenían varianzas iguales, se aplicó una transformación logarítmica antes del análisis. La comparación entre dos grupos experimentales se llevó a cabo usando datos pareados y no pareados mediante el test *Student t-test* de dos colas, *Wilcoxon signed-rank test* y *Mann-Whitney test*. Las diferencias se consideran significativas para un valor de $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

1. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN CON ZYMOSAN SOBRE LAS CDS

1.1. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN RESPUESTA AL ZYMOSAN

El zymosan contiene la estructura de la pared externa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, lo que lo hace extremadamente útil para reproducir el efecto de los patrones moleculares fúngicos por su capacidad de unirse a los receptores dectin-1, dectin-2 y TLR2. La estimulación de las CDs con zymosan durante cuatro horas induce la expresión del mRNA que codifica las citoquinas *IL23A*, *IL10*, *TNF* e *IL1B* (Figura 17A). Cuando se utilizó zymosan en el que se había eliminado el componente de α -mananos (zymosan deplecionado), implicado en la inducción de la respuesta dependiente del receptor TLR2 y de dectin-2 (131), no se observó un aumento apreciable de la expresión de las citoquinas.

Con el fin de caracterizar la reprogramación metabólica, se analizaron los niveles de los intermediarios del ciclo de los TCA. Como se muestra en la Figura 17B, la estimulación con zymosan durante 30 minutos disminuyó los niveles intracelulares de citrato, piruvato y α -KG y aumentó los niveles de lactato, OAA y succinato. Los niveles de malato, fumarato y acCoA no se modificaron. El zymosan deplecionado no redujo los niveles de citrato y piruvato, ni la razón α -KG/succinato.

RESULTADOS

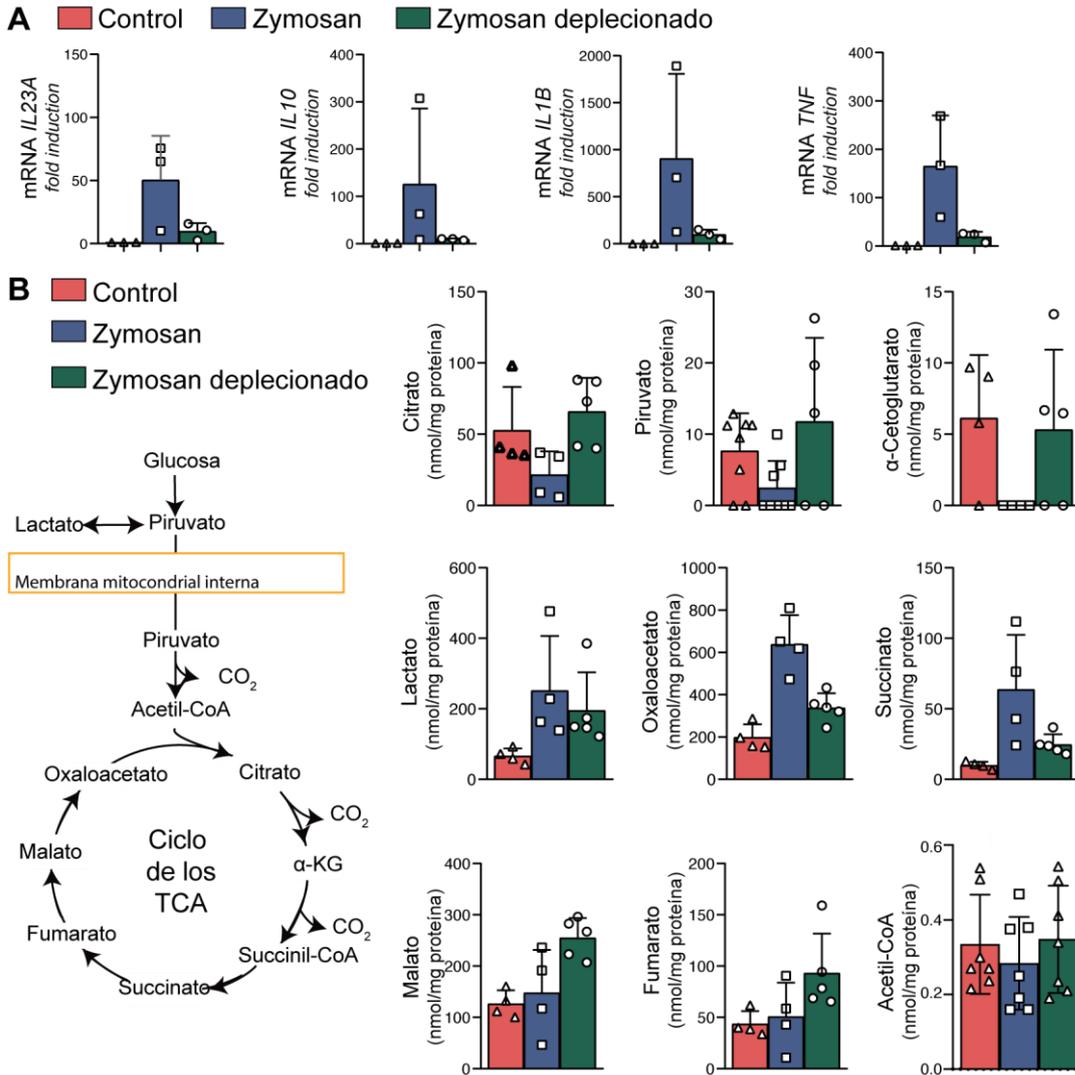


Figura 17. Reprogramación metabólica en respuesta al zymosan.

(A) Las CDs se incubaron en presencia y ausencia de 1 mg/ml de zymosan o de zymosan deplecionado durante 4 horas. Al final de este periodo, se procedió a la extracción del RNA y a la cuantificación del mRNA que codifica las citoquinas mediante qPCR. Los datos se representan como la media ± SEM.

(B) Las CDs se incubaron en presencia de zymosan o zymosan deplecionado durante 30 minutos. Al final de este proceso, se extrajeron los metabolitos para su medida por UPLC/MS. Los datos se representan como la media ± SEM.

1.2. CAMBIOS DEL FENOTIPO METABÓLICO TRAS LA ESTIMULACIÓN

Con el propósito de determinar si los cambios en los niveles de los intermediarios del ciclo de los TCA se correlacionan con cambios en el metabolismo energético, se hicieron estudios en tiempo real con la tecnología Seahorse. El zymosan aumentó la OCR y la ECAR a los 30 minutos (Figura 18A), así como la producción de ATP acoplado a la respiración y el consumo de oxígeno no mitocondrial. Sin embargo, no modificó la capacidad respiratoria máxima de las CDs (Figura 18B). En vista de la elevada producción de ATP mitocondrial inducida por el zymosan, se estudió el efecto de la

inhibición del complejo V sobre la expresión de citoquinas. La adición de oligomicina redujo la expresión de los mRNAs de las citoquinas *IL23A* e *IL10* de forma dependiente de la concentración (Figura 18C).

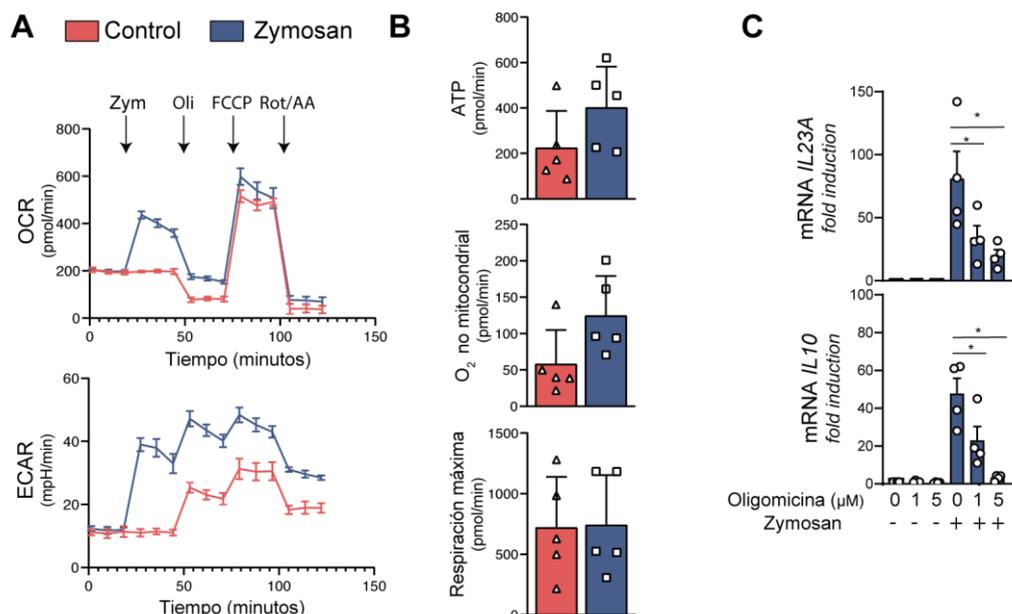


Figura 18. Fenotipo metabólico y efecto de la inhibición del complejo V sobre la expresión de citoquinas.

(A y B) Las CDs se transfirieron a placas de cultivo Seahorse para los experimentos en tiempo real en presencia de 0,4 mg/ml de zymosan, oligomicina (Oli) 1 μM, FCCP 2 μM y la mezcla Rot/AA 0,5 μM. Las gráficas muestran los resultados obtenidos utilizando el protocolo Seahorse *XF Cell Mito Stress Test Acute Injection*.

C. Las CDs se incubaron en presencia y ausencia de oligomicina durante una hora a las concentraciones indicadas. Posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de zymosan. Tras cuatro horas de estimulación, se extrajo el RNA para la cuantificación del mRNA que codifica las citoquinas *IL23A* e *IL10* mediante qPCR. Los datos se representan como la media ± SEM. *p<0.05. Datos pareados, *Student's t-test* de dos colas.

Estos datos indican un cambio del fenotipo metabólico que afecta a la glucólisis, al ciclo de los TCA y a la OXPHOS, por lo que se estudió la dependencia de estos cambios de distintas fuentes de energía utilizando inhibidores de las rutas metabólicas: UK5099 como inhibidor del transportador mitocondrial de piruvato, BPTES como inhibidor de la glutaminólisis y etomoxir como inhibidor irreversible del sitio activo de la carnitina-palmitoiltransferasa 1 y, en consecuencia, de la oxidación de ácidos grasos (Figura 19A). Las CDs se incubaron con los inhibidores durante 30 minutos antes de ser transferidas a las placas de Seahorse. Como se muestra en la Figura 19B, la adición de UK5099 disminuyó la OCR y la ECAR, de forma similar a lo que se observa al inhibir la anaplerosis de glutamina, a juzgar por el resultado obtenido con el inhibidor de la glutaminólisis BPTES. Dado que el UK5099 redujo la OCR y que esto podría dificultar la medida de la ECAR debido a la reducción de los protones del medio extracelular derivados de la OXPHOS se analizó la fracción de protones glucolíticos liberados al

RESULTADOS

medio. Los resultados mostraron un aumento del porcentaje de protones glucolíticos (Figura 19C), lo que se puede explicar como un intento de mantener los niveles de poder reductor tras la caída de la OCR.

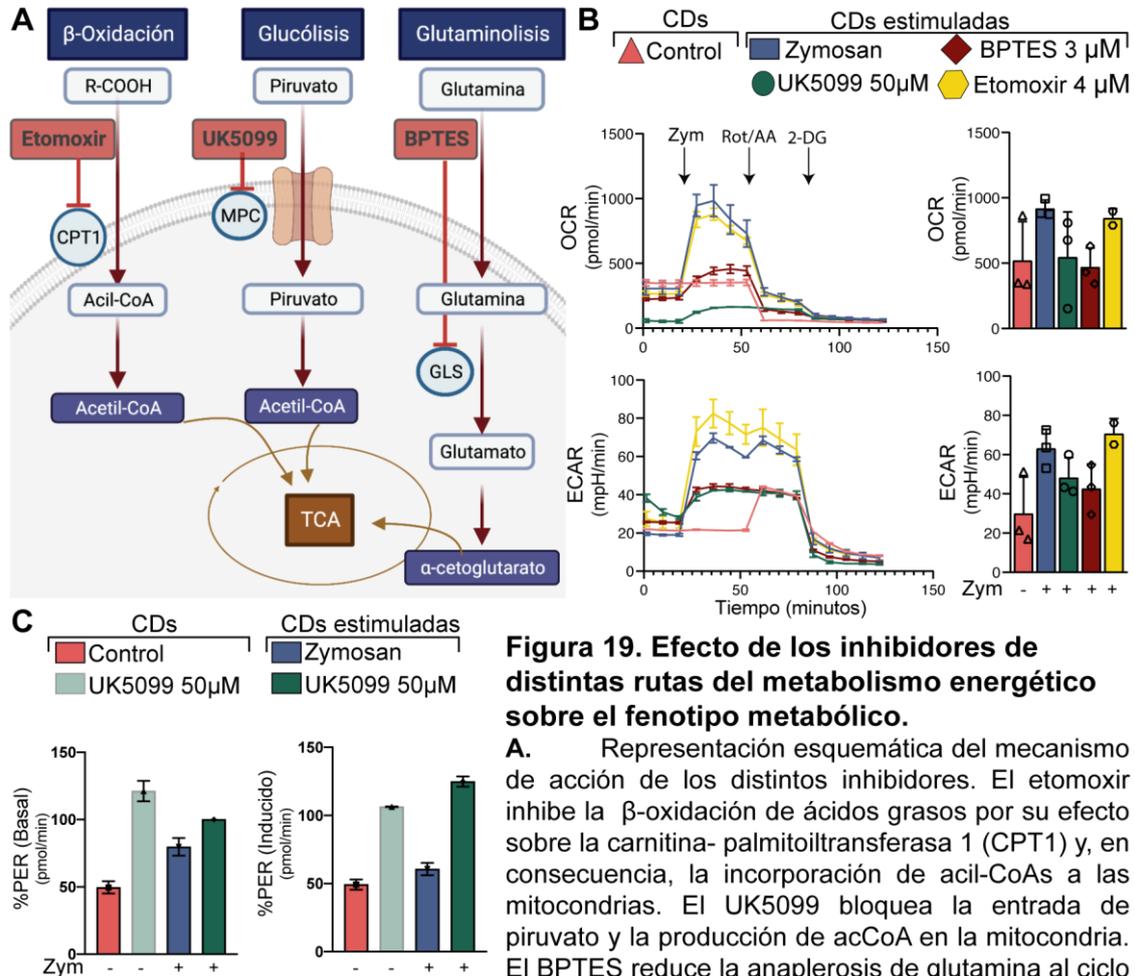


Figura 19. Efecto de los inhibidores de distintas rutas del metabolismo energético sobre el fenotipo metabólico.

A. Representación esquemática del mecanismo de acción de los distintos inhibidores. El etomoxir inhibe la β -oxidación de ácidos grasos por su efecto sobre la carnitina- palmitoiltransferasa 1 (CPT1) y, en consecuencia, la incorporación de acil-CoAs a las mitocondrias. El UK5099 bloquea la entrada de piruvato y la producción de acCoA en la mitocondria. El BPTES reduce la anaplerosis de glutamina al ciclo de los TCA por inhibir la glutaminasa (GLS).

B. Efecto de la inhibición de las distintas fuentes de energía sobre OCR y ECAR tras la estimulación con zymosan. Las CDs se preincubaron durante 30 minutos con los distintos inhibidores a las concentraciones indicadas y se transfirieron a placas de cultivo Seahorse para el estudio en tiempo real. Posteriormente, se adicionaron 0,4 mg/ml de zymosan, la mezcla Rot/AA 0,5 μ M y 2-DG 50 mM. Se muestran los resultados obtenidos usando el protocolo Seahorse XF glycolityc rate induced assay.

C. Efecto de la inhibición de la entrada de piruvato en la mitocondria sobre la glucólisis basal y la inducida. El diseño experimental se corresponde con lo mostrado en (B). Los resultados se obtuvieron de acuerdo con el protocolo Seahorse XF glycolityc rate induced assay.

La inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos con etomoxir no indujo efecto alguno cuando el medio contenía glucosa y L-glutamina (Figura 19B). Sin embargo, en ausencia de glucosa y L-glutamina disminuyeron la OCR y la ECAR, tanto en células en reposo como tras la estimulación (Figura 20).

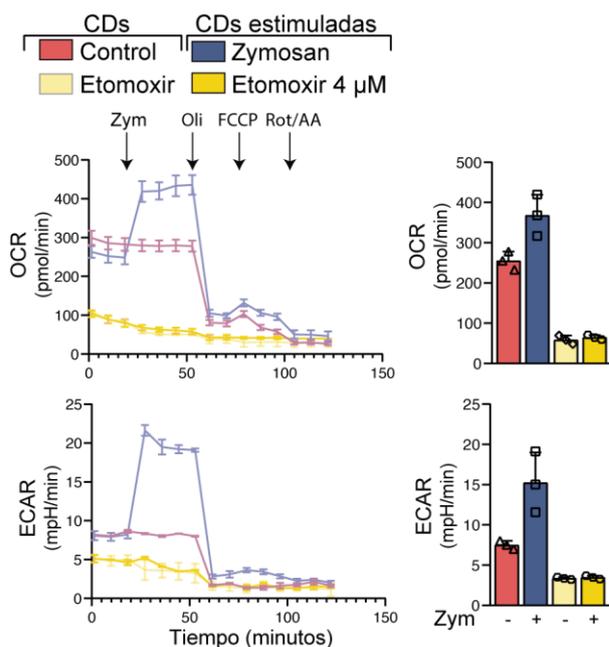


Figura 20. Efecto de la inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos en ausencia de otras fuentes de energía sobre el fenotipo metabólico.

Las CDs se preincubaron con etomoxir durante 30 minutos a la concentración indicada y se transfirieron a placas de cultivo Seahorse para el análisis en tiempo real. Posteriormente, se adicionaron 0,4 mg/ml de zymosan, oligomicina (Oli) 1 μ M, FCCP 2 μ M y la mezcla Rot/AA 0,5 μ M.

Estos resultados indican que la reprogramación metabólica producida por el zymosan afecta a la utilización de glucosa y L-glutamina, mientras que el recurso a la utilización de ácidos grasos solo se produce en ausencia de otros sustratos.

1.3. EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN SOBRE LA LIBERACIÓN DE ROS

La activación de las CDs por TLR2 y dectin-1 se asocia con la producción de ROS, lo que permite la destrucción de los microorganismos fagocitados y el procesamiento de los antígenos para su presentación y el inicio de la respuesta inmune adaptativa (132). En concordancia con este criterio, la estimulación con zymosan produjo un aumento dosis-dependiente de la producción de ROS citosólicos por las NADPH oxidasas, a juzgar por el aumento de la fluorescencia derivada del DCF (Figura 21A). La liberación de ROS citosólicos alcanzó su máximo a los 30 minutos y disminuyó rápidamente hasta alcanzar los niveles de reposo, mientras que los ROS mitocondriales medidos con mitoSOX™ fueron más elevados tras cuatro horas de estimulación y no descendieron hasta transcurridas 48 horas (Figura 21B). La liberación de ROS citosólicos a los 30 minutos concuerda con los resultados obtenidos en el Seahorse, puesto que en este sistema se puede discriminar el consumo de oxígeno no mitocondrial (Figura 18B). Este efecto depende principalmente de la actividad de la NADPH oxidasa 2, más que de la NADPH oxidasa 5, a pesar de la relevancia atribuida a ésta en CDs (133), puesto que los niveles del mRNA de la *NADPH oxidasa 2* fueron mucho más elevados que los de la *NADPH oxidasa 5* (Figura 21C).

RESULTADOS

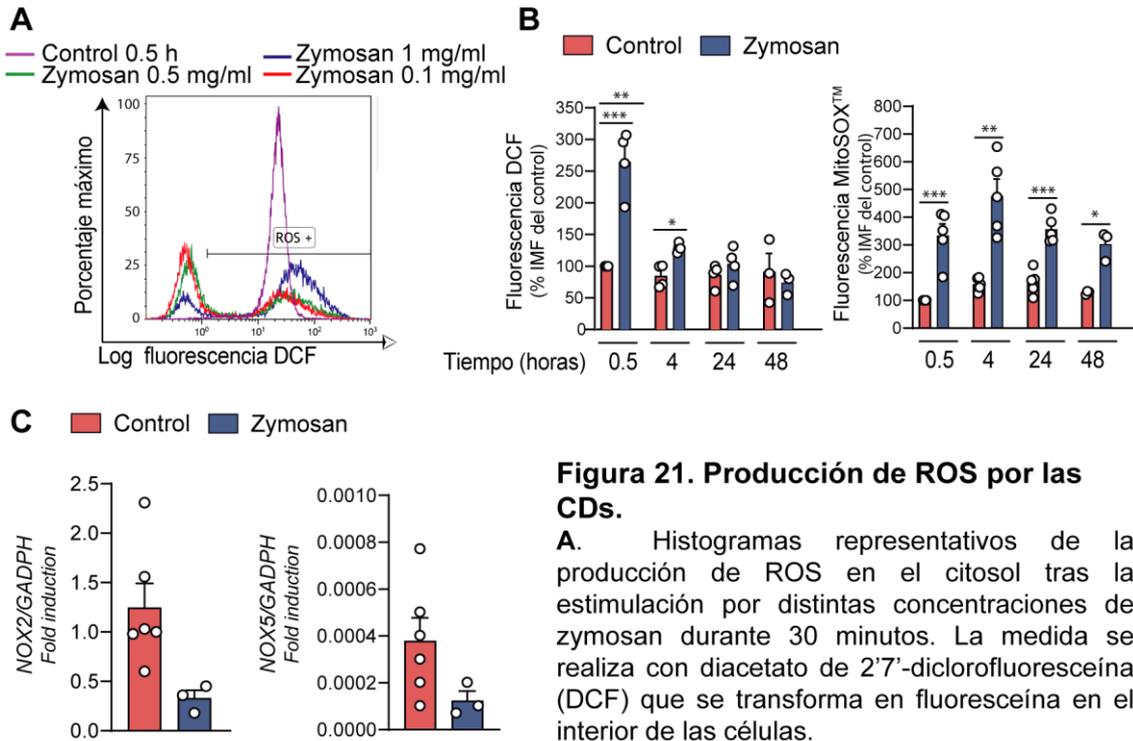


Figura 21. Producción de ROS por las CDs.

A. Histogramas representativos de la producción de ROS en el citosol tras la estimulación por distintas concentraciones de zymosan durante 30 minutos. La medida se realiza con diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) que se transforma en fluoresceína en el interior de las células.

B. Cinética de producción de ROS por la estimulación con zymosan 1 mg/ml. Las CDs se marcaron con DCF y MitoSOX™ para el estudio de la producción de ROS derivados de las NADPH oxidasas y de la actividad mitocondrial, respectivamente. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Datos pareados, Student's t-test de dos colas.

C. Expresión del mRNA que codifica *NADPH oxidasa 2 y 5 (NOX2)* y (*NOX5*) en CDs en reposo y tras la estimulación con zymosan durante 4 horas. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$. Datos pareados, Student's t-test de dos colas.

Tomados en conjunto, estos datos indican que el zymosan produce una reprogramación metabólica que incluye el aumento de la glucólisis y la OXPHOS, asociados con la utilización de glucosa y L-glutamina, e independiente de la β -oxidación de ácidos grasos. El fenotipo metabólico incluye un cambio en la concentración de los intermediarios del ciclo de los TCA, caracterizado por el elevado consumo de los intermediarios iniciales del ciclo, mientras que los metabolitos finales se mantienen o incluso se incrementan. Estos resultados muestran la asociación del fenotipo metabólico con el patrón de expresión de citoquinas inducido por los patrones fúngicos (Figura 17A).

2. IMPORTANCIA DE LA LANZADERA MALATO-ASPARTATO EN LA RESPUESTA INMUNE

2.1. EFECTO DE LA LANZADERA MALATO-ASPARTATO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

La actividad mitocondrial se mantiene en parte por la lanzadera malato-aspartato. El malato se intercambia por aspartato y aporta poder reductor a la matriz mitocondrial.

Asimismo, la lanzadera mantiene la glucólisis aportando NAD^+ al citosol. Una representación esquemática del mecanismo de acción de la lanzadera se muestra en la Figura 22A.

Estudios recientes han demostrado que cambios metabólicos en la lanzadera malato-aspartato provocan modificaciones epigenéticas determinantes para el balance de los linfocitos Th17 y Treg, lo que puede contribuir, en algunos casos al desarrollo de autoinmunidad (122).

Dada la dependencia de la expresión de citoquinas de la actividad de la ETC (Figura 18C), se estudió el efecto de la lanzadera mitocondrial malato-aspartato. La aspartato-aminotransferasa se inhibió utilizando AOA y se fomentó su actividad añadiendo el sustrato de la enzima, aspartato. El AOA redujo la expresión del mRNA de los genes que codifican las citoquinas *IL23A* e *IL10*, sin modificar la expresión de *TNF* e *IL1B*. Contrariamente, la adición de aspartato aumentó la expresión de las citoquinas y revirtió el efecto del AOA (Figura 22B).

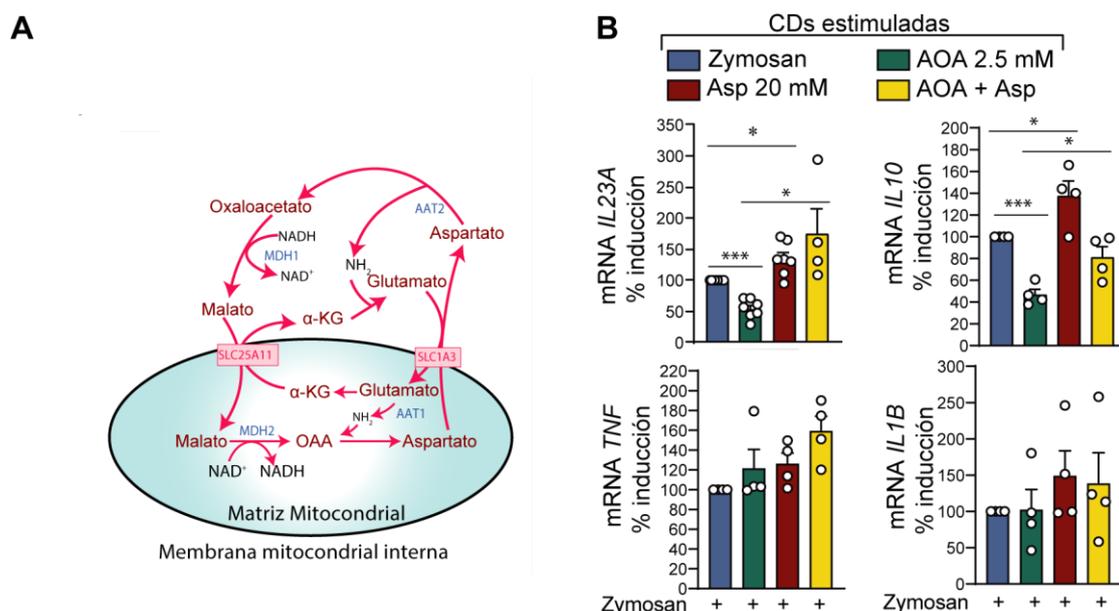


Figura 22. La lanzadera malato-aspartato y la expresión de citoquinas inducida por el zymosan.

A. Esquema del mecanismo de aporte de NADH al interior de la mitocondria. Las líneas rojas representan los componentes de la lanzadera. SLC25A11, intercambiador malato/ α -KG. SLC1A3, transportador glutamato/aspartato. MDH, malato deshidrogenasa. AAT, aspartato aminotransferasa.

B. Efecto de la adición de aspartato exógeno sobre la expresión del mRNA que codifica las citoquinas y reversión del efecto inhibitorio de la enzima aspartato aminotransferasa por el ácido aminooxiacético (AOA). Aspartato y AOA se añadieron una hora antes de la estimulación con 1 mg/ml de zymosan. Tras un periodo de incubación de 4 horas, se procedió a la extracción del RNA y a la cuantificación del mRNA de las citoquinas. Los datos se muestran como porcentaje de la respuesta observada y se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Student's t-test de dos colas.

RESULTADOS

2.2. EFECTO DE LA LANZADERA MALATO-ASPARTATO SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO

Mediante la tecnología Seahorse se observó que el AOA disminuyó la OCR y la ECAR inducidos por el zymosan. La adición de aspartato no mostró ningún efecto sobre la OCR y la ECAR, mientras que cuando se administró tras el AOA, contrarrestó el efecto inhibitorio del AOA sobre la ECAR (Figura 23A).

Experimentos en los que el registro de los parámetros energéticos se mantuvo durante seis horas mostraron resultados similares. Además, la adición de aspartato exógeno contrarrestó el efecto inhibitorio del AOA sobre la OCR (Figura 23B).

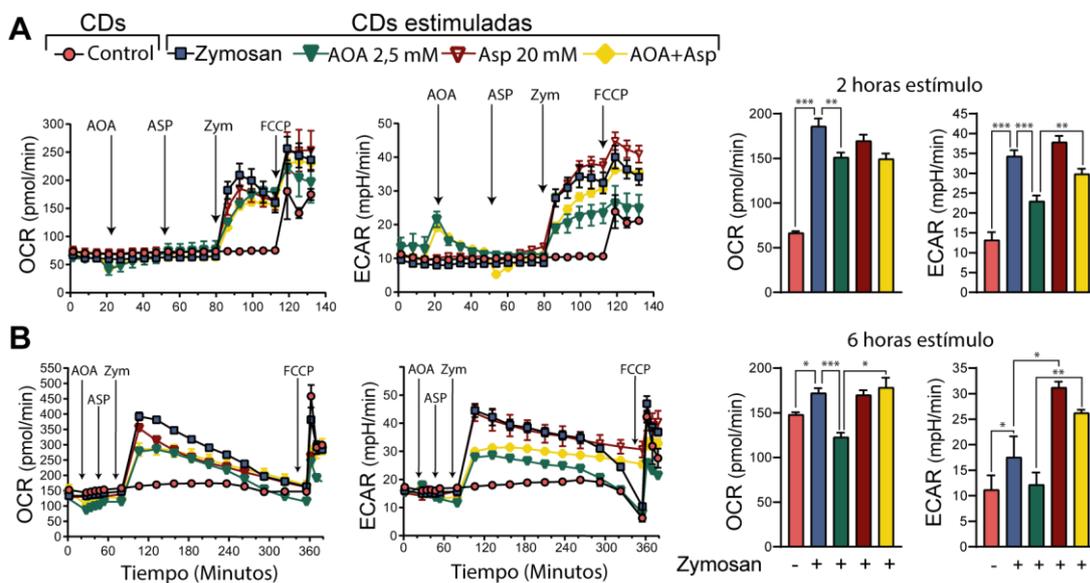


Figura 23. Efectos de la inhibición con AOA de la lanzadera malato-aspartato y del aspartato exógeno sobre el metabolismo energético.

Las CDs se trataron con AOA, aspartato y 0,4 mg/ml de zymosan a los tiempos indicados. Las gráficas mostradas en el panel derecho de (A) se han construido a partir de los registros con intervalos de tiempo entre 80 y 140 minutos mostrados en los paneles izquierdos. Las gráficas mostradas en el panel derecho de (B) se construyeron a partir de los registros obtenidos entre 80 y 360 minutos (panel izquierdo de B). Los datos representan la media \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. Student's t-test de dos colas.

Dado que una parte del efecto sobre la OCR producido por el AOA puede deberse a la disminución del aporte de poder reductor a la ETC, se estudió la caída de la producción de ATP en tiempo real utilizando un procedimiento que permite discriminar el ATP producido en la mitocondria del derivado de la glucólisis mediante la adición en serie de oligomicina y la mezcla Rot/AA. La estimulación con zymosan durante 30 minutos aumentó el ATP mitocondrial y el ATP glucolítico. La inhibición de la lanzadera con AOA disminuyó el ATP producido en ambas rutas, mientras que la suplementación con aspartato revirtió el efecto inhibitorio del AOA sobre la producción de ATP glucolítico (Figura 24A).

La lanzadera malato-aspartato contribuye a mantener la glucólisis mediante el aporte de NAD⁺, por lo que se estudió el papel del AOA y del aspartato en el mantenimiento de la glucólisis midiendo el flujo de protones glucolíticos mediante la adición en serie de la mezcla Rot/AA y de 2-DG. Como se muestra en la **Figura 24B**, la adición de AOA disminuyó el flujo de protones glucolíticos tanto en condiciones basales como durante la estimulación, mientras que la suplementación con aspartato revirtió el efecto inhibitorio del AOA.

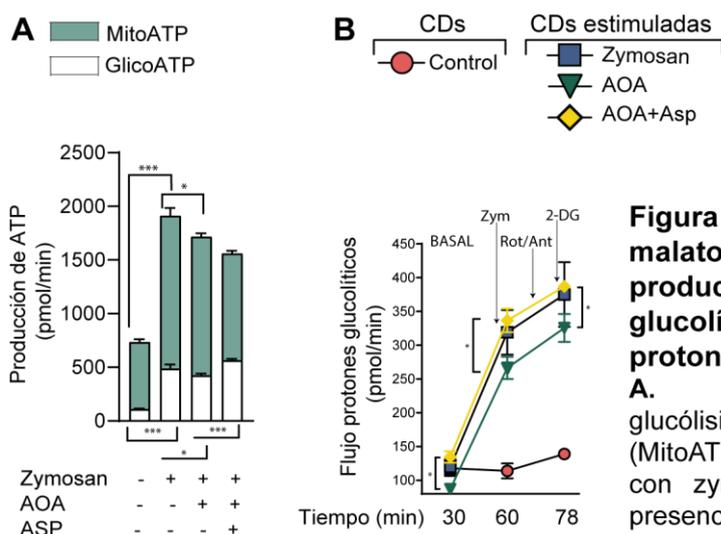


Figura 24. Efecto de la lanzadera malato-aspartato sobre la producción de ATP mitocondrial y glucolítico y sobre el flujo de protones al medio extracelular.

A. Razón de producción de ATP en la glucólisis (GlycoATP) y la OXPHOS (MitoATP) en CDs control y estimuladas con zymosan durante 30 minutos en presencia de AOA 2,5 mM y aspartato 20 mM. Los datos representan la media \pm SEM * p <0.05, *** p <0.005. Student's t-test de dos colas.

B. Efectos del AOA y el aspartato sobre el glycoPER (flujo de protones de la glucólisis liberados al medio extracelular) en condiciones basales y en presencia de zymosan.

Estos resultados muestran que la expresión de las citoquinas *IL23A* e *IL10* inducida por el zymosan depende de la compartimentalización del sistema redox NAD(H) y de su regulación por la lanzadera malato-aspartato.

3. TRANSPORTE DE PIRUVATO A LA MITOCONDRIA

3.1. EFECTO DEL PIRUVATO MITOCONDRIAL SOBRE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA

La activación de las células de la línea monocito-macrofágica con estímulos como LPS, interferones de tipo I y el ligando de TLR3 poly(I:C) produce un cambio del fenotipo metabólico en el que destaca el aumento de la glucólisis sin que se incremente de forma paralela la OXPHOS, lo que remeda el efecto Warburg observado en células tumorales (110,134). Sin embargo, la estimulación con zymosan aumenta concomitantemente la glucólisis y la OXPHOS, lo que concuerda con estudios recientes que muestran la importancia del flujo de piruvato a la mitocondria en el mantenimiento de la activación

RESULTADOS

de los macrófagos (73). Por este motivo, la producción de una cierta cantidad de ATP mitocondrial generado por la oxidación del piruvato sería un requisito indispensable para la producción de citoquinas.

Puesto que el piruvato es el último producto de la glucólisis y alimenta el ciclo de los TCA, se inhibió su transporte a la mitocondria mediante la incubación durante 30 min con UK5099. La inhibición produjo el aumento de los niveles de lactato en las células estimuladas, sin que se produjeran cambios significativos de los niveles de acCoA, aunque se redujeron los niveles de citrato y piruvato. En los pasos siguientes del ciclo de los TCA, sólo se observaron cambios significativos del succinato y el fumarato (Figura 25A). El UK5099 aumentó la expresión de la subunidad A de la SDH, lo que se interpreta como un mecanismo compensatorio dirigido a mantener la continuidad del ciclo de los TCA al favorecer el paso de succinato a fumarato (Figura 25B).

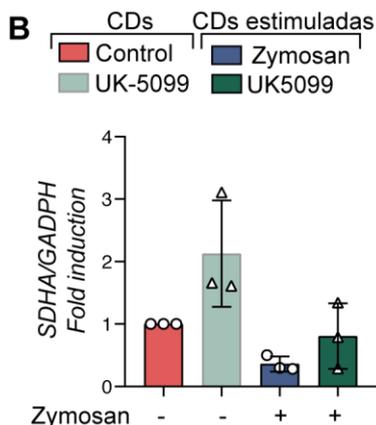
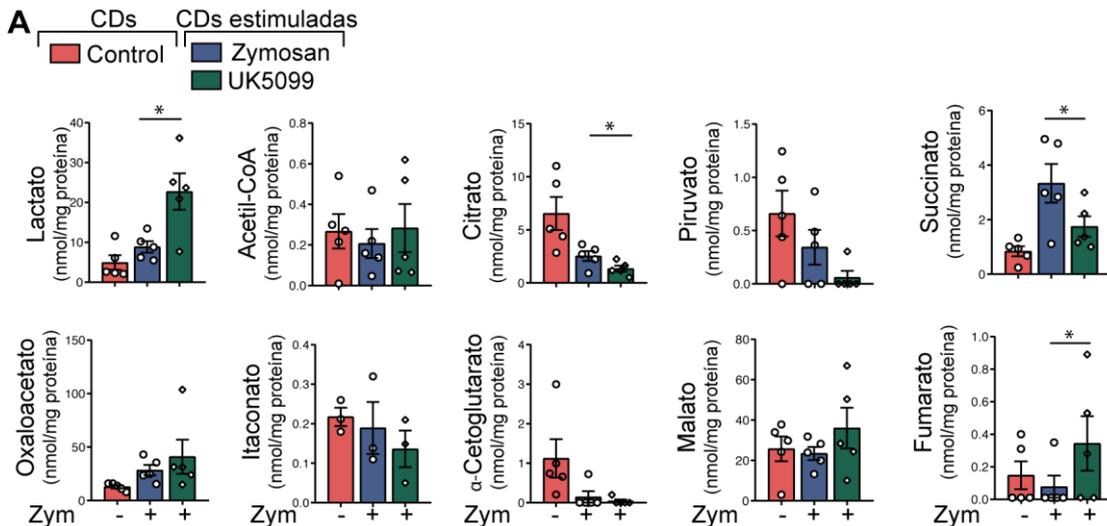


Figura 25. Efecto de la inhibición del transporte de piruvato a la mitocondria sobre los niveles intracelulares de intermediarios metabólicos.

A. Las CDs se trataron con UK5099 50 μ M durante 30 minutos y se estimularon con zymosan durante 30 minutos. Al final de este periodo se recogieron los lisados celulares para la medida de los distintos intermediarios por UPLC/MS. Los resultados representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$. Datos pareados y no pareados, Student's t-test de dos colas.

B. Expresión del mRNA de la subunidad A de la SDH en CDs en ausencia y presencia de zymosan. El mRNA se extrajo tras cuatro horas de estimulación para el análisis del mRNA que codifica la SDH A.

3.2. EFECTO DEL PIRUVATO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Puesto que los niveles intracelulares de citrato se mantienen por la entrada de piruvato y su procesamiento hasta acCoA por el PDC, se estudió la función del PDC. La actividad del PDC se regula negativamente por fosforilaciones dependientes de la piruvato deshidrogenasa kinasa I en la serina-293 de la subunidad E1- α del PDC. La estimulación con zymosan y la inhibición de la piruvato deshidrogenasa kinasa 1 con dicloroacetato disminuyeron esta fosforilación, lo que favorece la oxidación de piruvato hasta acCoA. Por el contrario, el citrato aumentó la fosforilación de la subunidad E1- α , lo que concuerda con su capacidad para inhibir la actividad del PDC (135) (Figura 26A). El dicloroacetato aumentó la expresión del mRNA de las citoquinas *IL23A* e *IL10* siendo el efecto más acusado a concentraciones más bajas (Figura 26B), lo que indica que la activación del PDC es necesaria para la expresión de las citoquinas IL-23 y la IL-10.

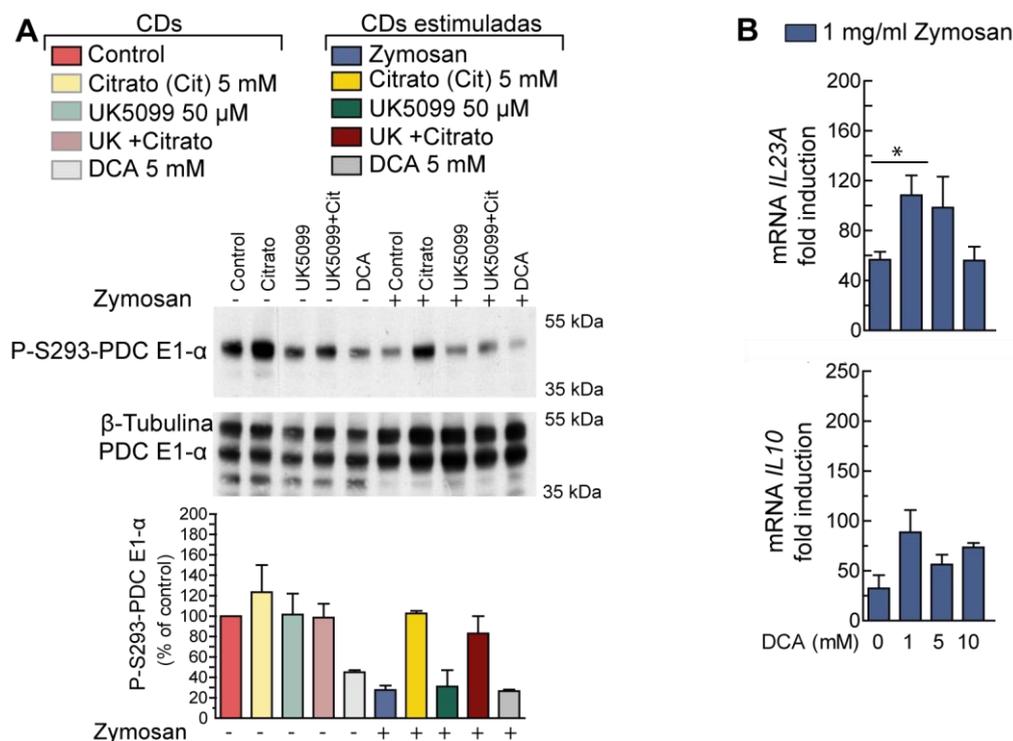


Figura 26. Papel del PDC sobre la expresión de citoquinas.

A. Fosforilación de la serina-293 (S293) de la subunidad E1- α del PDC en CD tratadas con citrato 5 mM, UK5099 50 μ M y 5 mM dicloroacetato (DCA) durante una hora y estimuladas con zymosan durante 30 minutos. La membrana se incubó con anticuerpo anti-P-S293-PDC E1- α y se sometió a stripping y reblotting con anticuerpos anti-PDC E1- α y anti- β -tubulina. Los análisis densiométricos representan dos experimentos independientes.

B. Efecto de la inhibición de la piruvato deshidrogenasa kinasa I con dicloroacetato (DCA) sobre la expresión de citoquinas. * $p < 0.05$, Student's t-test de dos colas.

Para determinar si la disminución del flujo de piruvato a la mitocondria mimetiza el efecto de la inhibición de la actividad del PDC sobre la expresión de citoquinas, las CD se incubaron con UK5099 durante 30 minutos y se estimularon con zymosan durante 4

RESULTADOS

horas. La inhibición produjo una disminución de la expresión del mRNA de las citoquinas *IL23A*, *IL10*, *IL1B* y *TNF*, mientras que la suplementación con acetato, que permite a la formación de acCoA nucleocitosólico por la actividad de la ACSS2, aumentó de manera significativa el mRNA de la *IL23* e *IL10* y revirtió el efecto del UK5099 (Figura 27).

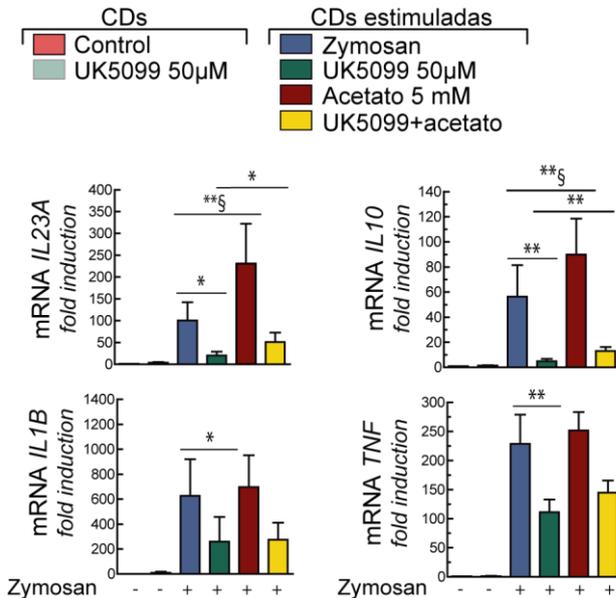


Figura 27. Efecto de la inhibición del transportador MPC y de la suplementación de acetato sobre la expresión del mRNA de distintas citoquinas.

Las CDs se preincubaron con las adiciones indicadas durante una hora, previamente a la estimulación con 1 mg/ml de zymosan. Tras 4 horas de incubación, se extrajo el RNA para el análisis del mRNA que codifica las citoquinas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Student's t-test de dos colas. §, Wilcoxon signed-rank test.

Estos datos muestran que el transporte de piruvato y su procesamiento a acCoA son indispensables para la expresión de IL-23 e IL-10. La actividad de la ACSS2 y el acetato citosólico constituyen un mecanismo alternativo de producción de acCoA.

3.3. ACCOA EN EL COMPARTIMENTO NUCLEOCITOSÓLICO Y ACETILACIÓN DE HISTONAS

La dependencia de la expresión de citoquinas de la entrada de piruvato en la mitocondria y de la actividad del PDC puede deberse a dos mecanismos: i) La generación de esqueletos de carbono para la formación de citrato, que sale de la mitocondria a través del SLC25A1 y genera acCoA a través de la ACLY, y ii) el aporte de NADH al complejo I de la ETC. Puesto que el acCoA es el sustrato para las reacciones de acetilación de histonas, se estudió la acetilación de los sitios kB del promotor proximal del gen *IL23A* y del sitio CRE del promotor de la *IL10* mediante la inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpo anti-acetil-lisina-9-histona-3. La elección de la acetilación de la lisina 9 se justifica porque esta modificación está implicada en el control de la expresión de genes glucolíticos, entre los que incluye HIF1 α (93). Las CDs se incubaron en presencia de UK5099 y acetato durante media hora y se estimularon con zymosan durante cuatro horas. El zymosan incrementó significativamente la unión del anticuerpo anti-acetil-lisina-9-histona-3 en los promotores de los genes *IL23A* e *IL10*, mientras que el UK5099

redujo la unión del anticuerpo. La incubación con acetato indujo un ligero aumento de la acetilación en el promotor de *IL23A* y no produjo cambios significativos en el promotor de *IL10* (Figura 28A, Panel izquierdo). El dicloroacetato aumentó la acetilación de las histonas (Figura 28A, panel derecho). Estos resultados permiten asociar el flujo de piruvato a la mitocondria y la formación de acCoA nucleocitosólico con la transcripción de las citoquinas *IL23A* e *IL10*.

Con el propósito de determinar si la acetilación de histonas tenía un carácter global, se estudiaron lisados celulares (Figura 28B). Asimismo, se estudió la fosforilación en la serina 10 de la histona 3, modificación que suele preceder y facilitar la acetilación. Esta acetilación se observó en condiciones basales y aumentó ligeramente cuando las células se estimularon con zymosan, pero no se apreciaron cambios tras la adición de UK5099 o acetato. Dado que los cambios observados son más notables a nivel de los promotores, los resultados sugieren que las acetilaciones no se deben a un proceso que afecte globalmente a las histonas, sino que ocurre de forma selectiva en los promotores de algunas citoquinas.

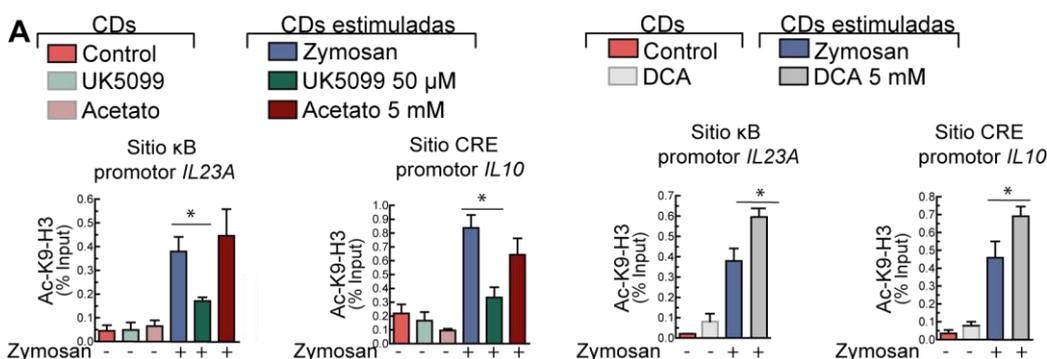
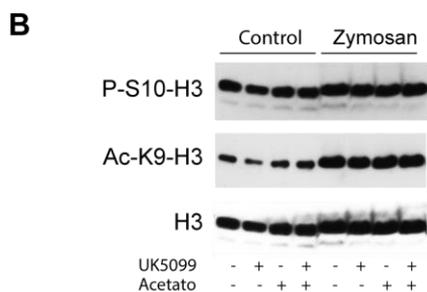


Figura 28. Efecto de la estimulación y de compuestos activos sobre el metabolismo energético en la acetilación de la lisina 9 de la histona 3.



A. Efecto de la inhibición del UK5099, de la suplementación con acetato y del dicloroacetato (DCA) sobre la acetilación de la lisina 9 (K9) de la histona 3 (H3) en los promotores de la *IL23A* e *IL10*.

B. Efecto del UK5099 y del acetato exógeno sobre la acetilación global de la lisina 9 (K9) de la histona 3 (H3) en lisados celulares y sobre la fosforilación de la serina 10 (S10) de la histona 3 (H3). Los datos se presentan como la media ± SEM (n=3). *p<0.05. Student's t-test de dos colas.

4. CITRATO, ACLY Y EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

4.1. EFECTO DE LA ADICIÓN DE CITRATO SOBRE EL FENOTIPO METABÓLICO

El zymosan produce una caída en los niveles de citrato, lo que sugiere un elevado consumo, por lo que se dirigieron los experimentos a estudiar la implicación de la ACLY, que transforma el citrato nucleocitosólico en acCoA y OAA. El inhibidor de la actividad de la ACLY, BMS-303141 no mostró efecto sobre la expresión de citoquinas, lo que puede explicarse por la depleción de los niveles de citrato inducida por el zymosan (136). Este resultado sugirió la necesidad de analizar el efecto de la repleción del citrato con suplementos de citrato.

La entrada de citrato al interior celular se realiza a través de los transportadores de membrana di y tri-carboxílicos SLC13A2, SLC13A3 y SLC13A5, por lo que se analizó la expresión de su mRNA utilizando como control positivo la línea celular hepática HEPG2. Como se muestra en la **Figura 29A**, no se observó expresión del mRNA de los transportadores en CDs y sí en células HEPG2. Sin embargo, los estudios de inmunodetección mostraron la presencia de la proteína (**Figura 29B**).

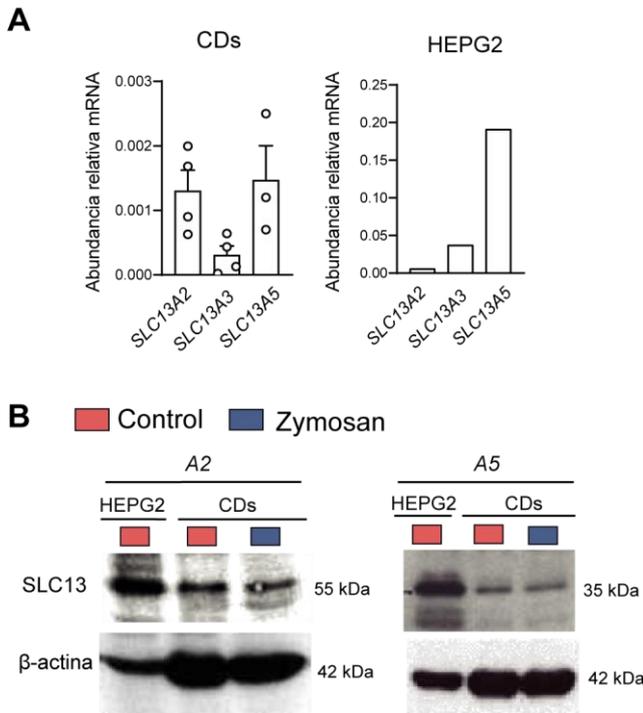


Figura 29. Expresión de los transportadores de citrato.

A. Expresión del mRNA de los transportadores SLC13A2, SLC13A3 y SLC13A5 en CDs (Panel izquierdo) y en la línea celular hepática, HEPG2 (Panel derecho).

B. Expresión de las proteínas SLC13A2 y SLC13A5 en la línea HEPG2 y CDs en reposo y estimuladas con zymosan durante 4 horas.

Como se muestra en la **Figura 30**, el citrato exógeno aumentó significativamente los niveles intracelulares de citrato y piruvato en las células en reposo y tras la estimulación con zymosan, mientras que el itaconato solo aumentó en las células estimuladas. El BMS-303141 no modificó los niveles de los metabolitos. Los niveles de acCoA y OAA no mostraron cambios significativos ni con la adición de citrato exógeno ni tras la

inhibición de la ACLY, lo que posiblemente se explica por el rápido recambio de estos metabolitos.

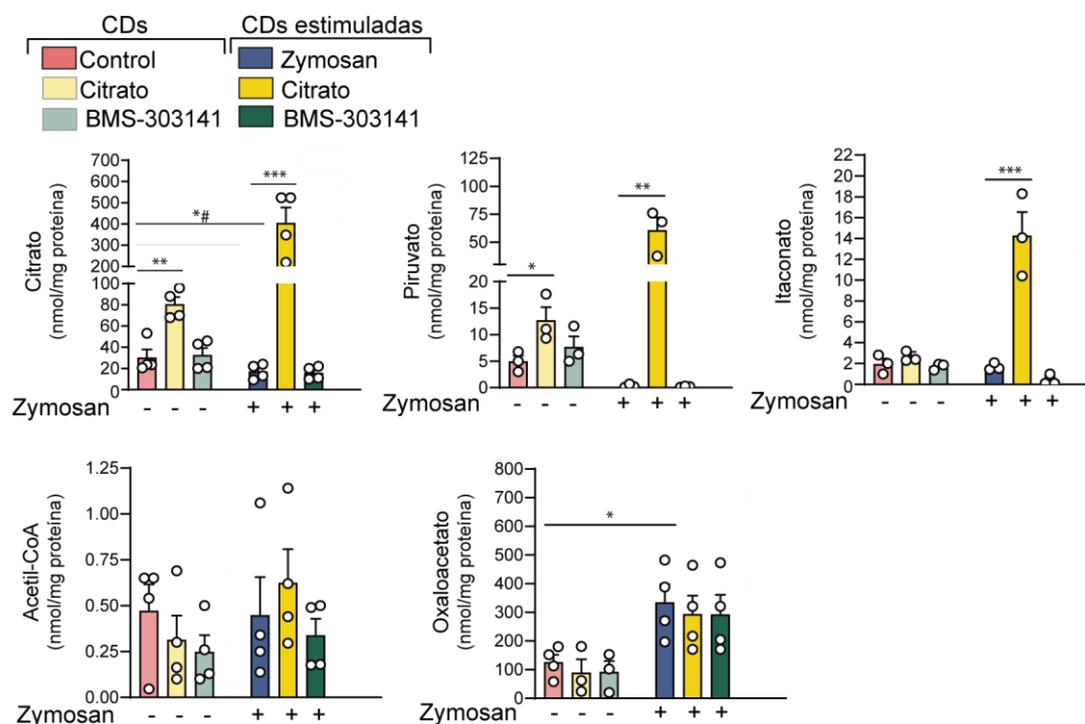


Figura 30. Medida de los intermediarios del ciclo de los TCA en CDs estimuladas con zymosan en presencia de citrato exógeno y BMS-303141.

Las CDs se incubaron en presencia y ausencia de citrato y BMS-303141 durante una hora, previamente a la estimulación con 1 mg/ml de zymosan. Tras 30 minutos de estimulación, las CDs se lavaron para retirar el citrato no incorporado y se extrajeron los metabolitos intracelulares para su medida por UPLC/MS. Los datos se representan como la media \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$. Datos pareados, Student's t-test de dos colas. , #, Ratio pareado t-test.

Tomados en conjunto, estos resultados podrían explicarse por el efecto inhibitorio del citrato sobre el PDC (135) y la conversión de OAA en malato y piruvato por la malato deshidrogenasa citosólica y la enzima málica. El aumento de itaconato tras la estimulación con zymosan concuerda con estudios recientes que asocian su aumento con la inducción de la enzima *cis*-aconitato descarboxilasa (137), que cataliza la descarboxilación de *cis*-aconitato para formar itaconato.

4.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE CITRATO SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Para determinar si los niveles de citrato influyen en la expresión de citoquinas, se analizaron sus mRNAs. La suplementación con citrato aumentó significativamente el mRNA de *IL23A*, *IL1B* e *IL10* y tendió a aumentar el mRNA de *TNF*. Como se ha mencionado anteriormente, la inhibición de la ACLY no mostró efecto sobre la expresión de las citoquinas probablemente debido a la falta de sustrato. La suplementación de

RESULTADOS

citrato exógeno seguida de la inhibición de la ACLY disminuyó significativamente la expresión de los mRNAs de *IL23A*, *IL10* e *IL1B* y mostró una tendencia a disminuir la expresión de *TNF* (Figura 31A).

Ni la adición de citrato ni la inhibición de la ACLY modificaron la acetilación global de la lisina-14 de la histona 3 tras una hora de estimulación, mientras que a las cuatro horas se observó un aumento de la acetilación en CDs estimuladas con zymosan. Este efecto fue parcialmente sensible a la suplementación con citrato, mientras que la inhibición de la ACLY no mostró efectos significativos (Figura 31B).

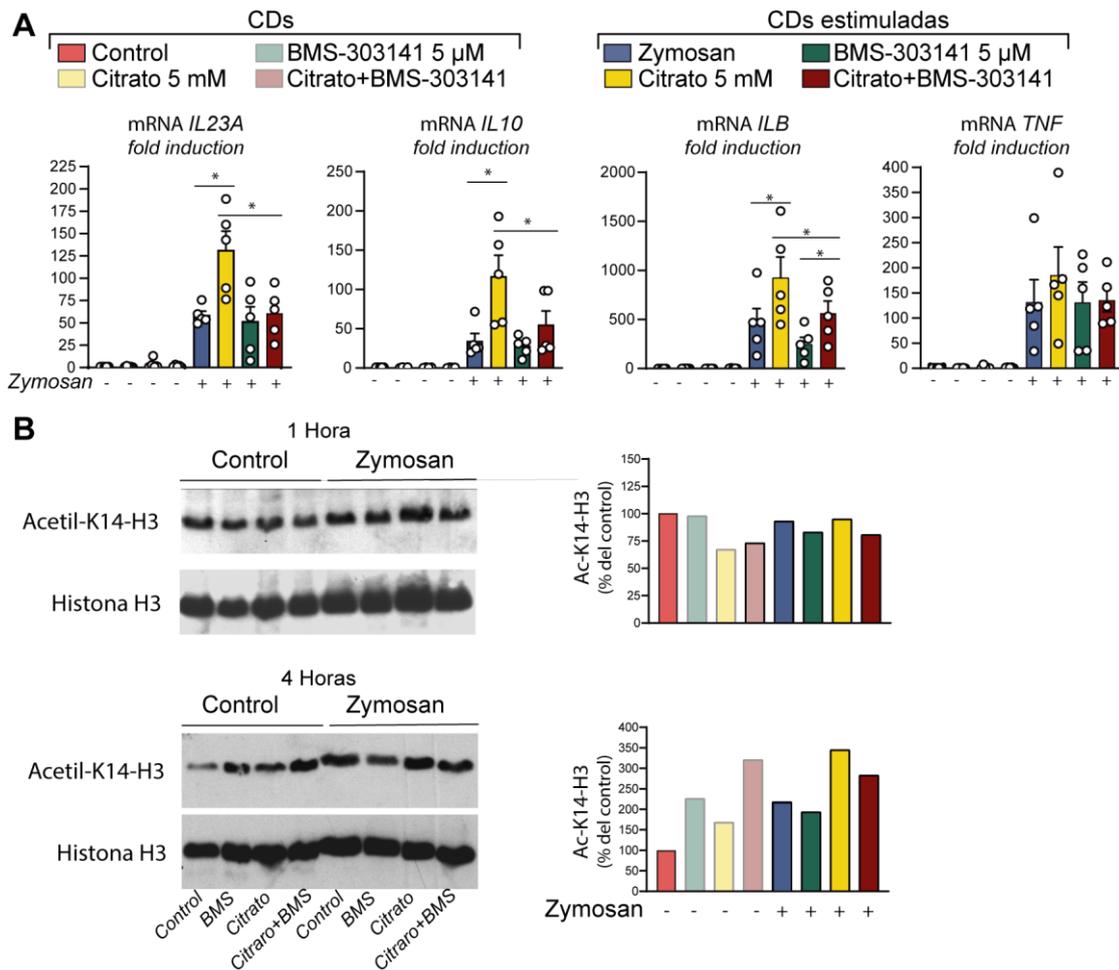


Figura 31. Efecto del citrato exógeno y del BMS-303141 sobre la expresión del mRNA de las citoquinas y en la acetilación global de histonas

A. Las CDs se incubaron en presencia y ausencia de citrato y BMS-303141 durante una hora antes de la estimulación con 1 mg/ml de zymosan. Tras 4 horas de estimulación se procedió a la extracción de RNA y a la cuantificación del mRNA de las citoquinas mediante qPCR. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$. Datos pareados, Student's t-test de dos colas.

B. Efecto del citrato y BMS-303141 sobre la acetilación de la lisina 14 (K14) de la histona 3 (H3). Las CDs se incubaron en presencia y ausencia de citrato y BMS-303141 durante una hora previa a la estimulación con 1mg/ml de zymosan durante los tiempos indicados.

Estos resultados muestran que una parte del efecto del citrato sobre la expresión de citoquinas se ejerce a nivel de la ACLY y depende de su contribución a la formación de acCoA en el compartimento nucleocitosólico y de los productos derivados del OAA. El itaconato puede modular la producción de acCoA y la actividad del ciclo de los TCA atrapando coenzima A para la producción de itaconil-CoA (138). Asimismo, el citrato puede influir en este proceso por interferir en los procesos metabólicos mediante inhibición por producto y mecanismos alostéricos sobre enzimas como el PDC y la fosfofructoquinasa (139).

5. SUCCINATO

El succinato se ha asociado recientemente con la respuesta inmune tras describirse su capacidad para estabilizar HIF1 α en macrófagos activados con LPS (80).

5.1. EFECTO DEL SUCCINATO EXÓGENO

El succinato extracelular señala a través del receptor SUCN1/GPR91. Este se identificó inicialmente en el riñón, pero estudios recientes han destacado su presencia en células dendríticas y su participación en la respuesta inmune (140). Como se muestra en la **Figura 32A**, aproximadamente, el 10% de las CDs mostraron expresión de SUCNR1 por citometría de flujo. Estos resultados se confirmaron por microscopía confocal, puesto que solo una fracción de las CDs mostró tinción positiva (**Figura 32B**). El tratamiento con zymosan durante cuatro horas produjo una caída de la expresión del mRNA del receptor *SUCNR1* (**Figura 32C**). Curiosamente, la adición de succinato exógeno no modificó la expresión del mRNA que codifica los genes *IL23A* e *IL10* (**Figura 32D**).

RESULTADOS

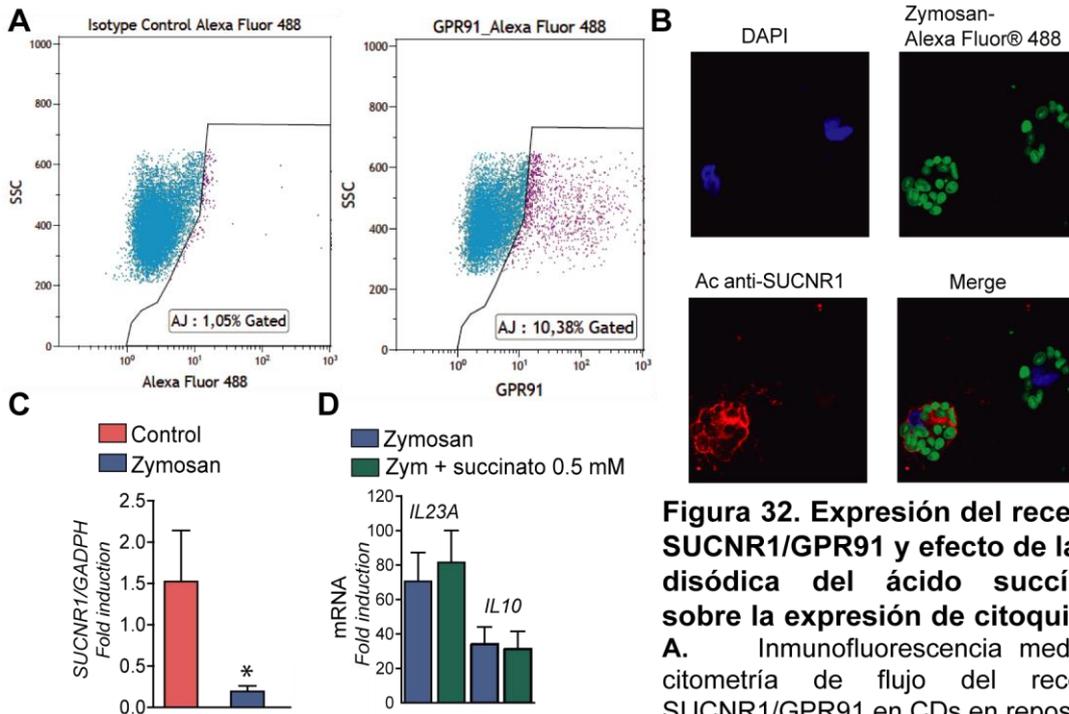


Figura 32. Expresión del receptor SUCNR1/GPR91 y efecto de la sal disódica del ácido succínico sobre la expresión de citoquinas. A. Inmunofluorescencia mediante citometría de flujo del receptor SUCNR1/GPR91 en CD's en reposo.

B. Imagen de microscopía de fluorescencia confocal del receptor SUCNR1 en CD's estimuladas con 1 mg/ml de zymosan durante 30 minutos

C. Expresión del mRNA que codifica al receptor *SUCNR1* en CD's estimuladas con zymosan durante 4 horas. Los resultados representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$. Student's t-test de dos colas.

D. Las CD's se preincubaron con sal disódica del ácido succínico (Succinato) 0.5 mM durante 30 minutos y se estimularon con zymosan durante 4 horas. Al finalizar este periodo se extrajo el RNA para la medida del mRNA que codifica las citoquinas *IL23A* e *IL10*. Los resultados representan la media \pm SEM.

5.2. EFECTO DEL SUCCINATO INTRACELULAR

Puesto que el zymosan aumenta los niveles intracelulares de succinato y que la suplementación del medio con succinato no muestra efectos significativos sobre la expresión de citoquinas, se postuló que su efecto podría explicarse a través de sensores intracelulares. Para confirmar esa hipótesis se utilizó dimetilsuccinato, un compuesto permeable a la membrana celular. La adición de dimetilsuccinato incrementó los niveles intracelulares de citrato, succinato, malato y OAA en las CD's en reposo, mientras que el acCoA y el lactato no sufrieron cambios (Figura 33A). Estos resultados indican que el succinato mantiene la actividad del ciclo de los TCA y permite la formación de citrato mediante la reversión del flujo o por el aumento de OAA. Sin embargo, la adición de dimetilsuccinato no modifica el efecto del zymosan, lo que puede explicarse de forma plausible porque el aumento del succinato inhibe rutas anapleróticas como son la glutaminólisis, el *shunt* del GABA y la oxidación de valina. Asimismo, la caída de coenzima A producida por el zymosan puede limitar la formación de succinil-CoA por el complejo de la α KG-deshidrogenasa (Figura 33B).

A pesar de que el dimetilsuccinato modificó los niveles de los intermediarios del ciclo de los TCA en células control, no estimuló la expresión de citoquinas (Figura 33C).

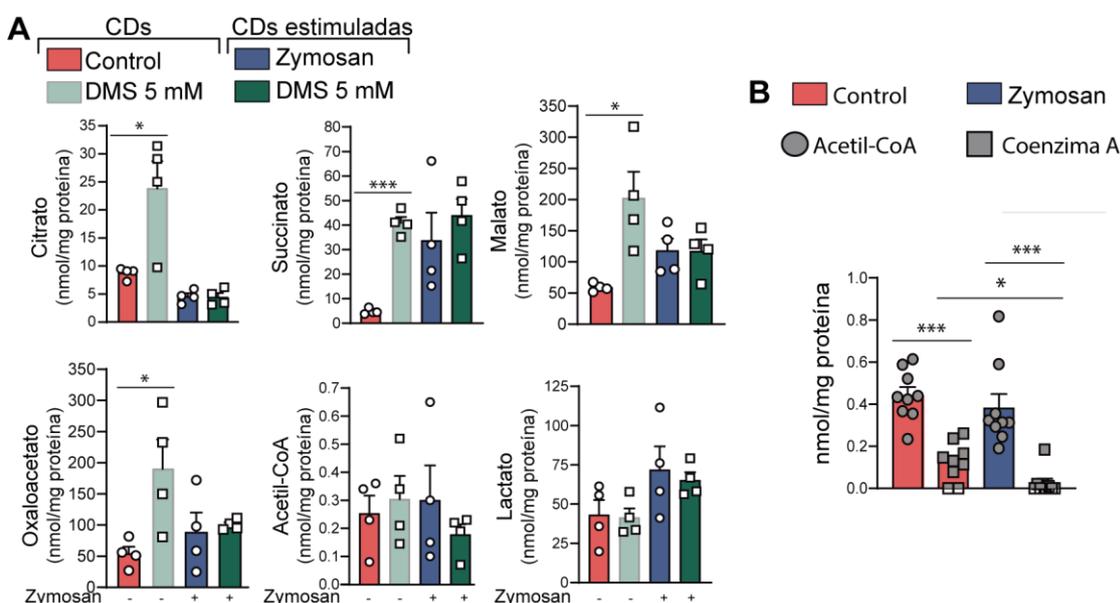


Figura 33. Análisis de los intermediarios metabólicos del ciclo de los TCA y de las citoquinas en CDs estimuladas con zymosan en presencia de dimetilsuccinato (DMS).

A. Las CDs se preincubaron con dimetilsuccinato 5 mM durante una hora y posteriormente se estimularon con zymosan. Tras 30 minutos, se procedió al lavado y a la extracción de los metabolitos para su medida por UPLC/MS. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Datos pareados, Student's t-test de dos colas

B. Medida de los niveles de acCoA y coenzima A en CDs incubadas en presencia y ausencia de zymosan. Tras 30 minutos, las CDs se lavaron y se extrajeron los metabolitos para su medida por UPLC/MS. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Datos pareados, Student's t-test de dos colas.

C. Las CDs se preincubaron con dimetilsuccinato 5 mM durante una hora y se estimularon con 1 mg/ml de zymosan durante 4 horas. Al final de este período se extrajo el RNA para la medida del mRNA de las citoquinas. Los datos se representan como la media \pm SEM.

5.3. EFECTO DE LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD DE LA SDH

Puesto que el dimetilsuccinato no aumentó los niveles intracelulares de succinato inducidos por el zymosan y que recientemente se ha atribuido la elevación del succinato intracelular a la inhibición de la actividad de la SDH (116), se trató de mimetizar el efecto del zymosan mediante la inhibición selectiva de las subunidades de la SDH. Con este propósito, se utilizaron DMM y 3-NPA, que inhiben la subunidad A de la SDH, y TTFA, que bloquea la unión de la ubiquinona a las subunidades C y D. El esquema de la Figura 34A muestra el mecanismo de acción de estos compuestos.

➤ INHIBICIÓN DE LA SDH Y REPROGRAMACIÓN METABÓLICA

El pretratamiento con DMM y 3-NPA aumentó los niveles de succinato y disminuyó los niveles de fumarato, siendo más prominente el efecto del 3-NPA. Por el contrario, el TTFA aumentó los niveles de fumarato y mostró una tendencia a aumentar los niveles de succinato, lo que sugiere que la inhibición de la actividad de la succinato:UbQ oxidoreductasa no afecta a la continuidad del ciclo más allá del succinato. Alternativamente, la actividad del *shunt* aspartato-argininosuccinato podría alimentar el ciclo con fumarato y malato (Figura 34B) (80,141).

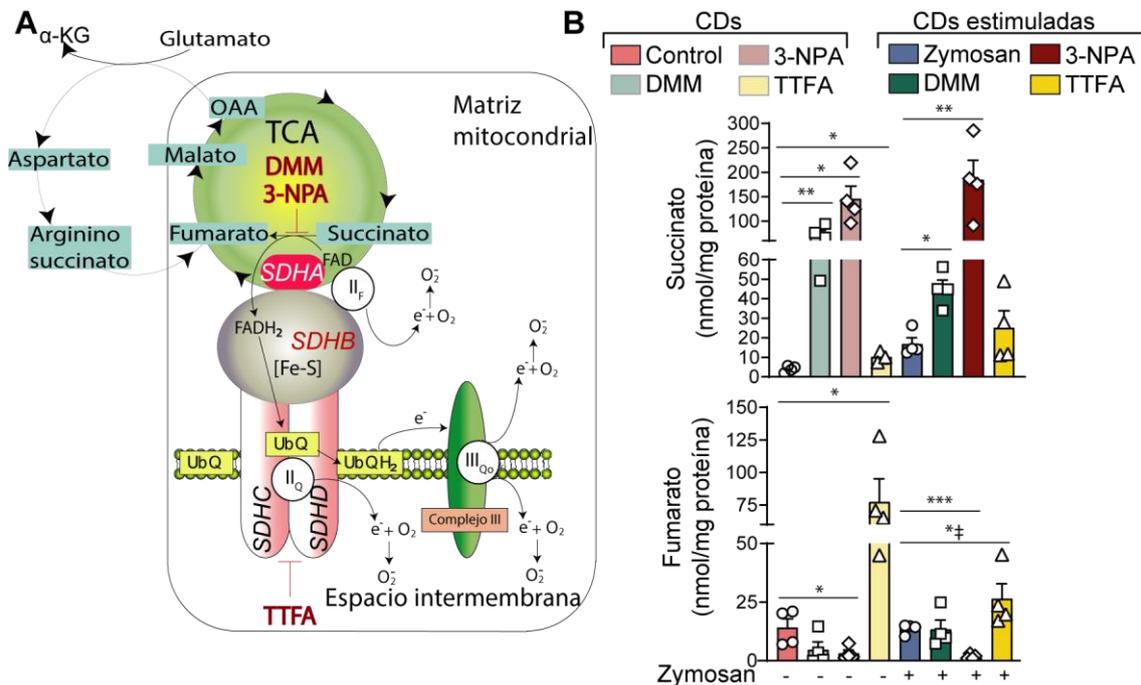


Figura 34. Efecto de los inhibidores de la succinato deshidrogenasa.

A. Representación esquemática del mecanismo de acción de los inhibidores de la SDH. La SDH, que es también el complejo II de la ETC, se compone de 4 subunidades: A y B que catalizan el paso de succinato a fumarato (actividad succinato deshidrogenasa sensu stricto) y C y D que transportan los electrones desde el succinato hasta la ubiquinona (actividad succinato:coenzima Q reductasa). Se representa a la derecha la conexión entre el ciclo argininosuccinato y el ciclo de los TCA.

B. Las CDs se incubaron con DMM 5 mM, 3-NPA 1 mM y TTFA 50 μM durante una hora y posteriormente se estimularon con zymosan a la concentración de 1 mg/ml durante 30 minutos. Tras la incubación se realizó la extracción de los metabolitos del lisado celular en la mezcla acetonitrilo/metanol/agua para el análisis por UPLC/MS. Los datos se representan como la media ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. Datos pareados, Student's t-test de dos colas.

Inesperadamente, el 3-NPA produjo una fuerte disminución de los niveles intracelulares de malato y citrato, lo que podría explicarse por su capacidad para inhibir competitivamente fumarasa y aspartasa (142), mientras que el OAA no mostró cambios significativos. El TTFA aumentó los niveles de malato y disminuyó los niveles de lactato en células estimuladas, lo que sugiere inhibición de la glucólisis (Figura 35).

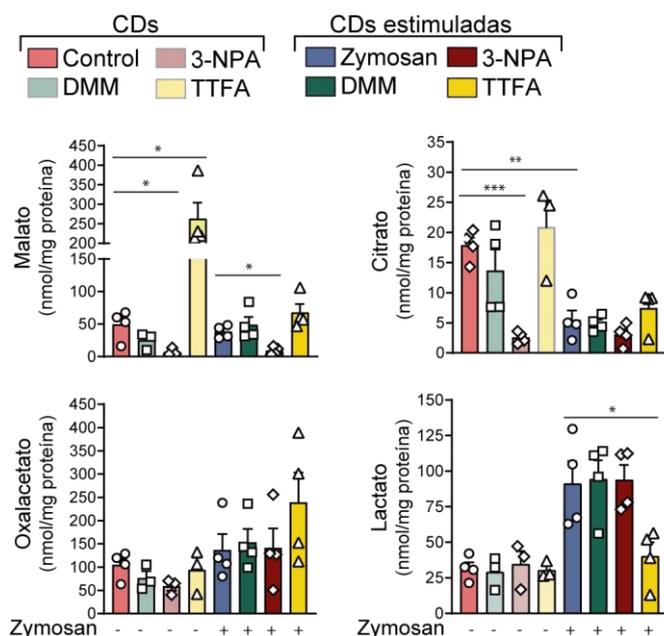


Figura 35. Efecto de los inhibidores de la SDH sobre los intermediarios del ciclo de los TCA.

Las CDs se incubaron con DMM 5 mM, 3-NPA 1 mM y TTFA 50 μ M durante una hora y posteriormente se estimularon con zymosan durante 30 minutos. Tras la incubación, se realizó la extracción de los metabolitos del lisado celular en la mezcla acetonitrilo/metanol/agua para el análisis por UPLC/MS. Los datos se representan como la media \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005. Datos pareados, Student's t-test de dos colas.

➤ EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA SDH SOBRE EL FENOTIPO METABÓLICO

Para profundizar en el análisis de los mecanismos implicados en estos hallazgos, se realizaron experimentos en tiempo real con la tecnología Seahorse. El pretratamiento con DMM produjo un fuerte aumento de la ECAR y disminuyó el incremento de la OCR inducido por el zymosan. El TTFA produjo una caída de la ECAR, que concuerda con la reducción de los niveles de lactato intracelular observada, y una intensa disminución de la OCR. Contrariamente al efecto del TTFA, el DMM aumentó la ECAR, sin que esta aumentara tras la estimulación, lo que podría explicarse por la malonización de la GAPDH, que induce su disociación del mRNA que codifica *TNF* y aumenta su actividad enzimática (143) (Figura 36A).

La Figura 36B muestra el efecto inducido por el TTFA y el DMM sobre las glucólisis inducida y compensatoria.

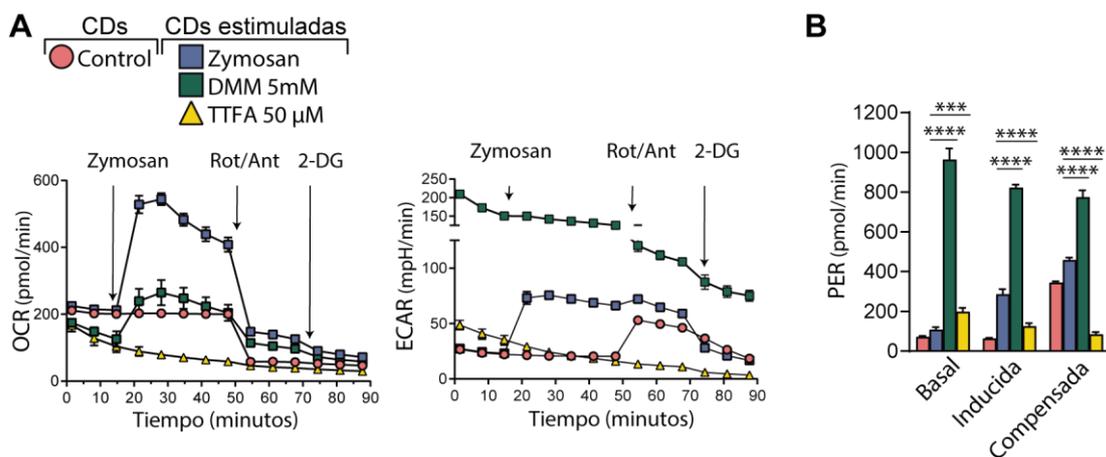


Figura 36. Efecto de la inhibición de la SDH con DMM y TTFA sobre la OCR y la ECAR.

El diseño experimental incluye el análisis de las siguientes condiciones: basal, tras estimulación con zymosan y hasta la adición de Rot/AA (ensayo inducido), y glucólisis compensada tras la inhibición de la actividad mitocondrial. Las CDs se preincubaron con DMM y TTFA a las concentraciones indicadas durante 30 minutos y se transfirieron posteriormente a placas de cultivo Seahorse para su ensayo en tiempo real. Posteriormente, se adicionaron 0.4 mg/ml de zymosan, la mezcla Rot/AA 0.5 μM y 2-DG 50 mM. Los resultados obtenidos utilizando el protocolo Seahorse *XF glycolytic rate assay report* se representan como la media ± SD. ***p<0.005, ****p<0.001. Datos no pareados, Student's t-test de dos colas.

➤ MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SDH Y EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

A la vista de los efectos producidos por los inhibidores de la SDH sobre los niveles de intermediarios metabólicos, se planteó el estudio de la modulación de la actividad de la SDH y su posible relación con la expresión de citoquinas. La **Figura 37A** muestra que la incubación con DMM y 3-NPA durante 30 minutos, previamente a la estimulación, aumentó la expresión del mRNA de *IL23A* e *IL10* mientras que no modificó el mRNA de *IL1B*. Por el contrario, el TTFA redujo significativamente la expresión de los mRNAs de *IL23A*, *IL10* e *IL1B*. Estos resultados indican que las subunidades de SDH ejercen distintos efectos sobre la expresión de citoquinas.

Puesto que el succinato estabiliza la proteína HIF1α y de esa forma modula la expresión de la pro-IL1β (144), se estudió su efecto sobre la estabilización de HIF1α y la traducción de la pro-IL1β. La estimulación con zymosan aumentó la expresión de las proteínas HIF1α y pro-IL1β. La inhibición de la subunidad A con DMM no mostró cambios significativos de la expresión de estas proteínas. El 3-NPA aumentó ligeramente la expresión de HIF1α y pro-IL1β, mientras que el TTFA disminuyó la expresión de ambas proteínas (**Figura 37B**). La disminución del mRNA de *IL1B* con TTFA, y la ausencia de expresión de HIF1α y pro-IL1β concuerdan con los bajos niveles de lactato detectados en presencia de TTFA, puesto que este intermediario juega un papel central en la expresión de ambas proteínas (80,145). Para determinar el efecto que tenían los

distintos inhibidores sobre los niveles de ROS mitocondriales se utilizó MitoSOX™ (Figura 37C). El DMM redujo los niveles de ROS inducidos por el zymosan, mientras que el 3-NPA no mostró efectos significativos y el TTFA solo elevó los niveles de ROS en ausencia de estimulación.

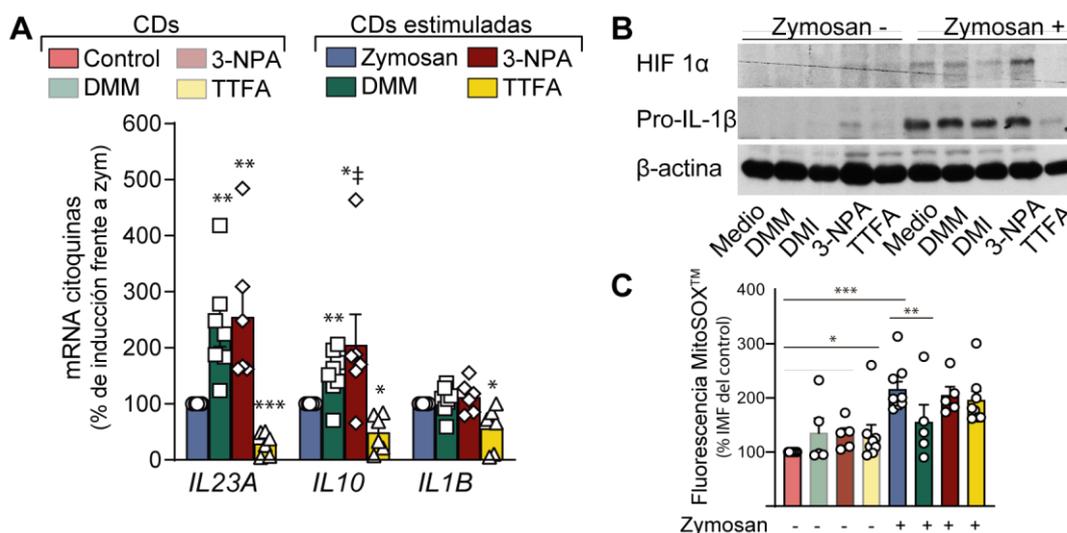


Figura 37. Efecto de la inhibición de la SDH sobre la expresión de citoquinas y los niveles de ROS mitocondriales.

A. Las CDs se incubaron durante 1 hora con con DMM 5 mM, 3-NPA 1 mM y TTFA 50 μM. Posteriormente se estimularon con zymosan durante 4 horas y tras este periodo se procedió a la extracción del mRNA y a la medida de la inducción de citoquinas por qPCR. Los datos se representan como porcentaje de la respuesta observada y se representan como la media ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005. Datos pareados y no pareados, Student's t-test de dos colas. †, Mann-Whitney test.

B. Expresión de las proteínas HIF1α e IL-1β en CDs estimuladas con zymosan durante 7 horas en presencia de los inhibidores de la SDH. Tras finalizar el periodo de incubación, las proteínas se extrajeron para el análisis por *Western Blot*.

C. Efectos de los inhibidores de la SDH sobre la producción de ROS mitocondriales. Los resultados representan la media ± SEM. *p<0.05, **p<0.01. Datos pareados, Student's t-test de dos colas.

Estos resultados muestran el distinto efecto que las subunidades de la SDH ejercen sobre la expresión de citoquinas y el papel que los niveles intracelulares de succinato y el transporte de electrones del complejo II al complejo III de la ETC desempeñan en este proceso.

6. ESTUDIOS FLUXÓMICOS

6.1. RASTREO DE LOS ^{13}C DERIVADOS DE LA GLUCOSA

Se realizó el análisis fluxómico de la glucosa marcada uniformemente con ^{13}C ([U- $^{13}\text{C}_6$]glucosa), lo que permite el seguimiento de la incorporación de los carbonos a los intermediarios metabólicos. La **Figura 38** muestra una representación esquemática de la incorporación de los carbonos derivados de la glucosa al ciclo de los TCA.

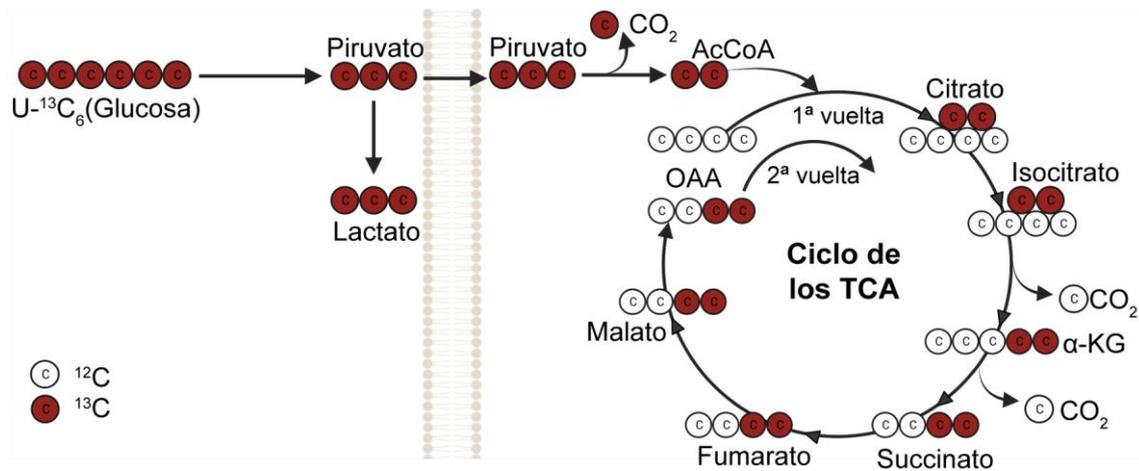


Figura 38. Representación esquemática de los intermediarios metabólicos en la primera vuelta del ciclo de los TCA marcados con ^{13}C derivado de la glucosa.

Los ^{13}C se representan en color rojo y los ^{12}C en color blanco.

Las células se marcaron durante una hora, junto con controles con glucosa ^{12}C para determinar la abundancia natural de ^{13}C en los metabolitos. La incorporación de glucosa se muestra en paralelo con la abundancia de cada intermediario metabólico (altura del pico cromatográfico/mg de proteína) y el porcentaje de isotopólogos $M=0$ frente a $M+2$ (**Figura 39**). Se observó incorporación de ^{13}C procedente de la glucosa en citrato, acCoA y lactato (**Figura 39A**). El piruvato mostró un menor grado de marcaje, lo que puede explicarse por su intensa conversión en lactato y acCoA tras la estimulación (datos no mostrados). En los pasos siguientes a la formación de citrato, no se observaron marcajes significativos (**Figura 39B**), lo que indicaría que los carbonos procedentes de la glucosa se metabolizan hasta lactato y piruvato, y tras la formación de citrato en la mitocondria el transporte al citosol produce acCoA y OAA. Una explicación plausible de por qué no se encontraron carbonos marcados en el OAA se debe a que cuando la ACLY escinde los ^{13}C del citrato, estos pasan al acCoA citosólico y no al OAA (146). Alternativamente, los carbonos del OAA podrían incorporarse al piruvato por la malato deshidrogenasa citosólica y la enzima málica de la lanzadera citrato-piruvato.

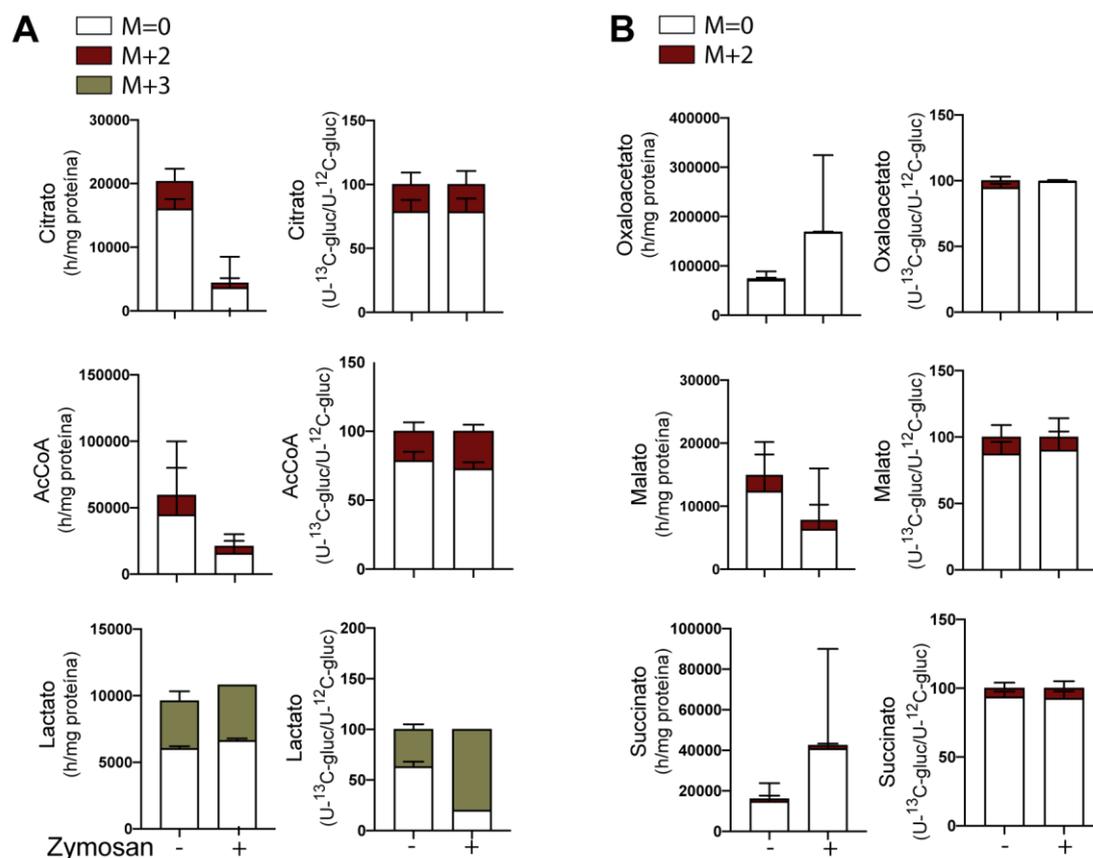


Figura 39. Distribución de isotopólogos en los intermediarios metabólicos del ciclo de los TCA.

Las DCs se incubaron durante 1 hora en medio RPMI suplementado con 10 mM de [U-¹³C₆]glucosa y se estimularon con zymosan durante 30 minutos. Se realizaron en paralelo controles con 10 mM de [U-¹²C₆]glucosa para corregir la abundancia natural de ¹³C en los metabolitos. Los resultados muestran únicamente las condiciones con ¹³C corregidos con la abundancia natural. **(A)** Distribución de isotopólogos en los intermediarios iniciales del ciclo de los TCA. El panel izquierdo representa la altura del pico cromatográfico/mg de proteína. El panel derecho representa el porcentaje de incorporación de M+2 frente a M=0. **(B)** Distribución de isotopólogos en los intermediarios finales del ciclo de los TCA. El panel izquierdo representa la altura del pico cromatográfico/mg de proteína. El panel derecho representa el porcentaje de incorporación de M+2 frente a M=0. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

De forma llamativa, en las CDs en reposo el acCoA mostró el marcaje, no solo en isotopólogos M+2, sino también en isotopólogos M+3, M+4, M+5 y M+6 (Figura 40B). Esto se explica porque la síntesis de acCoA implica, además de la incorporación del grupo acetilo derivado de los ácidos carboxílicos, el uso de coenzima A, cuya síntesis precisa ribosa 5-fosfato y un anillo de adenina (Figura 40A), y se realiza en varios pasos que incluyen: i) síntesis de ribosa 5-fosfato en la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato y ii) síntesis del anillo de adenina a partir de serina y glicina, que se producen a partir del 3-fosfoglicerato generado en la glucólisis (103).

RESULTADOS

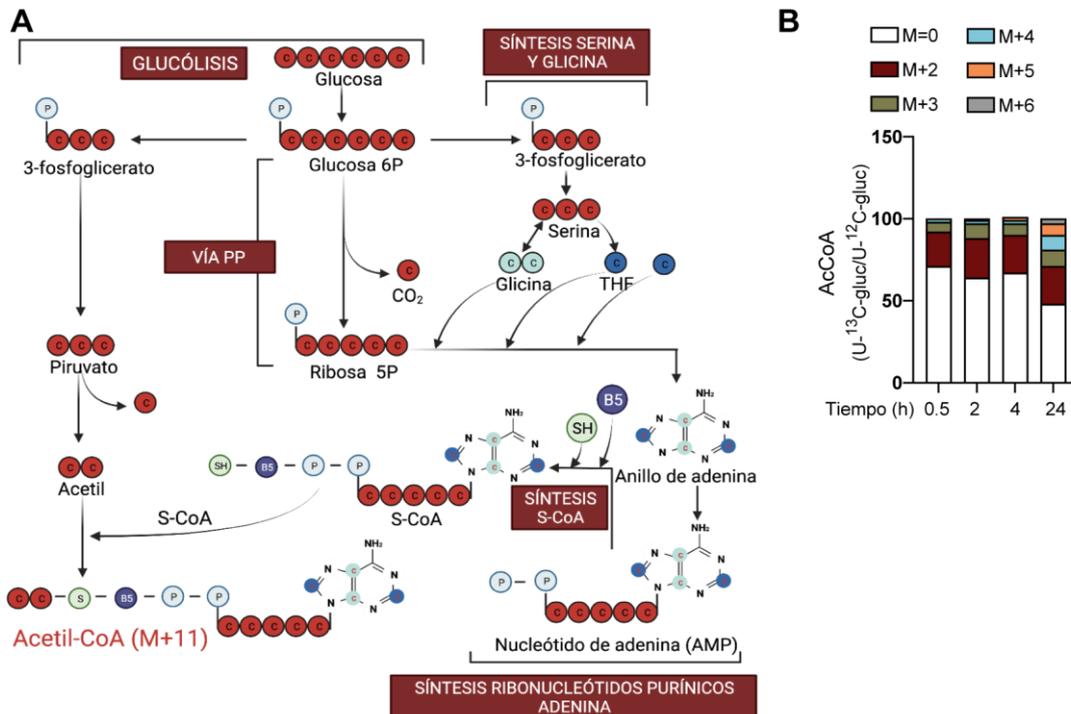


Figura 40. Síntesis de coenzima A e incorporación de carbonos derivados de la glucosa.

A. Esquema de la síntesis de coenzima A y acCoA a partir de la glucosa. La síntesis de coenzima A se realiza en varios pasos: i) Fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato en la que se produce ribosa 5-fosfato. ii) Síntesis de serina, a partir de la cual se producen glicina y tetrahidrofolato (THF). iii) Síntesis del anillo de adenina de los ribonucleótidos purínicos. iiiii) Incorporación de ácido pantoténico (vitamina B5) y β-mercaptoetilamina (cisteamina). La producción de acCoA precisa además del coenzima A, el grupo acetilo derivado del piruvato.

B. Distribución de isotopólogos en el acCoA a lo largo del tiempo. Las DCs se incubaron durante los tiempos indicados en medio RPMI suplementado con 10 mM de [U-¹³C₆]glucosa y se trataron en paralelo controles con [U-¹²C₆]glucosa 10 mM para corregir la abundancia natural de ¹³C en los metabolitos. Los resultados muestran únicamente las condiciones con ¹³C y representan el porcentaje de incorporación de M+2, M+3, M+4, M+5 y M+6 frente a M=0.

Tras observar que la glucosa contribuye a la formación de nucleótidos constituyentes de cofactores enzimáticos, se extendió el estudio a la formación de NAD⁺ y nucleótidos. Los resultados muestran incorporación de isotopólogos M+5 derivados de la glucosa en nucleótidos purínicos y pirimidínicos, además de en NAD y FAD, sobre todo a tiempos más largos en CDs en reposo (Figura 41B). Puesto que en la síntesis del anillo de pirimidina no intervienen la serina y la glicina, la formación de isotopólogos se explica exclusivamente por la presencia de ribosa 5-fosfato (M+5) (Figura 41A).

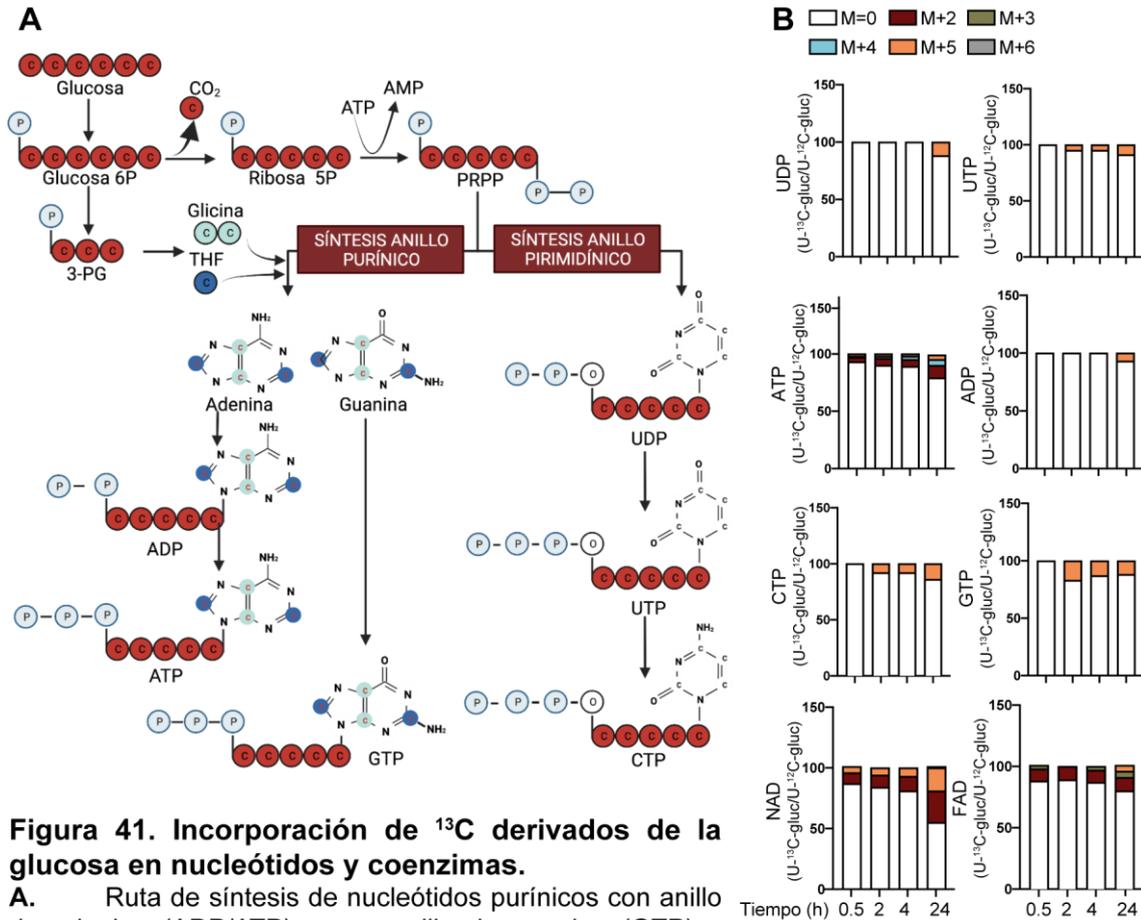


Figura 41. Incorporación de ¹³C derivados de la glucosa en nucleótidos y coenzimas.

A. Ruta de síntesis de nucleótidos purínicos con anillo de adenina (ADP/ATP) y con anillo de guanina (GTP) y nucleótidos pirimidínicos (UDP/UTP/CTP) a partir del PRPP derivado de la ribosa-5P.

B. Distribución de isotopólogos en los nucleótidos y coenzimas a lo largo del tiempo. Las DCs se incubaron durante los tiempos indicados en medio RPMI suplementado con 10 mM de [U-¹³C]₆glucosa y se realizaron en paralelo controles con 10 mM de ([U-¹²C]₆glucosa) para corregir la abundancia natural de ¹³C en los metabolitos. Los resultados muestran únicamente las condiciones con ¹³C y representan el porcentaje de incorporación de M+2, M+3, M+4, M+5 y M+6 frente a M=0.

6.2. RASTREO DE LOS ^{13}C DERIVADOS DE LA GLUTAMINA

Puesto que en los pasos del ciclo de los TCA posteriores a la formación de citrato no se observaron marcajes significativos, se hicieron estudios fluxómicos con glutamina marcada uniformemente con ^{13}C [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]glutamina. La **Figura 42** muestra una representación esquemática de la anaplerosis de la glutamina al ciclo de los TCA y el seguimiento de sus carbonos en los intermediarios del ciclo.

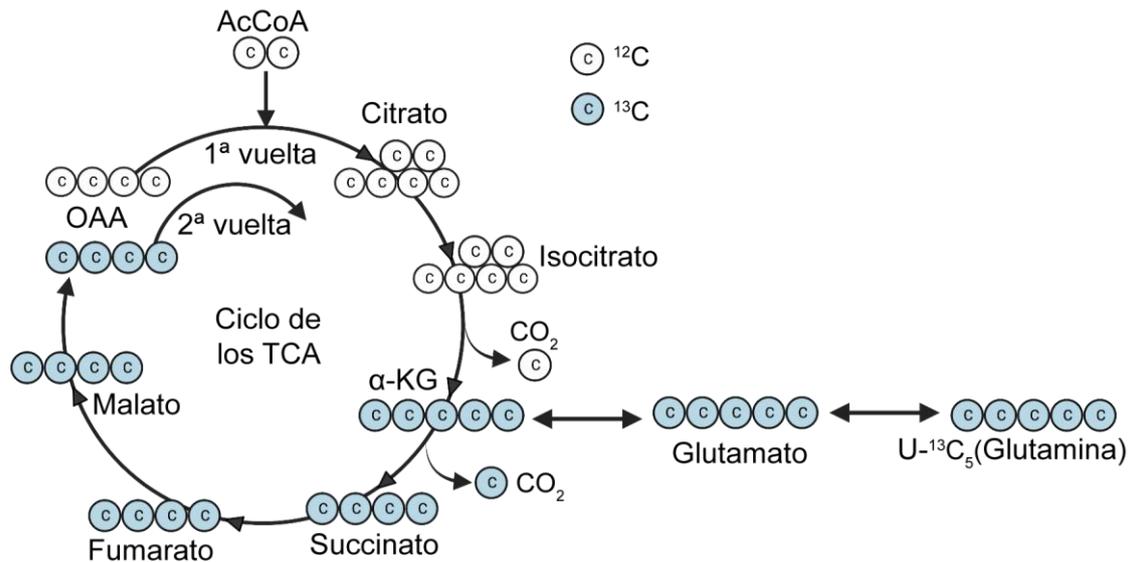


Figura 42. Representación esquemática de los intermediarios metabólicos del ciclo de los TCA.

Los ^{13}C derivados de la glutamina se representan en color azul y los ^{12}C en color blanco.

Las células se incubaron con [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]glutamina junto a controles con glutamina ^{12}C para determinar la abundancia natural de ^{13}C en los metabolitos. Se observó incorporación de ^{13}C procedente de la glutamina en CDs sin estimular en succinato, fumarato y malato. Sin embargo, el OAA no mostró marcaje significativo. Tras la estimulación, el marcaje en ^{13}C aumentó en succinato, y se redujo en fumarato y malato, sin mostrar cambios en el OAA (**Figura 43A**). Los metabolitos iniciales del ciclo de los TCA no mostraron incorporación de ^{13}C procedente de la glutamina ni en células control, ni en las estimuladas (**Figura 43B**).

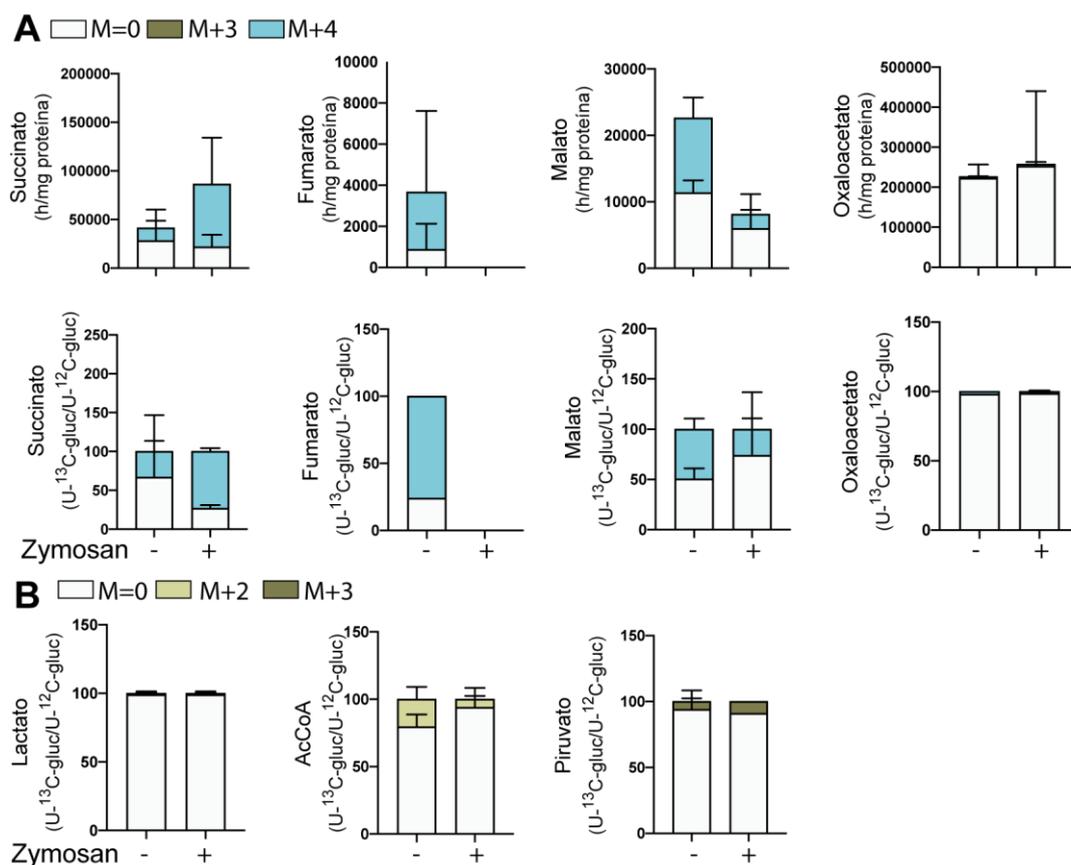


Figura 43. Distribución de isotopólogos en los intermediarios metabólicos del ciclo de los TCA.

Las CDs se incubaron en medio RPMI suplementado con [U-¹³C₅]glutamina 4 mM y se estimularon con zymosan durante 30 minutos. Se realizaron en paralelo controles con 4 mM de [U-¹²C₅]glutamina para corregir la abundancia natural de ¹³C en los metabolitos. Los resultados muestran únicamente las condiciones con ¹³C, corregidos con la abundancia natural. **(A)** Distribución de isotopólogos en los intermediarios finales del ciclo de los TCA. El panel superior representa la altura del pico cromatográfico/mg de proteína. El panel inferior representa el porcentaje de incorporación de M+2 frente a M=0. **(B)** Distribución de isotopólogos en los intermediarios iniciales del ciclo de los TCA. Los resultados representan el porcentaje de incorporación de M+2 frente a M=0. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

Los resultados muestran que la estimulación de las CDs aumenta la utilización de la glucosa para generar metabolitos que contribuyen al desarrollo de la respuesta inmune. El piruvato puede oxidarse a lactato y, alternativamente, transportarse a las mitocondrias para generar acCoA y citrato, que a su vez puede movilizarse al citosol para generar acCoA nucleocitosólico y para mantener las lanzaderas mitocondriales malato-aspartato y citrato-piruvato, mientras que la anaplerosis de la glutamina alimenta las partes finales del ciclo de los TCA.

Asimismo, las CDs usan glucosa para la producción de ribosa 5-fosfato en la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato y el 3-fosfoglicerato para sintetizar glicina y tetrahidrofolato, que a su vez puede utilizarse en la síntesis de purinas y la producción

RESULTADOS

de los nucleótidos necesarios para la formación de cofactores implicados en el metabolismo energético y en la producción de los ácidos nucleicos necesarios para la proliferación celular y la formación de mRNAs.

VII. DISCUSIÓN

1. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células inmunes reprograman su metabolismo durante la respuesta inflamatoria. Los resultados obtenidos muestran que el zymosan induce un cambio del fenotipo metabólico, observable a los 30 minutos del contacto con el estímulo, que se caracteriza por el aumento de la ECAR y un refuerzo concomitante de la OCR, que explica el robusto incremento de la producción de ATP mitocondrial. Esta reprogramación metabólica es indispensable para la función celular, puesto que la inhibición de la ATP sintasa redujo la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias liberadas tras la estimulación. El aumento de la glucólisis y de la OXPHOS se ha observado en modelos que utilizan microorganismos enteros (112,113,147), frente a la respuesta inducida por ligandos solubles como el LPS (81,148), lo que indicaría la complejidad de los factores implicados en la reprogramación metabólica inducida por distintos PRRs.

No existe una razón inequívoca que permita explicar las distintas características de la reprogramación inducida por el zymosan y el LPS. Sin embargo, el examen detallado de los receptores implicados en la reprogramación glucolítica mostró el papel exclusivo de dectin-1 y la señalización a través de la tirosina kinasa SYK (79), además la adherencia rígida de los sustratos a las CDs impulsa señales mecanosensoriales que aumentan la glucólisis y los intermediarios del ciclo de los TCA (149). La existencia de estos mecanismos durante la unión de los β -glucanos al receptor dectin-1 es una hipótesis plausible, ya que la unión de *Candida albicans* produce el aumento de la fuerza mecánica y un área de contracción dependiente de kinasas de la familia SRC que forman una red de actomiosina (150).

Los estudios con espectrometría de masas mostraron cambios en la actividad del ciclo de los TCA y de la ETC en respuesta al zymosan. La caída de los niveles de piruvato puede explicarse por un consumo elevado en el ciclo de los TCA y su transformación en otros metabolitos como lactato, alanina (151) y acetato. En este sentido, se ha descrito que el piruvato puede generar acetato, el cual mantiene el *pool* de acCoA nucleocitosólico en los mamíferos durante los periodos de metabolismo hiperactivo de la glucosa, a través de distintos mecanismos entre los que se incluye el efecto de los ROS (152). Esta sería una explicación muy plausible para la caída del piruvato dado que el zymosan genera, a los treinta minutos, un aumento significativo de los ROS citoplasmáticos además de un aumento del consumo de oxígeno no mitocondrial a través de la NADPH oxidasa 2. Aunque la NADPH oxidasa 5 se ha descrito en CDs (133), los resultados presentados en esta memoria muestran presencia significativamente mayor de la NADPH oxidasa 2 que de la NADPH oxidasa 5 en CDs.

El descenso de los niveles de citrato puede deberse a una formación deficiente por disminución de la actividad del PDC, como ocurre durante la hipoxia (153) o a un consumo elevado tras su transporte al citosol, como se ha descrito en las células tumorales (154). En este sentido, la ACLY cataliza la conversión del citrato en acCoA y OAA en el compartimento nucleocitosólico y regula el flujo de carbonos de la glucosa al acCoA nucleocitosólico en células cancerosas (155). El acCoA mantendría la acetilación de proteínas (156), la lipogénesis y la colesterogénesis (155), necesarias para el mantenimiento de la reserva lipídica y la reconstrucción de las membranas.

De forma similar a la descripción de la elevación de los niveles intracelulares de succinato descrita en macrófagos estimulados con LPS (117), el zymosan aumenta los niveles de succinato por anaplerosis de glutamina. Otras posibles explicaciones de este incremento pueden ser la derivación del GABA (80) y una menor actividad de la actividad de la subunidad A de la SDH dependiente de su desacetilación por la sirtuina 3 (157). Este mecanismo podría existir en nuestro sistema dado que estudios previos mostraron un consumo excesivo del sustrato de las sirtuinas, el NAD⁺, tras la estimulación con zymosan (128).

2. LANZADERAS MITOCONDRIALES

La glucólisis depende del nivel de NAD⁺ citosólico y es bien conocido que la fermentación de piruvato hasta lactato recicla el NADH a NAD⁺ para mantener la actividad de la GAPDH. Asimismo, el sentido de la reacción de la LDH puede invertirse en presencia de altos niveles de lactato, lo que reduce los niveles de NAD⁺. Esto compromete la función celular al agotar los intermediarios glucolíticos y la producción de serina derivada de la glucosa (103). Una consecuencia de este hecho es la necesidad de recurrir a las lanzaderas mitocondriales para mantener el NAD⁺ citosólico en presencia de altas concentraciones de lactato. Los experimentos mostraron una disminución del flujo de protones glucolíticos tras la inhibición de la lanzadera malato-aspartato con AOA y la reversión del efecto tras la adición de aspartato. La lanzadera malato-aspartato mantiene la OXPHOS al reciclar el NAD⁺ a NADH, puesto que la membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH. Este hecho se ha comprobado en nuestro sistema, ya que la reducción inducida por el AOA en la síntesis de ATP se revierte por el aporte de aspartato. Debe destacarse que la inhibición de la lanzadera malato-aspartato con AOA redujo la expresión del mRNA de *IL23A* e *IL10*, mientras que no ejerció ningún efecto sobre los mRNAs de *TNFA* e *IL1B*. Estos resultados muestran que la lanzadera malato-aspartato mantiene la compartimentalización del NAD⁺/NADH y favorece el estado pro-inflamatorio de las CDs,

como se ha demostrado recientemente en respuesta al LPS (82,121,122). La **Figura 44** muestra una representación esquemática de la reprogramación metabólica inducida por el zymosan en CDs derivadas de monocitos humanos.

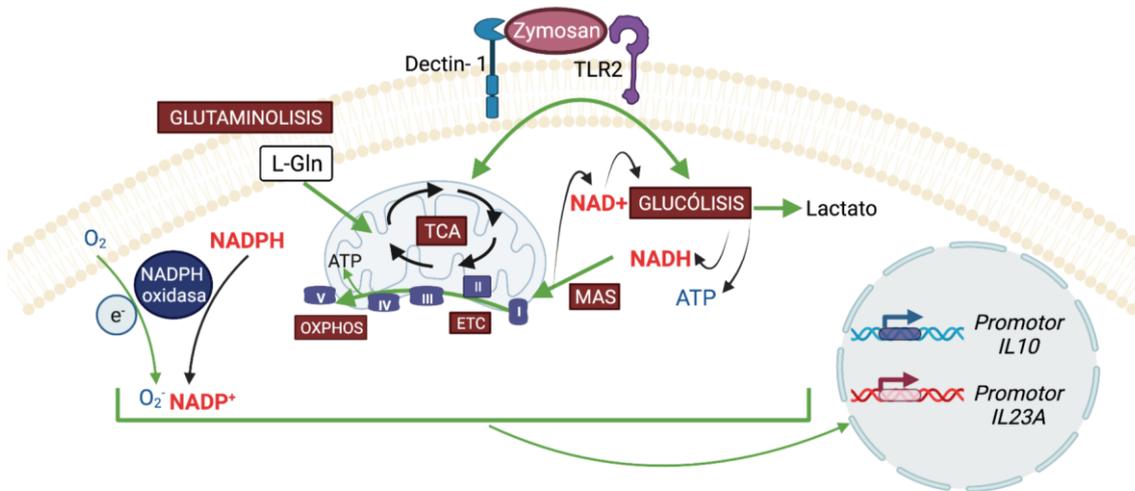


Figura 44. Esquema de la reprogramación metabólica generada por el zymosan en CDs y su efecto en la expresión de citoquinas.

La estimulación produce un aumento de la glucólisis y liberación de lactato al medio extracelular, además de un aumento concomitante de la OXPHOS y el transporte de electrones a través de la ETC. Paralelamente, aumenta la liberación de ROS mitocondriales y citosólicos. La reprogramación metabólica implica la utilización de glucosa y glutamina, y el recurso a la lanzadera malato-aspartato para regenerar y distribuir el poder reductor NAD⁺/NADH. De esa forma se mantiene la expresión de los mRNAs de las citoquinas *IL23A* e *IL10*.

3. EL PAPEL DEL PIRUVATO

El zymosan aumenta el consumo de oxígeno y disminuye los niveles de piruvato. Estos resultados difieren de lo referido inicialmente en macrófagos activados con LPS. Para definir el papel de la OXPHOS y la caída de piruvato en la respuesta a patrones fúngicos, se inhibió la entrada de piruvato en la mitocondria con UK5099. Esto redujo la expresión del mRNA de las citoquinas *IL23A*, *IL10*, *TNFA* e *IL1B*, lo que indicaría que la expresión de estas citoquinas precisa la entrada de piruvato en la mitocondria y el aumento de la actividad del PDC.

El efecto del piruvato en la mitocondria y su relación con la expresión de citoquinas puede deberse a su capacidad para mantener el estado redox y la OXPHOS, a la vista de la reducción de la OCR producida por la inhibición del transporte de piruvato o, alternativamente, depender de su capacidad para generar acCoA nucleocitosólico a través del procesamiento del citrato por la ACLY (158). El UK5099 aumentó el lactato intracelular y redujo los niveles de piruvato, lo que indicaría que la activación de la LDH mantiene el balance NAD⁺/NADH necesario para la progresión de la glucólisis. Sin

embargo, se observó una ligera reducción de la ECAR en respuesta al UK5099. Dado que la reducción de la OXPPOS puede disminuir los protones liberados al medio extracelular, se hicieron experimentos dirigidos a discriminar los protones producidos por la OXPPOS de los derivados del lactato. De esta forma se pudo demostrar el mantenimiento de la actividad glucolítica en presencia de UK5099. Asimismo, se observó la reducción de los niveles de citrato, lo que indicaría que el citrato intracelular se mantiene gracias al flujo de piruvato a la mitocondria y no se produce en forma significativa por la carboxilación reductora del α -KG procedente de la glutaminólisis (73,159). Sin embargo, más allá del citrato no se observaron cambios en la concentración de los intermediarios del ciclo de los TCA, a excepción de un aumento de fumarato y una caída de succinato. Estos resultados están en concordancia con el aumento de la incorporación de glutamina tras la inhibición de la entrada de piruvato en la mitocondria (160) y con el hecho de que esta incorporación afecta únicamente a los metabolitos finales del ciclo hasta OAA (161). Además, la expresión del mRNA de la subunidad A de la SDH aumentó en presencia de UK5099, lo que sugiere su participación en un mecanismo dirigido a mantener la actividad del ciclo de los TCA al favorecer el flujo de succinato a fumarato. Los niveles de acCoA no se modificaron tras la inhibición con UK5099, lo que está de acuerdo con la idea de que en ausencia de acCoA citosólico derivado de la ACLY, la ACSS2 mantiene el pool de acCoA nucleocitosólico (136,162).

La adición de acetato exógeno a concentraciones similares a las detectadas en el suero durante infecciones bacterianas (163) revirtió el efecto inhibitorio del UK5099 en la expresión de los mRNAs de las citoquinas *IL23A* e *IL10*. Los experimentos de acetilación global de histonas no mostraron cambios significativos, sin embargo, la inhibición con UK5099 redujo la acetilación en el sitio κ B del promotor del gen de la *IL23A* y en el sitio CRE del gen de la *IL10*.

Puesto que la inhibición de la entrada de piruvato a la mitocondria redujo la OCR y la disponibilidad de citrato intracelular, los resultados obtenidos sugieren que la entrada de piruvato a la mitocondria mantiene la actividad del PDC y la disponibilidad de poder reductor en forma de NADH para alimentar el complejo I de la ETC, la síntesis de citrato y su posterior salida al citosol para mantener el acCoA citosólico. De esta forma se pueden producir la acetilación de histonas en los promotores de los genes de las citoquinas IL-23 e IL-10. El acCoA generado por la ACSS2 puede complementar el aporte procedente del citrato.

4. CITRATO Y ACLY

El metabolismo del citrato citosólico por la ACLY se ha relacionado con la acetilación de proteínas (156) y con la producción de mediadores pro-inflamatorios como PGE₂ y ROS, en macrófagos humanos (115,164,165). Asimismo, el citrato es necesario para la producción de itaconato, un metabolito antiinflamatorio que promueve la formación de células tolerogénicas. Estos hechos justifican que la síntesis y la degradación del citrato sean procesos finamente regulados. El zymosan redujo los niveles de citrato, lo que sugiere un elevado consumo. Este consumo se puede producir en el ciclo de los TCA o en el compartimento nucleocitosólico. El hecho de que el ciclo de los TCA tenga una solución de continuidad a nivel de citrato justifica los experimentos con citrato exógeno y con el inhibidor de la ACLY. La medida del citrato intracelular mostró un aumento significativo tras la adición de citrato exógeno, que se asoció con un aumento significativo de la expresión de los mRNAs de las citoquinas *IL23A*, *IL1B* e *IL10*, mientras que no se observaron cambios del mRNA de *TNF*. Aunque la adición de BMS-303141 no produjo cambios significativos de la expresión de citoquinas, probablemente como consecuencia de la caída del citrato observada tras la estimulación, la adición de citrato exógeno previamente a la inhibición de la ACLY inhibió el aumento de la expresión de citoquinas producido por la suplementación con citrato. Estos resultados muestran la importancia de los cambios producidos en los flujos de citrato generados durante la reprogramación metabólica y el papel de la ACLY.

En concordancia con la observación que la suplementación con citrato no modifica los niveles de acCoA, un estudio reciente ha demostrado que el citrato exógeno disminuye la contribución de los carbonos de la glucosa al acCoA citosólico (166). Experimentos dirigidos a analizar la acetilación de histonas mostraron escasos efectos del citrato exógeno sobre la acetilación de histonas tras una hora de estimulación. Sin embargo, a las 4 horas, la estimulación aumentó la acetilación global de la histona 3, y el citrato exógeno aumentó el efecto de la estimulación. La inhibición de la ACLY con BMS-303141 en ausencia y en presencia de citrato exógeno produjo un escaso efecto en la acetilación global de la histona 3, lo que podría reflejar una actividad residual de la ACLY, una regulación compensatoria de las histonas desacetilasas a la inhibición o un aumento de la actividad de la ACSS2 (156), como ocurre en condiciones de hipoxia en células que expresan ACSS2 (167). Este parece ser el mecanismo más probable en nuestro sistema, ya que se pudo demostrar que, en condiciones de hipoxia, las CDs incrementan la expresión de ACSS2 tras la estimulación con zymosan, lo que sugiere el recurso a la utilización de acetato como fuente alternativa para la formación de acCoA,

cuando la hipoxia impide la formación de citrato a partir del piruvato (Datos no mostrados).

Los niveles de OAA no se modificaron por la adición de citrato, lo que sugiere una rápida conversión en malato por la malato deshidrogenasa citosólica y a piruvato por la enzima málica, que a su vez produce NADPH. Esta interpretación es razonable, a la vista del gran aumento de los niveles de piruvato y ROS citoplasmáticos, que concuerda con un estudio reciente que ha demostrado que la lanzadera citrato-piruvato contribuye a la eliminación fagosomal de los hongos vía producción de ROS dependiente de NADPH oxidasa 2 y del NADPH generado por la enzima málica (168).

Tomados en conjunto, los resultados muestran un flujo elevado de citrato al compartimento nucleocitosólico. El acCoA generado a partir de la ACLY se utiliza en la acetilación de histonas y favorece la transcripción de los genes que codifican las citoquinas implicadas en la respuesta inmune. Las regulaciones epigenéticas se producen de forma coordinada entre el acCoA generado a partir de citrato y el generado a partir de acetato, lo que desvela el importante papel desempeñado por la ACLY y la ACSS2 en la respuesta inflamatoria.

5. SUCCINATO

El zymosan eleva los niveles intracelulares de succinato, el cual desempeña un papel regulador en las reacciones inflamatorias. Este efecto puede realizarse a través del receptor de membrana GPR91, que induce una cascada de señalización mediada por proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) y permite la transcripción de una serie de genes característicos de cada tipo celular (169). En células mieloides se ha descrito que la señalización a través del GPR91 favorece la respuesta inflamatoria. Sin embargo, nuestros resultados muestran que el succinato exógeno no produce cambios significativos en la expresión de las citoquinas proinflamatorias y que la expresión del receptor desaparece a las cuatro horas de la estimulación. Este resultado estaría de acuerdo con los estudios que han descrito la pérdida de la expresión del GPR91 en CDs inmaduras tras la activación de TLRs (140). Teniendo en cuenta estas premisas, el efecto del succinato debe explicarse mediante la interacción con dianas intracelulares.

Los análisis mostraron elevación de los niveles intracelulares de succinato en las CDs en reposo tras la adición de dimetilsuccinato. Curiosamente, el dimetilsuccinato no produjo una elevación del succinato superior a la que produce la estimulación con zymosan, lo que puede explicarse por la inhibición por producto procedente de otras vías como son la anaplerosis de glutamina, el *shunt* del GABA o la oxidación de valina.

Asimismo, la caída de los niveles de coenzima A producida por el zymosan reduce la formación de succinil-CoA, con el consiguiente efecto sobre la concentración del sustrato de la succinil-CoA sintetasa y la producción de succinato en el ciclo de los TCA. Puesto que el dimetilsuccinato no modificó los niveles de succinato intracelular tras la estimulación, ni produjo efecto alguno en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias, se plantearon experimentos dirigidos a modificar los niveles de succinato actuando sobre las distintas subunidades de la SDH.

La regulación de la expresión de la proteína HIF1 α por los niveles intracelulares de succinato modula la producción de citoquinas (80). Esta acción depende de su efecto sobre las prolil hidroxilasas y el balance α -KG/succinato. Los resultados presentados indican que mientras que el DMM no estabiliza HIF1 α , el 3-NPA es muy activo. Este efecto sobre la prolil hidroxilasa es compartido por el fumarato, con valores de K_i alrededor de 50-80 μ M, frente a 350-460 μ M en el caso del succinato (170). Una explicación plausible del distinto efecto de DMM y 3-NPA es su capacidad para elevar los niveles intracelulares de succinato, mucho más elevada en el caso del 3-NPA.

Un estudio reciente ha mostrado que, a diferencia del succinato, el DMM no estabiliza HIF1 α , lo que sugeriría la participación de otros mecanismos (81), como podría ser la producción de ROS mitocondriales, que pueden inhibir las prolil hidroxilasas y estabilizar HIF1 α (171). El hecho de que el DMM reduzca la producción de ROS mitocondriales, mientras que el 3-NPA muestra escaso efecto, podría ser otro mecanismo por el que DMM modificaría la estabilización de HIF1 α . DMM y 3-NPA aumentaron la expresión de los mRNAs de *IL23A* e *IL10* y no modificaron los mRNAs de *IL1B* ni la traducción de pro-IL1 β . A diferencia de lo que ocurre en los macrófagos, HIF1 α podría no desempeñar un papel relevante en la liberación de citoquinas por CDs activadas con LPS (172). Aunque el 3-NPA indujo la estabilización de HIF1 α , la traducción de la pro-IL1 β no se modificó significativamente, lo que concuerda con resultados recientes en linfocitos T, en los que el efecto sobre la expresión de citoquinas inducido por la inhibición de la subunidad B de la SDH, es más dependiente de la ratio α -KG/succinato que de la estabilización de HIF1 α (173).

La elevación de los niveles de succinato puede promover reacciones de succinilación, una modificación postraduccionales recientemente descrita que incluye la incorporación del succinato del succinil-CoA en residuos de lisina en proteínas especialmente relacionadas con el metabolismo (174). Un estudio reciente demostró sitios de succinilación en el PDC (175), lo que favorecía la OXPHOS. Otra modificación postraduccionales recientemente descrita es la malonización. El malonil-CoA puede

incorporarse en residuos de lisina y modificar la conformación de las proteínas. En macrófagos pro-inflamatorios, la malonización de la GAPDH aumenta su actividad, lo que se ha propuesto como un mecanismo importante en el control de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (143). Esto puede explicar el elevado aumento de la ECAR producido por el DMM, ya que el malonato se metaboliza en la célula a través de la enzima mitocondrial acil-CoA sintetasa miembro 3 en malonil-CoA (176). La caída de la OCR observada tras la inhibición con DMM puede ser consecuencia de la malonización de otras proteínas mitocondriales y producir como respuesta compensatoria el aumento de la glucólisis para mantener los niveles de ATP. Aunque los niveles intracelulares de lactato no aumentaron significativamente tras la inhibición con DMM, un estudio reciente ha demostrado que el uso de estas aproximaciones analíticas, aunque se complementan, pueden no generar resultados idénticos debido a que el Seahorse examina cambios acumulativos del lactato extracelular durante la estimulación, más que niveles puntuales como es el caso de los estudios metabólicos (177).

Además de las modificaciones postraduccionales inducidas por el succinato que favorecen el estado pro-inflamatorio, la caída del α -KG se ha relacionado con la disminución de la actividad de la jumonji desmetilasa 3 (jmd3), una enzima que desmetila la histona 3 en residuos de la lisina-27 trimetilados (H3K27me3). La desmetilación de la H3K27me3 favorece el fenotipo antiinflamatorio en macrófagos estimulados con LPS. Además, el α -KG promueve la hidroxilación de proteínas tales como prolil hidroxilasa o IKK β , lo que evita la estabilización de HIF1 α y la translocación al núcleo de NF-K β , y el estado pro-inflamatorio en macrófagos activados con LPS (107). Mientras la elevación de los niveles de succinato favorece la expresión de citoquinas, la inhibición del transporte de electrones del complejo II al III por el TTFA muestra un efecto opuesto, lo que se puede explicar por el efecto limitado sobre los niveles de succinato, frente a su efecto principal sobre el transporte de electrones ejercido por el TTFA.

Los efectos producidos tras la reprogramación metabólica y su relación con la expresión de citoquinas se muestran en la [Figura 45](#).

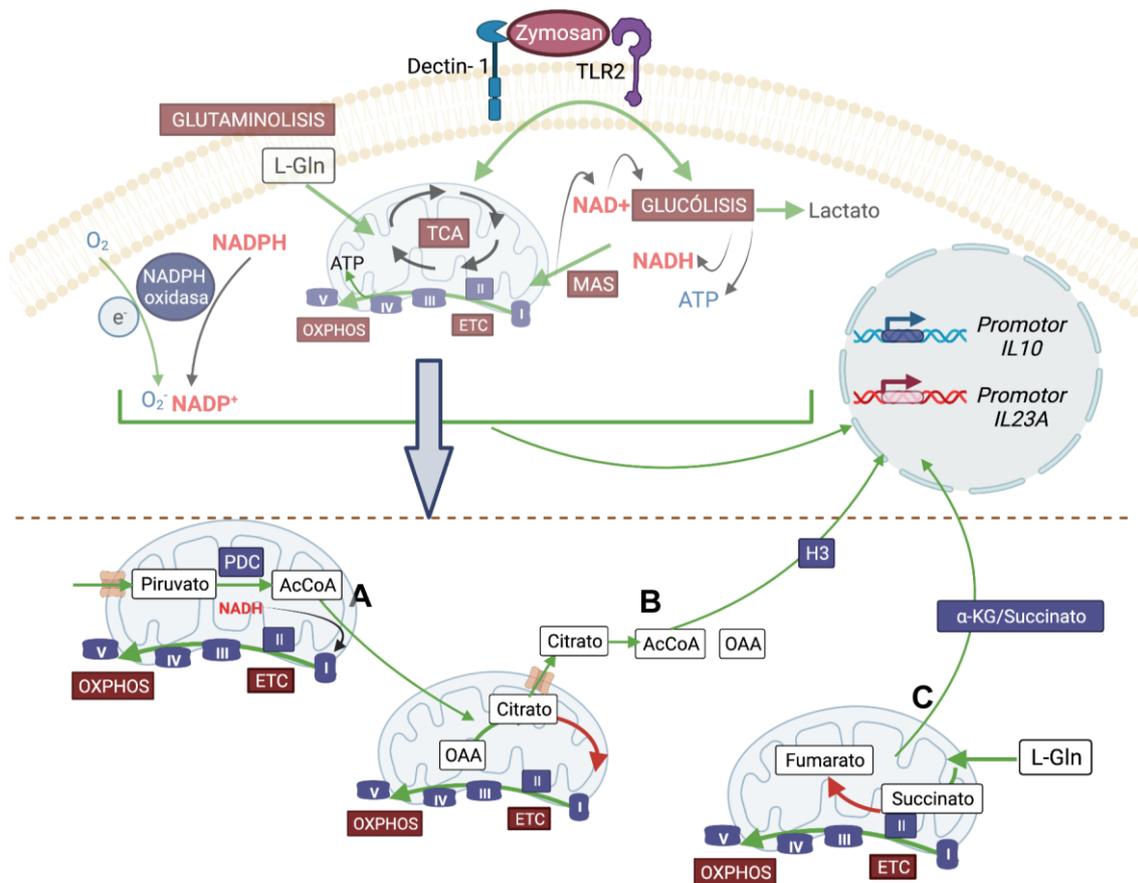


Figura 45. Representación esquemática del procesamiento en el interior de las mitocondrias de los intermediarios metabólicos durante la estimulación con zymosan.

- A.** El procesamiento del piruvato en la mitocondria por el PDC permite el paso de los electrones al complejo I de la ETC por el NADH y la producción de citrato mitocondrial.
- B.** El citrato transportado desde las mitocondrias al compartimento nucleocitosólico permite la acetilación de histonas.
- C.** El succinato mitocondrial contribuye a la transcripción de los genes de citoquinas y transporta los electrones desde el complejo II al complejo III, lo que facilita la expresión de citoquinas.

6. ESTUDIOS FLUXÓMICOS

Los estudios fluxómicos ofrecen una visión más precisa del metabolismo energético que la metabolómica clásica, que mide la concentración intracelular de los intermediarios, pero que no proporciona información precisa sobre los flujos metabólicos. En este sentido, el aumento de los niveles de un metabolito pueden deberse a una producción más rápida o a un consumo más lento. Por el contrario, la caída en los niveles de un metabolito también puede depender de una menor producción o de un consumo más intenso (178). Los experimentos fluxómicos mostraron la misma proporción de incorporación de carbonos de la glucosa en el citrato en CDs control y en estimuladas, lo que sugiere un aumento del consumo inducido por la estimulación que conduce a la

DISCUSIÓN

derivación de los ^{13}C a otros metabolitos. Lo mismo ocurre en el caso del acCoA. Por el contrario, el aumento de lactato tras la estimulación es consecuencia de un aumento de su producción a partir de la glucosa puesto que se observó el aumento de isotopólogos M+3. El resto de los intermediarios metabólicos del ciclo de los TCA no mostró marcajes significativos, lo que podría ser consecuencia de la salida de citrato al citosol. Para aclarar esta posibilidad se utilizó $[\text{U}^{13}\text{C}_5]$ glutamina, lo que permitió observar una elevada incorporación de carbonos derivados de la glutamina (M+4) frente a los derivados de la glucosa (M=0) en DCs en reposo en los intermediarios finales del ciclo de los TCA. Sin embargo, la estimulación solo mostró marcaje del succinato procedente de la glutamina, lo que indicaría el bloqueo de la actividad de la SDH o, alternativamente, la limitación de la técnica, que no permite diferenciar la distribución de isotopólogos entre el citoplasma (M=0) y la mitocondria (M+4). La interpretación más plausible es que el aumento de succinato generado tras la estimulación sea la consecuencia de una combinación entre el aumento de su producción derivado de la anaplerosis de la glutamina y la disminución de su procesamiento por la SDH.

La presencia de purinas con isotopógo $\text{M} \geq 5$ observada en presencia de $[\text{U}^{13}\text{C}_6]$ glucosa son una clara prueba de su utilización en la ruta de las pentosas fosfato e indican la utilización de la glucosa para la formación de nucleótidos y coenzimas como NAD^+ y acCoA durante la estimulación, con el fin de mantener el estado redox y facilitar la transcripción.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las células dendríticas experimentan un aumento rápido de la glucólisis y de la actividad mitocondrial cuando se estimulan con zymosan. El cambio de fenotipo metabólico depende de la glucólisis y la glutaminólisis, y conduce al incremento de la producción de ATP y de ROS mitocondriales y citosólicos.
2. El mantenimiento de estas rutas energéticas depende de la lanzadera malato-aspartato que regenera el NADH mitocondrial y el NAD⁺ nucleocitosólico y modula el patrón transcripcional de las citoquinas IL-23 e IL-10.
3. El flujo de piruvato a la mitocondria y el aumento de la actividad del PDC es necesario para la transcripción de *IL10* e *IL23A* en células dendríticas estimuladas con zymosan, en un proceso que conduce a la generación de acCoA nucleocitosólico y que permite las reacciones de acetilación de lisinas en los promotores proximales de estas citoquinas.
4. La estimulación con zymosan produce un consumo elevado de citrato, que regula el patrón transcripcional de citoquinas a través de la actividad de la ACLY y de reacciones de acetilación de histonas.
5. El succinato se acumula tras la estimulación con zymosan, lo que se debe a la combinación de la reducción de la actividad de la SDH y al aumento de su producción por anaplerosis de la glutamina. En consecuencia, la ratio α -KG/succinato disminuye y favorece la expresión de las citoquinas IL-23 e IL-10.
6. El efecto del zymosan sobre el metabolismo de glucosa tiene dos consecuencias sobre el ciclo de los TCA: Mantenimiento de la ETC a través de la oxidación del piruvato en el PDC y aporte de acCoA y OAA al compartimento nucleocitosólico. Esto permite las reacciones de acetilación y la actividad de las lanzaderas mitocondriales.
7. La glutaminólisis y la reducción de la actividad de la SDH inducidas por el por el zymosan soportan los pasos finales del ciclo de los TCA y disminuyen la razón α -KG/succinato que dirige el sentido de las reacciones de las hidroxilasas dependientes de α -KG.
8. La glucosa se utiliza por las CDs para mantener la actividad de la ruta de las pentosas fosfato y la síntesis de serina necesarias para la producción de nucleótidos y cofactores enzimáticos.

IX. REFERENCIAS

1. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(12):845–59.
2. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 1998 Oct;10(5):351–3.
3. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973 May 1;137(5):1142–62.
4. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271–96.
5. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):519–31.
6. Sallusto F, Lanzavecchia A. 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*. 1994 Apr 1;179(4):1109–18.
7. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2000 Apr;18(1):767–811.
8. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 1:1–13.
9. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991–1045.
10. Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2002 Jun;14(3):380–3.
11. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity*. 2013 Feb 21;38(2):336–48.
12. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MAM, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2008 Apr 14;205(4):869–82.
13. Plato A, Willment JA, Brown GD. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster: ligands and signaling pathways. *Int Rev Immunol*. 2013 Apr;32(2):134–56.
14. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Sousa CR e. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*. 2006 Dec;7(12):1258–65.
15. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783–801.
16. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008 May;42(2):145–51.

REFERENCIAS

17. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 1999 Oct 21;401(6755):811–5.
18. Tone K, Stappers MHT, Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors of the Dectin-1 cluster: Physiological roles and involvement in disease. *Eur J Immunol*. 2019 Dec;49(12):2127–33.
19. Tsoni SV, Brown GD. beta-Glucans and dectin-1. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1143:45–60.
20. Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2015 Feb;32:21–7.
21. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med*. 2002 Aug 5;196(3):407–12.
22. Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest*. 2006 Apr;116(4):916–28.
23. Daley D, Mani VR, Mohan N, Akkad N, Ochi A, Heindel DW, et al. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance. *Nat Med*. 2017 May 10;23(5):556–67.
24. Brown GD, Crocker PR. Lectin Receptors Expressed on Myeloid Cells. *Microbiol Spectr*. 2016 Oct;4(5).
25. Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol*. 2005 Apr;7(4):471–9.
26. Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyz E, Willment JA, Taylor PR, et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol*. 2008 Feb;38(2):500–6.
27. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *Journal of Experimental Medicine*. 2003 May 5;197(9):1119–24.
28. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, et al. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife*. 2014 Aug 22;3.
29. Drummond RA, Dambuza IM, Vautier S, Taylor JA, Reid DM, Bain CC, et al. CD4(+) T-cell survival in the GI tract requires dectin-1 during fungal infection. *Mucosal Immunol*. 2016 Mar;9(2):492–502.
30. Takagawa T, Kitani A, Fuss I, Levine B, Brant SR, Peter I, et al. An increase in LRRK2 suppresses autophagy and enhances Dectin-1-induced immunity in a mouse model of colitis. *Sci Transl Med*. 2018;10(444).
31. de Vries HS, Plantinga TS, van Krieken JH, Stienstra R, van Bodegraven AA, Festen EAM, et al. Genetic Association Analysis of the Functional c.714T>G

- Polymorphism and Mucosal Expression of Dectin-1 in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2009 Nov 12;4(11):e7818.
32. Yoshitomi H, Sakaguchi N, Kobayashi K, Brown GD, Tagami T, Sakihama T, et al. A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med*. 2005 Mar 21;201(6):949–60.
 33. Yan C, Tang N, Guo H, Zhang J. C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Suppresses the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2020 May 1;204(1 Supplement):150.19. Available from: http://www.jimmunol.org/content/204/1_Supplement/150.19.abstract
 34. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):263–74.
 35. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1).
 36. BLANCO P, PALUCKA A, PASCUAL V, BANCHEREAU J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Feb;19(1):41–52.
 37. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Lyakh LA, Batoni G, Esin S, Winkler-Pickett RT, et al. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med*. 2008 Jun 9;205(6):1447–61.
 38. Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol*. 2009 May;39(5):1379–86.
 39. Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)- β -glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol*. 2010 Jun 1;184(11):6335–42.
 40. O'Neill LAJ, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med*. 2016 Jan 11;213(1):15–23.
 41. Llopiz D, Ruiz M, Infante S, Villanueva L, Silva L, Hervas-Stubbs S, et al. IL-10 expression defines an immunosuppressive dendritic cell population induced by antitumor therapeutic vaccination. *Oncotarget*. 2017 Jan 10;8(2):2659–71.
 42. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989 Dec 1;170(6):2081–95.
 43. Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr JM, McIlrath J, Park JM, et al. The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*. 2008 Sep 10;9(9):1028–36.
 44. Danne C, Ryzhakov G, Martínez-López M, Ilott NE, Franchini F, Cuskin F, et al. A Large Polysaccharide Produced by *Helicobacter hepaticus* Induces an Anti-inflammatory Gene Signature in Macrophages. *Cell Host Microbe*. 2017 Dec;22(6):733-745.e5.

45. Alvarez Y, Municio C, Alonso S, Sánchez Crespo M, Fernández N. The Induction of IL-10 by Zymosan in Dendritic Cells Depends on CREB Activation by the Coactivators CREB-Binding Protein and TORC2 and Autocrine PGE₂. *The Journal of Immunology*. 2009 Jul 15;183(2):1471–9.
46. Palsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays*. 2013 Nov;35(11):965–73.
47. Amiel E, Everts B, Freitas TC, King IL, Curtis JD, Pearce EL, et al. Inhibition of Mechanistic Target of Rapamycin Promotes Dendritic Cell Activation and Enhances Therapeutic Autologous Vaccination in Mice. *The Journal of Immunology*. 2012 Sep 1;189(5):2151–8.
48. Cardoso A, Gil Castro A, Martins AC, Carriche GM, Murigneux V, Castro I, et al. The Dynamics of Interleukin-10-Afforded Protection during Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Front Immunol*. 2018 Mar 1;9.
49. Galeazzi M, Bazzichi L, Sebastiani GD, Neri D, Garcia E, Ravenni N, et al. A phase IB clinical trial with Dekavil (F8-IL10), an immunoregulatory “armed antibody” for the treatment of rheumatoid arthritis, used in combination with methotrexate. *Isr Med Assoc J*. 2014 Oct;16(10):666.
50. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137–48.
51. Welsby I, Goriely S. Regulation of Interleukin-23 Expression in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:167–89.
52. Rodríguez M, Domingo E, Alonso S, Frade JG, Eiros J, Crespo MS, et al. The unfolded protein response and the phosphorylations of activating transcription factor 2 in the trans-activation of il23a promoter produced by β-glucans. *J Biol Chem*. 2014 Aug 15;289(33):22942–57.
53. Nastasi C, Candela M, Bonefeld CM, Geisler C, Hansen M, Krejsgaard T, et al. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci Rep*. 2015 Nov 6;5:16148.
54. Chang P v., Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Feb 11;111(6):2247–52.
55. Nastasi C, Fredholm S, Willerslev-Olsen A, Hansen M, Bonefeld CM, Geisler C, et al. Butyrate and propionate inhibit antigen-specific CD8⁺ T cell activation by suppressing IL-12 production by antigen-presenting cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):14516.
56. Lauterbach MA, Hanke JE, Serefidou M, Mangan MSJ, Kolbe CC, Hess T, et al. Toll-like Receptor Signaling Rewires Macrophage Metabolism and Promotes Histone Acetylation via ATP-Citrate Lyase. *Immunity*. 2019;51(6):997-1011.e7.
57. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*. 2012 Nov 8;491(7423):254–8.

58. Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006 Jul 27;442(7101):461–5.
59. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 2009 Nov 20;31(5):787–98.
60. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):248–56.
61. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233–40.
62. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med*. 2004 Jan 5;199(1):125–30.
63. Singh R, Aggarwal A, Misra R. Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthropathy. *J Rheumatol*. 2007 Nov;34(11):2285–90.
64. Teng MWL, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):719–29.
65. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, Etxeberria I, Aznar MA, Pérez-Gracia JL, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2019 Jan 9;120(1):6–15.
66. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010 Mar;140(6):883–99.
67. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 2009 Jan 1;457(7225):102–6.
68. Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, et al. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol*. 2000 Apr 15;164(8):4277–85.
69. Baldwin AS. THE NF- κ B AND I κ B PROTEINS: New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol*. 1996 Apr;14(1):649–81.
70. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Sep;2(9):736–46.
71. Everts B, Amiel E, Huang SCC, Smith AM, Chang CH, Lam WY, et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol*. 2014 Apr;15(4):323–32.
72. Cameron AM, Castoldi A, Sanin DE, Flachsmann LJ, Field CS, Puleston Daniel J, et al. Inflammatory macrophage dependence on NAD⁺ salvage is a consequence of

- reactive oxygen species-mediated DNA damage. *Nat Immunol.* 2019 Apr 11;20(4):420–32.
73. Meiser J, Krämer L, Sapcariu SC, Battello N, Ghelfi J, D’Herouel AF, et al. Pro-inflammatory Macrophages Sustain Pyruvate Oxidation through Pyruvate Dehydrogenase for the Synthesis of Itaconate and to Enable Cytokine Expression. *J Biol Chem.* 2016 Feb 19;291(8):3932–46.
 74. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regen.* 2019;39:12.
 75. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood.* 2009 Aug 6;114(6):1141–9.
 76. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24;454(7203):436–44.
 77. Pantschenko AG, Pushkar I, Anderson KH, Wang Y, Miller LJ, Kurtzman SH, et al. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. *Int J Oncol.* 2003 Aug;23(2):269–84.
 78. Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med.* 2006 Nov 10;4:48.
 79. Thwe PM, Fritz DI, Snyder JP, Smith PR, Curtis KD, O’Donnell A, et al. Syk-dependent glycolytic reprogramming in dendritic cells regulates IL-1 β production to β -glucan ligands in a TLR-independent manner. *J Leukoc Biol.* 2019;106(6):1325–35.
 80. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature.* 2013 Apr 11;496(7444):238–42.
 81. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell.* 2016 Oct;167(2):457–470.e13.
 82. Langston PK, Nambu A, Jung J, Shibata M, Aksoylar HI, Lei J, et al. Glycerol phosphate shuttle enzyme GPD2 regulates macrophage inflammatory responses. *Nat Immunol.* 2019;20(9):1186–95.
 83. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* 1927 Mar 7;8(6):519–30.
 84. Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochemical Journal.* 1986 Oct 1;239(1):121–5.
 85. Michl J, Ohlbaum DJ, Silverstein SC. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. I. Description of the inhibitory effect. *J Exp Med.* 1976 Dec 1;144(6):1465–83.

86. Zasiłona Z, O'Neill LAJ. Cytokine-like Roles for Metabolites in Immunity. *Mol Cell*. 2020;78(5):814–23.
87. Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord*. 2015 Jan 6;8(1):20–30.
88. Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, O'Neill LAJ. Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 β (IL-1 β) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages. *J Biol Chem*. 2015 Aug 14;290(33):20348–59.
89. Joffe MM, Love LA, Leff RL, Fraser DD, Targoff IN, Hicks JE, et al. Drug therapy of the idiopathic inflammatory myopathies: predictors of response to prednisone, azathioprine, and methotrexate and a comparison of their efficacy. *Am J Med*. 1993 Apr;94(4):379–87.
90. Mazumdar C, Driggers EM, Turka LA. The Untapped Opportunity and Challenge of Immunometabolism: A New Paradigm for Drug Discovery. *Cell Metab*. 2020;31(1):26–34.
91. OREN R, FARNHAM AE, SAITO K, MILOFSKY E, KARNOVSKY ML. Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J Cell Biol*. 1963 Jun;17:487–501.
92. Caro-Maldonado A, Wang R, Nichols AG, Kuraoka M, Milasta S, Sun LD, et al. Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J Immunol*. 2014 Apr 15;192(8):3626–36.
93. Cameron AM, Lawless SJ, Pearce EJ. Metabolism and acetylation in innate immune cell function and fate. *Semin Immunol*. 2016 Oct;28(5):408–16.
94. Kurdistani SK, Grunstein M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Apr;4(4):276–84.
95. Fan J, Krautkramer KA, Feldman JL, Denu JM. Metabolic Regulation of Histone Post-Translational Modifications. *ACS Chem Biol*. 2015 Jan 16;10(1):95–108.
96. Boukouris AE, Zervopoulos SD, Michelakis ED. Metabolic Enzymes Moonlighting in the Nucleus: Metabolic Regulation of Gene Transcription. *Trends Biochem Sci*. 2016 Aug;41(8):712–30.
97. Bulusu V, Tumanov S, Michalopoulou E, van den Broek NJ, MacKay G, Nixon C, et al. Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation. *Cell Rep*. 2017 Jan;18(3):647–58.
98. Arnold PK, Jackson BT, Paras KI, Brunner JS, Hart ML, Newsom OJ, et al. A non-canonical tricarboxylic acid cycle underlies cellular identity. *Nature*. 2022 Mar 17;603(7901):477–81.
99. Piacenza L, Trujillo M, Radi R. Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *J Exp Med*. 2019;216(3):501–16.

100. FARBER S, DIAMOND LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* 1948 Jun 3;238(23):787–93.
101. Ma EH, Bantug G, Griss T, Condotta S, Johnson RM, Samborska B, et al. Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metab.* 2017;25(2):345–57.
102. Chini CCS, Zeidler JD, Kashyap S, Warner G, Chini EN. Evolving concepts in NAD⁺ metabolism. *Cell Metab.* 2021 Jun;33(6):1076–87.
103. Quinn WJ, Jiao J, TeSlaa T, Stadanlick J, Wang Z, Wang L, et al. Lactate Limits T Cell Proliferation via the NAD(H) Redox State. *Cell Rep.* 2020;33(11):108500.
104. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(9):553–65.
105. Guo C, Chen S, Liu W, Ma Y, Li J, Fisher PB, et al. Immunometabolism: A new target for improving cancer immunotherapy. *Adv Cancer Res.* 2019;143:195–253.
106. Haas R, Cucchi D, Smith J, Pucino V, Macdougall CE, Mauro C. Intermediates of Metabolism: From Bystanders to Signalling Molecules. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(5):460–71.
107. Liu PS, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, et al. α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol.* 2017 Sep;18(9):985–94.
108. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity.* 2013 Apr 18;38(4):633–43.
109. Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4697–705.
110. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 2010 Jun 10;115(23):4742–9.
111. Kelly B, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* 2015 Jul;25(7):771–84.
112. Lachmandas E, Boutens L, Ratter JM, Hijmans A, Hooiveld GJ, Joosten LAB, et al. Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nat Microbiol.* 2016 Dec 19;2:16246.
113. Domínguez-Andrés J, Arts RJW, ter Horst R, Gresnigt MS, Smeekens SP, Ratter JM, et al. Rewiring monocyte glucose metabolism via C-type lectin signaling protects against disseminated candidiasis. *PLoS Pathog.* 2017 Sep;13(9):e1006632.
114. Yao CH, Wang R, Wang Y, Kung CP, Weber JD, Patti GJ. Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *Elife.* 2019;8.

115. Infantino V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, di Noia MA, Calvello R, et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem J.* 2011 Sep 15;438(3):433–6.
116. Jha AK, Huang SCC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 2015 Mar 17;42(3):419–30.
117. Rodríguez-Prados JC, Través PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):605–14.
118. Diehl FF, Lewis CA, Fiske BP, vander Heiden MG. Cellular redox state constrains serine synthesis and nucleotide production to impact cell proliferation. *Nat Metab.* 2019;1(9):861–7.
119. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu XG, Fidelin J, Sviderskiy VO, et al. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):775–81.
120. Sullivan LB, Luengo A, Danai L v, Bush LN, Diehl FF, Hosios AM, et al. Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):782–8.
121. Bailis W, Shyer JA, Zhao J, Canaveras JCG, al Khazal FJ, Qu R, et al. Distinct modes of mitochondrial metabolism uncouple T cell differentiation and function. *Nature.* 2019 Jul 18;571(7765):403–7.
122. Xu T, Stewart KM, Wang X, Liu K, Xie M, Ryu JK, et al. Metabolic control of TH17 and induced Treg cell balance by an epigenetic mechanism. *Nature.* 2017;548(7666):228–33.
123. Assmann N, O'Brien KL, Donnelly RP, Dyck L, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, et al. Srebp-controlled glucose metabolism is essential for NK cell functional responses. *Nat Immunol.* 2017 Nov 18;18(11):1197–206.
124. Busso N, Karababa M, Nobile M, Rolaz A, van Gool F, Galli M, et al. Pharmacological Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase/Visfatin Enzymatic Activity Identifies a New Inflammatory Pathway Linked to NAD. *PLoS One.* 2008 May 21;3(5):e2267.
125. Halvorsen B, Espeland MZ, Andersen GØ, Yndestad A, Sagen EL, Rashidi A, et al. Increased expression of NAMPT in PBMC from patients with acute coronary syndrome and in inflammatory M1 macrophages. *Atherosclerosis.* 2015 Nov;243(1):204–10.
126. Liu TF, Yoza BK, el Gazzar M, Vachharajani VT, McCall CE. NAD⁺-dependent SIRT1 deacetylase participates in epigenetic reprogramming during endotoxin tolerance. *J Biol Chem.* 2011 Mar 18;286(11):9856–64.
127. Schilling E, Wehrhahn J, Klein C, Raulien N, Ceglarek U, Hauschildt S. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase modifies LPS-induced inflammatory responses of human monocytes. *Innate Immun.* 2012 Jun;18(3):518–30.

REFERENCIAS

128. Alvarez Y, Rodríguez M, Municio C, Hugo E, Alonso S, Ibarrola N, et al. Sirtuin 1 Is a Key Regulator of the Interleukin-12 p70/Interleukin-23 Balance in Human Dendritic Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Oct;287(42):35689–701.
129. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72(1-2):248–54.
130. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
131. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003 May 5;197(9):1107–17.
132. Romero MM, Basile JI, Corra Feo L, López B, Ritacco V, Alemán M. Reactive oxygen species production by human dendritic cells involves TLR2 and dectin-1 and is essential for efficient immune response against Mycobacteria. *Cell Microbiol*. 2016;18(6):875–86.
133. Marzaioli V, Hurtado-Nedelec M, Pintard C, Tlili A, Marie JC, Monteiro RC, et al. NOX5 and p22phox are 2 novel regulators of human monocytic differentiation into dendritic cells. *Blood*. 2017;130(15):1734–45.
134. Pantel A, Teixeira A, Haddad E, Wood EG, Steinman RM, Longhi MP. Direct Type I IFN but Not MDA5/TLR3 Activation of Dendritic Cells Is Required for Maturation and Metabolic Shift to Glycolysis after Poly IC Stimulation. *PLoS Biol*. 2014 Jan 7;12(1):e1001759.
135. Taylor WM, Halperin ML. Regulation of pyruvate dehydrogenase in muscle. Inhibition by citrate. *J Biol Chem*. 1973 Sep 10;248(17):6080–3.
136. Márquez S, Fernández JJ, Mancebo C, Herrero-Sánchez C, Alonso S, Sandoval TA, et al. Tricarboxylic Acid Cycle Activity and Remodeling of Glycerophosphocholine Lipids Support Cytokine Induction in Response to Fungal Patterns. *Cell Rep*. 2019 Apr 9;27(2):525–536.e4.
137. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 7;110(19):7820–5.
138. Németh B, Doczi J, Csete D, Kacso G, Ravasz D, Adams D, et al. Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced *Irg1* expression in cells of murine macrophage lineage. *The FASEB Journal*. 2016 Jan 10;30(1):286–300.
139. GARLAND PB, RANDLE PJ, NEWSHOLME EA. CITRATE AS AN INTERMEDIARY IN THE INHIBITION OF PHOSPHOFRUCTOKINASE IN RAT HEART MUSCLE BY FATTY ACIDS, KETONE BODIES, PYRUVATE, DIABETES, AND STARVATION. *Nature*. 1963 Oct 12;200:169–70.
140. Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol*. 2008 Nov;9(11):1261–9.

141. Mills EL, O'Neill LA. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *Eur J Immunol.* 2016 Jan;46(1):13–21.
142. Porter DJ, Bright HJ. 3-Carbanionic substrate analogues bind very tightly to fumarase and aspartase. *J Biol Chem.* 1980 May 25;255(10):4772–80.
143. Galván-Peña S, Carroll RG, Newman C, Hinchy EC, Palsson-McDermott E, Robinson EK, et al. Malonylation of GAPDH is an inflammatory signal in macrophages. *Nat Commun.* 2019;10(1):338.
144. Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 1990 May;9(5):1503–10.
145. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 2014 Sep 13;513(7519):559–63.
146. Sun T, Hayakawa K, Bateman KS, Fraser ME. Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography. *J Biol Chem.* 2010 Aug 27;285(35):27418–28.
147. Arts RJW, Carvalho A, la Rocca C, Palma C, Rodrigues F, Silvestre R, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep.* 2016 Dec;17(10):2562–71.
148. Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science (1979).* 2014 Sep 26;345(6204).
149. Chakraborty M, Chu K, Shrestha A, Revelo XS, Zhang X, Gold MJ, et al. Mechanical Stiffness Controls Dendritic Cell Metabolism and Function. *Cell Rep.* 2021 Jan;34(2):108609.
150. Choraghe RP, Kołodziej T, Buser A, Rajfur Z, Neumann AK. RHOA-mediated mechanical force generation through Dectin-1. *J Cell Sci.* 2020 Mar 1;133(5).
151. DeRosa G, Swick RW. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem.* 1975 Oct 25;250(20):7961–7.
152. Liu X, Cooper DE, Cluntun AA, Warmoes MO, Zhao S, Reid MA, et al. Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals. *Cell.* 2018;175(2):502-513.e13.
153. Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature.* 2011 Nov 20;481(7381):385–8.
154. Icard P, Lincet H. The reduced concentration of citrate in cancer cells: An indicator of cancer aggressiveness and a possible therapeutic target. *Drug Resist Updat.* 2016;29:47–53.

REFERENCIAS

155. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 2005 Oct;8(4):311–21.
156. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui T v, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1076–80.
157. Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of Succinate Dehydrogenase Activity by SIRT3 in Mammalian Mitochondria. *Biochemistry*. 2010 Jan 19;49(2):304–11.
158. Kendrick SFW, O'Boyle G, Mann J, Zeybel M, Palmer J, Jones DEJ, et al. Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology*. 2010 Jun;51(6):1988–97.
159. Fendt SM, Bell EL, Keibler MA, Olenchock BA, Mayers JR, Wasylenko TM, et al. Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat Commun*. 2013;4:2236.
160. Veliova M, Ferreira CM, Benador IY, Jones AE, Mahdavian K, Brownstein AJ, et al. Blocking mitochondrial pyruvate import in brown adipocytes induces energy wasting via lipid cycling. *EMBO Rep*. 2020;21(12):e49634.
161. Wang H, Lu J, Kulkarni S, Zhang W, Gorka JE, Mandel JA, et al. Metabolic and oncogenic adaptations to pyruvate dehydrogenase inactivation in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2019;294(14):5466–86.
162. Zhao S, Torres A, Henry RA, Trefely S, Wallace M, Lee J v, et al. ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch. *Cell Rep*. 2016;17(4):1037–52.
163. Balmer ML, Ma EH, Bantug GR, Grählert J, Pfister S, Glatter T, et al. Memory CD8 + T Cells Require Increased Concentrations of Acetate Induced by Stress for Optimal Function. *Immunity*. 2016 Jun;44(6):1312–24.
164. Infantino V, Iacobazzi V, Menga A, Avantiaggiati ML, Palmieri F. A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF α - and IFN γ -triggered inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1839(11):1217–25.
165. Infantino V, Iacobazzi V, Palmieri F, Menga A. ATP-citrate lyase is essential for macrophage inflammatory response. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Oct 11;440(1):105–11.
166. Kumar A, Cordes T, Thalacker-Mercer AE, Pajor AM, Murphy AN, Metallo CM. NaCT/SLC13A5 facilitates citrate import and metabolism under nutrient-limited conditions. *Cell Rep*. 2021;36(11):109701.
167. Kamphorst JJ, Chung MK, Fan J, Rabinowitz JD. Quantitative analysis of acetyl-CoA production in hypoxic cancer cells reveals substantial contribution from acetate. *Cancer Metab*. 2014 Dec 11;2(1):23.
168. Seegren P v, Downs TK, Stremaska ME, Harper LR, Cao R, Olson RJ, et al. Mitochondrial Ca²⁺ Signaling Is an Electrometabolic Switch to Fuel Phagosome Killing. *Cell Rep*. 2020;33(8):108411.

169. de Castro Fonseca M, Aguiar CJ, da Rocha Franco JA, Gingold RN, Leite MF. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Communication and Signaling*. 2016 Dec 12;14(1):3.
170. Koivunen P, Hirsilä M, Remes AM, Hassinen IE, Kivirikko KI, Myllyharju J. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J Biol Chem*. 2007 Feb 16;282(7):4524–32.
171. Pan Y, Mansfield KD, Bertozzi CC, Rudenko V, Chan DA, Giaccia AJ, et al. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*. 2007 Feb;27(3):912–25.
172. Bhandari T, Olson J, Johnson RS, Nizet V. HIF-1 α influences myeloid cell antigen presentation and response to subcutaneous OVA vaccination. *J Mol Med*. 2013 Oct 19;91(10):1199–205.
173. Chen X, Sunkel B, Wang M, Kang S, Wang T, Gnanaprakasam JNR, et al. Succinate dehydrogenase/complex II is critical for metabolic and epigenetic regulation of T cell proliferation and inflammation. *Sci Immunol*. 2022 Apr 29;7(70).
174. Zhang Z, Tan M, Xie Z, Dai L, Chen Y, Zhao Y. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat Chem Biol*. 2011 Jan;7(1):58–63.
175. Park J, Chen Y, Tishkoff DX, Peng C, Tan M, Dai L, et al. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell*. 2013 Jun 27;50(6):919–30.
176. Bowman CE, Rodriguez S, Selen Alpergin ES, Acoba MG, Zhao L, Hartung T, et al. The Mammalian Malonyl-CoA Synthetase ACSF3 Is Required for Mitochondrial Protein Malonylation and Metabolic Efficiency. *Cell Chem Biol*. 2017 Jun;24(6):673-684.e4.
177. Verberk SGS, de Goede KE, Gorki FS, van Dierendonck XAMH, Argüello RJ, van den Bossche J. An integrated toolbox to profile macrophage immunometabolism. *Cell reports methods*. 2022 Apr 25;2(4):100192.
178. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell*. 2018 May;173(4):822–37.

Durante la realización de la tesis he participado en diferentes proyectos de investigación que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Mancebo, C., Fernández, J.J., Herrero-Sánchez, C., Alvarez, Y., Alonso, S., Sandoval, T.A., Cubillos-Ruiz, J. R., Montero, O., Fernández, N., & Crespo, M. S. (2022). Fungal Patterns Induce Cytokine Expression through Fluxes of Metabolic Intermediates That Support Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 208(12), 2779–2794.

Márquez, S., Fernández, J. J., **Mancebo, C.**, Herrero-Sánchez, C., Alonso, S., Sandoval, T. A., Rodríguez Prados, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Montero, O., Fernández, N., & Sánchez Crespo, M. (2019). Tricarboxylic Acid Cycle Activity and Remodeling of Glycerophosphocholine Lipids Support Cytokine Induction in Response to Fungal Patterns. *Cell reports*, 27(2), 525–536.e4.