

Universidad de Valladolid

---

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica, Biología  
Molecular y Fisiología

La respuesta a patrones fúngicos por las células  
dendríticas: Biosíntesis de mediadores lipídicos,  
cambios en la expresión génica y formación de  
exosomas

---

Memoria del Trabajo de fin de Máster

Teodor Emilov Mentov

Tutores: Mariano Sánchez Crespo y Nieves Fernández

VºBº Tutores

## Abreviaturas:

PBS – Solución salina tamponada con fosfato  
HBS - Solución salina tamponada con HEPES  
BSA - Bovine serum albumin.  
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium  
GM-CSF- Granulocyte monocyte colony stimulating factor.  
IL-4- Interleukin 4  
LO- Lipooxigenasa  
PAF- Platelet-activating factor  
UPLC – Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography  
LPCAT2 - lysophosphatidylcholine acyltransferase 2  
CD – células dendríticas  
CoA – Coenzima A  
Gapdh - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
SOCS - Suppressor of cytokine signaling  
HLA- human leucocyte antigen  
DEX- dendritic cell derived exosomes  
COX – Cyclooxygenase  
cPLA2 – Cytosolic phospholipase A2  
X-CHIP –Crosslinked Chromatine Immunoprecipitation  
ATF2 - Activating Transcription factor 2  
Syk – Spleen tyrosine kinase  
LPS – Lipopolisacarido  
LTA – ácido lipoteicoico  
PAMP – pathogen-associated molecular patterns  
DAMP - damage associated molecular pattern  
CRD - cysteine-rich domain  
ITAM - Immunoreceptor tyrosine-based activation motif  
PLC - Fosfolipasa C  
CARD9 - Caspase recruitment domain-containing protein 9  
Bcl10 - B-cell lymphoma/leukemia 10  
Malt1 - Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1  
NFκB - nuclear factor κ-light-chain enhancer of activated B cells  
IκBα- nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer

## Introducción

Los seres vivos son producto de la evolución por selección natural<sup>1</sup>. Durante este proceso han desarrollado adaptaciones que les permiten protegerse de la agresión. Los organismos pluricelulares complejos, tanto animales como plantas, disponen de un sistema de defensa contra patógenos que incluye dos tipos de sistema inmunitario: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. La inmunidad innata incluye defensas de tipo barrera como piel y mucosas, y células de varias estirpes, mieloide como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, y linfoide como células NK y linfocitos T  $\gamma\delta$ . La Tabla 1 resume sus características más definitorias según Janeway y Medzhitov<sup>16</sup>.

Tabla 1 Comparación del sistema inmune innato y adaptativo según Janeway y Medzhitov

Propiedad	Sistema inmune innato	Sistema inmune adaptativo
Receptores	Fijos, Reordenamientos innecesarios	Codificados por segmentos génicos Necesario el reordenamiento
Distribución	No clonal, Todas las células son de la misma clase	Clonal, células de la misma clase distintas
Reconocimiento	Patrones moleculares conservados (LPS, LTA, mananos, glicanos)	Detalles de estructura molecular
Discriminación entre propio y ajeno	Perfecta	Imperfecta
Tiempo de acción	Inmediata	Retardada
Respuesta	Respuesta coestimuladora, Citoquinas (IL-1 beta, IL-6) Quemocinas IL-8	Expansión clonal o anergia IL-2

Uno de los tipos de células del sistema inmunitario, las células dendríticas, desempeñan una función predominante en la inmunovigilancia, detección de patógenos y polarización de la respuesta inmune hacia un tipo de respuesta adaptada a la naturaleza del patógeno detectado. Fueron descritas por primera vez por Langerhans a finales del siglo XIX en cortes histológicos de piel teñidos con cloruro de oro y por esta razón recibieron el epónimo de células de Langerhans. En los años 70, Steinman y Cohn las describieron en cultivos de células de bazo y ganglios linfáticos<sup>17</sup> y posteriormente se demostró su función central en el desencadenamiento de la respuesta inmune innata y de la adaptativa<sup>18</sup>, siendo claves en la explicación del fenómeno denominado por Janeway como “el pequeño sucio secreto de los inmunólogos”, que se refiere a la observación de que el antígeno purificado no es suficiente para inducir la formación de anticuerpos y el desarrollo de inmunidad protectora, siendo necesario combinarlo con

otras sustancias como hidróxido de aluminio, aceite mineral o sustancias bacterianas que intensifican su reconocimiento por células del sistema inmune innato<sup>19</sup>. La base biológica de este fenómeno es la existencia de receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y receptores de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Hasta la fecha se han descubierto receptores para muchas clases de biomoléculas: ácidos grasos como los que se encuentran en el lípido A del LPS (TLR4 detecta LPS), glúcidos (dectin-1 receptor de  $\beta$ -glucanos y dectin-2 de  $\alpha$ -mananos, sustancias abundantes en la pared celular fúngica de especies patógenas con *Candida* sp. y *Aspergillus* sp.) y ácidos nucleicos (varios TLR). Los diferentes clases de patógenos expresan distintos patrones moleculares y son reconocidos por diferentes receptores, que generan cascadas de señalización, en algunos casos compartidas por los distintos ligandos, pero que en algunos casos son diferenciadas. El resultado del proceso es un cambio fenotípico dependiente del patrón de expresión génica de la célula estimulada, que conduce a la producción de mediadores inflamatorios.

Por ejemplo Dectin-1, tras reconocer  $\beta$ -glucanos con su dominio CRD (carbohydrate recognizing domain), se fosforila en el dominio ITAM y recluta Src y Syk quinasa, que a su vez activan el complejo CARD9-Bcl10-Malt1 y a través de la activación de la PLC $\gamma$ , liberan diacilglicerol y activan la proteína quinasa C. El complejo proteico del CARD9 activa NF $\kappa$ B mediante la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ . NF $\kappa$ B es un factor de transcripción casi universalmente implicado en la regulación de genes con función en el sistema inmune. Uno de ellos es *IL23A*. Se trata de gen cuyo producto la subunidad  $\alpha$  de la interleucina-23 que unida a la cadena IL-12 p40 forma la IL-23. Esta es una interleucina proinflamatoria con un papel predominante, aunque no exclusivo, en la respuesta frente a la infección fúngica<sup>27</sup>. La subpoblación de linfocitos T sobre los que actúa son los Th-17. Su papel patogénico se ha destacado recientemente por su implicación en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria en enfermedades autoinmunes como la psoriasis, esclerosis múltiple y artritis reumatoide<sup>28</sup>. Se trata de un grupo de enfermedades crónicas de etiología desconocida y que en la actualidad se tratan con fármacos que causan efectos secundarios graves. La carga social es notable. En Estados Unidos son la segunda causa más frecuente de enfermedad crónica después de las enfermedades cardiovasculares y la primera causa de morbilidad en mujeres<sup>29</sup>. Estos hechos hacen que la investigación sobre la IL-23 sea muy activa.

## **Materiales y métodos.**

### **Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos:**

Las células se obtuvieron de concentrados leucocitarios (*buffy coat*) proporcionados por el Centro de Hemoterapia de Castilla y León. Para ello se separan los monocitos en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Las células se centrifugan sobre Ficoll a 1900 r.p.m. durante 30 min sin freno. Entre la fase de Ficoll y la mezcla de plasma con PBS se obtiene el concentrado linfomonocitario en forma de anillo. Posteriormente se realiza una centrifugación sobre OPTIPREP™ y Ficoll, que permite la formación de dos anillos opacos. El superior contiene predominantemente la fracción monocitaria y el inferior la linfocitaria. Se recoge mediante pipeta Pasteur estéril el anillo superior, se lava en PBS y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min, con freno. El pellet obtenido se vuelve a tratar en las mismas condiciones y tras un nuevo lavado en PBS se procede a hacer el recuento celular y a distribuir las células en medio de cultivo compuesto por RPMI 1640, 10% FBS inactivado, 1% glutamina, con 1%

penicilina/estreptomicina y a su distribución en placas de Petri. Las células se incuban durante 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa y tras ese periodo se procede a eliminar las células no adheridas y a cambiar el medio. A continuación se añaden las citoquinas IL-4 (500 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) con el propósito de iniciar la diferenciación de los monocitos a células dendríticas. Se incuban durante 72 h, tras las cuales se decanta el medio de cultivo, se sustituye por medio fresco con citoquinas y se mantiene la diferenciación durante otras 48 h.

### **Inmunodetección de proteínas**

Se siguió el protocolo descrito previamente<sup>25</sup>. Las células dendríticas se lavaron con PBS frío y se suspendieron en tampón de lisis (20mM Hepes, 10mM EGTA, 40 mM β-glicerofosfato, 2.5 MgCl, 2 mM de ortovanadato, 1mM DTT, 1% de NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1mg/ml leupeptina, 5 mg/ml aprotinina, 0.1 M PMSF, 1 M NaF, 0.1 PNPP, 0.1 M DTT ). Las células adheridas se lavaron dos veces con PBS frío y se rasparon en presencia de tampón de lisis TNE (40mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Nonidet P-40) suplementado con los inhibidores de proteasas antes descritos. Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 10.000 x g, para obtener el sobrenadante. La concentración de proteínas se midió por el método Bradford (1976), utilizando para ello un espectrofotómetro y realizando la lectura a 595 nm. A continuación se añadió tampón de Laemmli 5X (60 mM Tris, 10% glicerol (v/v), 2% SDS (p/v), 0.002% azul de bromofenol a pH 6.8) a las muestras y se hirvieron durante 5 min.

### **Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot**

Se siguió el procedimiento descrito por Laemmli (1970). El tampón de electroforesis consistió en 25 mM Tris, 0.2 M glicina, 1% SDS (p/v). El contenido de poliacrilamida de los geles fue del 10%. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron " Low range" y "Kalidoscope" de Bio-Rad

### **Extracción de Exosomas**

El medio de cultivo de células dendríticas inducidas se centrifugó a 3000 x g durante 10 min y el sobrenadante se centrifugó a 110 000 x g durante 1 hora. El pellet resultante se utilizó para electroforesis.

### **PCR cuantitativa**

El RNA se extrajo por el método del TRIzol/chloroformo y su concentración se determinó con el equipo de espectrometría Nanodrop. La reacción de la polimerasa en tiempo se realizó utilizando SYBR Green en equipo Light Cyler 480.

### **Ensayo de Acetil-CoA**

A los lisados celulares se añadió reactivo de Ellman, 1 mg/ml y 5 UI de citrato sintasa recombinante a pH 8.1. Con lector de placas ELISA se midió la densidad óptica inicial a 412 nm y a los 5 minutos tras adición de 10 µl de ácido oxalacético 10 mM.

### **Inmunoprecipitación de cromatina**

Se utilizaron anticuerpos anti P-ATF2 (Thr71 Cell Signaling). Tras breve lavado con PBS, las células se fijaron con 1% formaldehído. La reacción de *Cross-linking* se terminó con 0.125 M de glicina. Los extractos nucleares crudos se separaron mediante centrifugación y se resuspendieron en buffer con alto

salino. Se sónico la cromatina con equipo Bioruptor Diagenode (Liege , Belgica) y se realizó *preclearing* utilizando proteina A/G PLUS-Agarosa durante 30 minutos a 4°C en rotación continua. El anticuerpo se añadió para su incubación durante la noche a 4°C. Posteriormente se añadieron las microesferas de Proteina A/G PLUS-Agarosa durante 4 h. Se centrifugó a 12 000 x g para precipitar las microesferas que contienen los inmunocomplejos. La reversión del *cross-linking* se hizo calentando a 67°C. El DNA se extrajo por metodo de fenol/cloroformo/isoalcohol. Un anticuerpo no relevante y la secuencia del promotor de *IL12A* se utilizaron como controlar de especificidad.

### **Ensayo de mediadores lipídicos por UPLC y espectroscopia de masas cuadrupolo tiempo-de-vuelo ionización por electrospray.**

Los lípidos se extrajeron mediante columnas de extracción de lípidos C-18, se eluyeron con metanol y se evaporaron a sequedad en atmósfera de nitrógeno. El residuo se solubilizó en 40 µl de solvente A (8.3 mM de ácido acético tamponado a pH 5.7 con hidróxido de amonio) mas 20 µl de solvente B (acetonitrilo/metanol 65:35 v/v ). Aliquotas de 7.5 µl de cada muestra se inyectaron en el sistema cromatográfico Acquity™ UPLC System. El metodo de extracción de Bligh and Dyer se utilizó para la extracción de PAF.

### **Analisis estadístico.**

Los datos se representan como media ± error estándar de la media. Se analizados con el programa estadístico Prism 4.0 (GraphPad Software). Comparación entre dos grupos experimentales se llevó a cabo utilizando la prueba *t* de Student. Cuando las variables eran nominales se utilizó ANOVA de 2 vías. Las diferencias se consideraban significativas si  $p < 0.05$ .

### **Objetivos:**

Caracterizar mecanisticamente las vías de señalización celular implicadas en la regulación transcripcional de la producción de IL-23 en respuesta a patrones moleculares fúngicos.

Analizar la expresión de enzimas que controlan pasos límite en la síntesis de mediadores lipídicos en los exosomas derivados de células dendríticas.

## **Resultados**

### **Los receptors Dectin-1 y Dectin-2 están implicados en la producción de IL-23.**

Para estudiar la implicación de los receptores Dectin-1 y Dectin-2 se estimularon las células dendríticas con Zymosan a la concentración de 1 mg/ml en presencia y en ausencia de anticuerpos bloqueantes de los receptores anti-dectin 1 y anti-dectin 2. Como control negativo se utilizó un anticuerpo anti-CD11b. Se observa mediante PCR cuantitativa que la transcripción del mRNA de *IL23A* disminuye de manera estadísticamente significativa en células tratadas por separado con anticuerpos anti-dectin-1, anti-dectin-2 y la combinación conjunta de ambos (Fig. 1A). Este hallazgo sugiere la participación de la

cascada de señalización iniciada por la activación de de Dectin-1 y Dectin-2. Con este propósito se utilizaron piceatanol (inhibidor de SYK quinasas), el inhibidor de la cPLA<sub>2</sub> pirrolidina-1, zileuton (inhibidor de la 5-Lipooxigenasa ) y EDC (inhibidor de 12/15 Lipooxigenasa). Se observaron disminuciones significativas de la transcripción del mRNA de *IL23A* con pirrolidona y zileuton como se muestra en la Fig. 1. El piceatanol produjo el efecto más intenso. A la vista del efecto del zileuton se ensayaron antagonistas de los productos de la 5-LO y PAF. Montelukast (antagonista del receptor de cisteinilleucotrienos 1 (CysLT1) y U75302, antagonista del receptor del leucotrieno B<sub>4</sub> (BLT1). Se observaron decrementos significativos en presencia de la combinación de U75302 y Montelukast, en presencia de WEB2086 (antagonista del receptor del PAF) y en presencia de la totalidad de los antagonistas (Fig. 1).

Figura 1

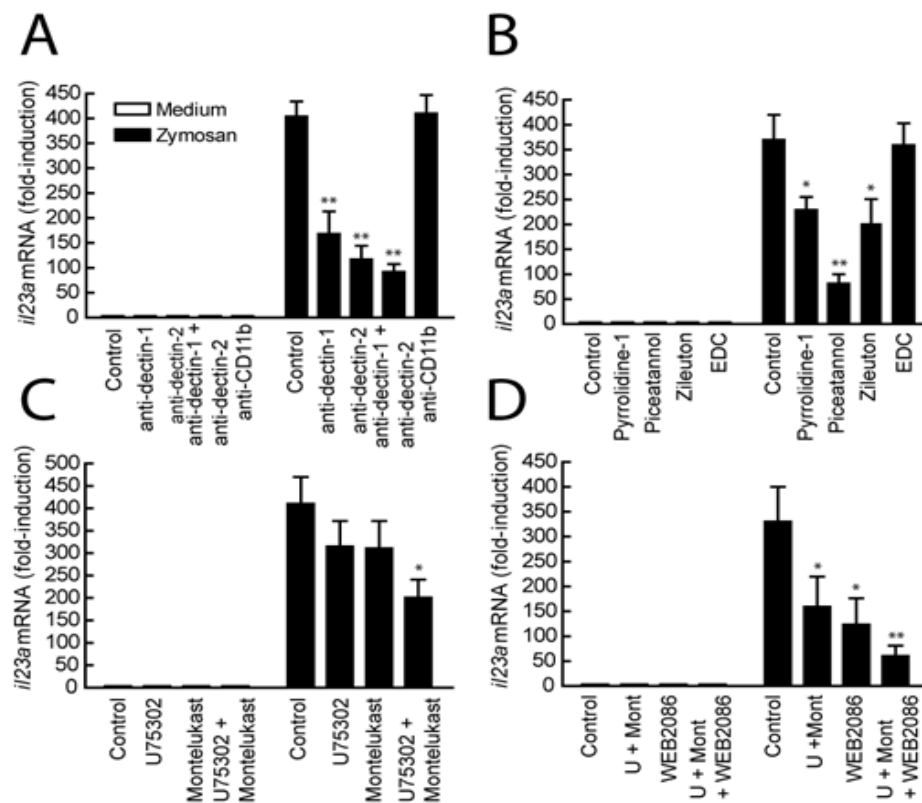


Figura 1. Efecto de diferentes antagonistas de receptores sobre la transcripción de *IL23A* tras la estimulación con Zymosan 1mg/ml durante cuatro horas. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

Dado que se ha demostrado que la unión de factor de transcripción ATF2, que se activa por fosforilación en treonina 71, se asocia al aumento de la transcripción de *IL23A* se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpo fosfoespecifico anti-P-71Thr-ATF2. Esta técnica utiliza anticuerpos frente a los factores de transcripción y requiere varios pasos que incluyen la fijación de las proteínas, la sonicación de DNA y la extracción del fragmento de DNA unido al factor de transcripción. De esa forma se consigue cuantificar la unión de la proteína estudiada al DNA midiendo el enriquecimiento relativo de la secuencia de unión por PCR. En este procedimiento, el aumento en la detección de la secuencia implica el enriquecimiento relativo de la cantidad de factor de transcripción unido al DNA. Se observó que piceatanol, zileuton, U75302 combinado con montelukast y WEB2086 produjeron disminuciones significativas de la unión del ATF2 al promotor. La estimulación simultánea con LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> y PAF consiguió aumentar significativamente la unión de ATF2 al promotor, pero de una manera menos potente que zymosan. Estos resultados son consistentes con la activación de cascada de señalización Dectin-1 y Dectin-2, SYK, cPLA<sub>2</sub>, 5-LO, leucotrienos y PAF, y sugieren la participación de una ruta autocrina/paracrina que incluye estos componentes en la transcripción de *IL23A*.

Figura 2

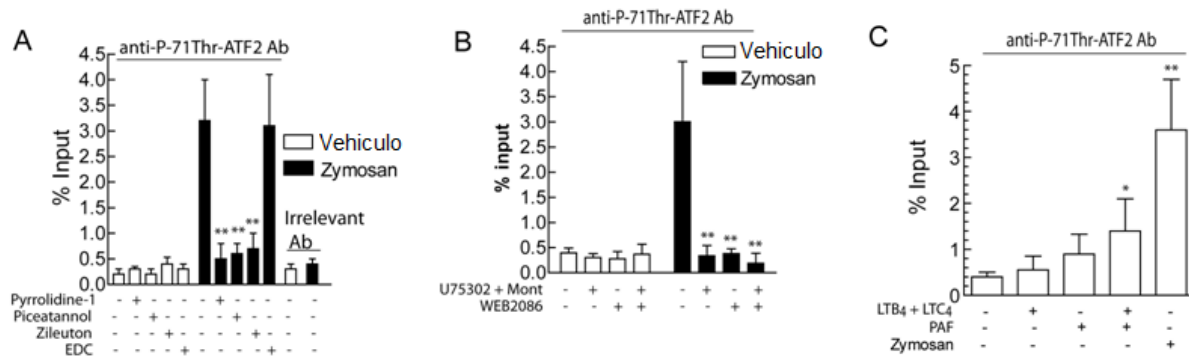


Figura 2. Resultados de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo anti-P71Thr-ATF2 al promotor de *IL23A*.

### Analisis de los eicosanoides generados en respuesta al zymosan

La producción de mediadores lipídicos se investigó mediante espectrometría de masas acoplada a UPLC. Se observó gran aumento de la liberación de ácido araquidónico al medio de cultivo (Fig. 3A) tras la incubación con Zymosan, seguida de una disminución a niveles incluso menores que los existentes previamente a la estimulación a las 24 h. Un efecto similar se observó en los niveles de LTB<sub>4</sub> (Fig. 3B). Sin embargo, los niveles de PGE<sub>2</sub>, el prostanoide más abundante y de efecto predominantemente inmunomodulador por su participación en la secreción de IL-10<sup>2</sup> aumentaron a lo largo del tiempo.



Figura 3

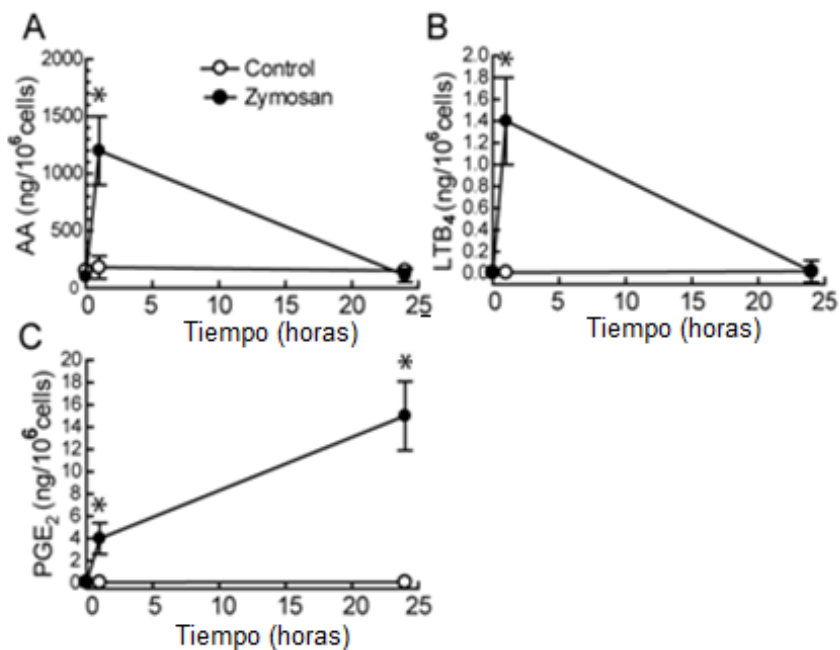


Figura 3. Cuantificación por espectrometría de masas acoplada a UPLC de ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Se cuantificaron extractos lipídicos cada 5 horas hasta las 25 h. \*p<0,05

## Producción de PAF por las células dendríticas

El factor activador de plaquetas (Platelet-activating factor, 1-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina) es un fosfolípido compuesto por un esqueleto de glicerol, un alcohol graso (predominantemente de 16 o 18 átomos de carbono) en posición *sn*-1, un grupo acetilo en *sn*-2 y en posición 3 un grupo de fosfocolina. *sn* es numeración estereoespecífica propuesta por Hirschmann en 1960<sup>3</sup>. El PAF posee un potente efecto proinflamatorio y se sintetiza por una variedad de células que incluye neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y células dendríticas. Su biosíntesis comienza con la hidrólisis de ácido araquidónico en posición *sn*-2 en un fosfolípido presente en las membranas, 1-alkil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, por la enzima cPLA<sub>2</sub>. Ello da lugar a la producción de su precursor el liso-PAF. La acetilación se produce por la enzima lisofosfatidilcolina aciltransferasa 2 (LPCAT2), que pertenece a una familia de enzimas que también intervienen en la biosíntesis de lípidos estructurales de

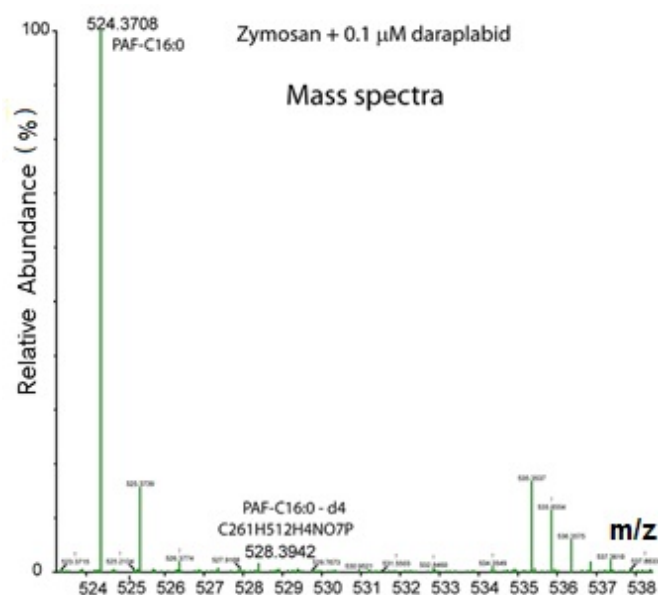
membrana<sup>5</sup>, siendo la fosforilación en el residuo Ser34 una modificación posttraducciona activadora<sup>4</sup>. Dada la previa detección de liberación de ácido araquidónico, la formación de PAF era una posibilidad a investigar. Dado que el suero bovino fetal y las células dendríticas contienen acetilhidrolasas<sup>6</sup>, se utilizó un inhibidor de esta actividad, darapladib a la concentración 0.1 µM. Se obtuvieron los resultados resumidos en la Tabla 2. Se observó una producción basal de PAF C16 que se incrementó, aproximadamente, 5 veces tras la estimulación con zymosan 1mg/ml. La cuantificación de PAF y lyso-PAF se hizo con espectrometría de masas acoplada a UPLC. La extracción lipídica se hizo según el método de Bligh and Dyer<sup>7</sup>. En un experimento típico se muestra la producción de PAF C16 después de una hora de estimulación con Zymosan (Fig 3).

**Tabla 2. Producción de PAF, lisofosfatidilcolinas (LPC) y liso-PAF por células dendríticas**

	Control	Zymosan
PAF C16:0 (ng/10 <sup>6</sup> DC)	16 ±12	89 ± 25
PAF C18:0 (ng/10 <sup>6</sup> DC)	0.046	0.14
LPC C16:0 (ng/10 <sup>6</sup> DC)	N.D.*	126 ± 36
LPC C18:1 (ng/10 <sup>6</sup> DC)	N.D.	98 ± 28
LPC C20:4 (ng/10 <sup>6</sup> DC)	N.D.	53 ± 16

Las células dendríticas se incubaron durante 1 hora con 1 mg/ml de zymosan y el extracto lipídico se analizó mediante UPLC. Resultado de 3 experimentos diferentes.\*N.D., no detectado

**Figura 3. Espectrometría de masas de un experimento con Zymosan**

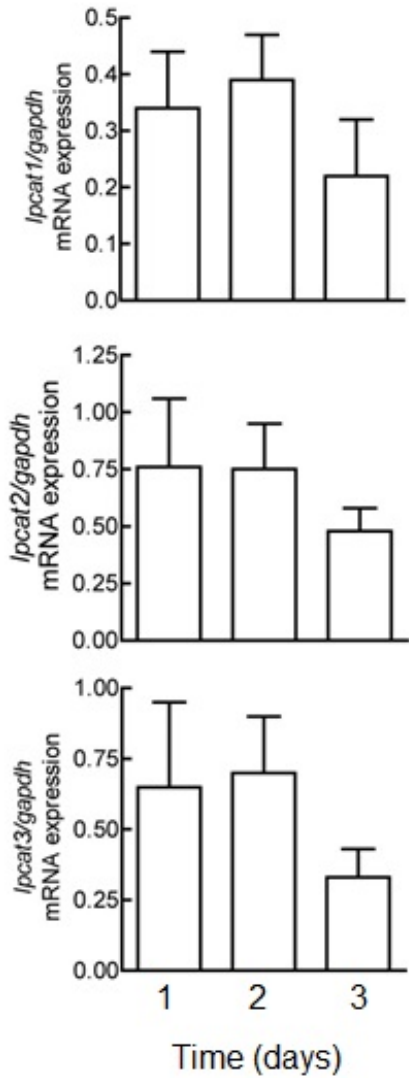


Análisis de Espectrometría de masas de un experimento típico con Zymosan y 0.1 µM darapladib. Se detectó PAF C16:0 a m/z=524,37. El pico en m/z=528,39 corresponde a PAF C16 deuterado exógeno utilizado como patrón.

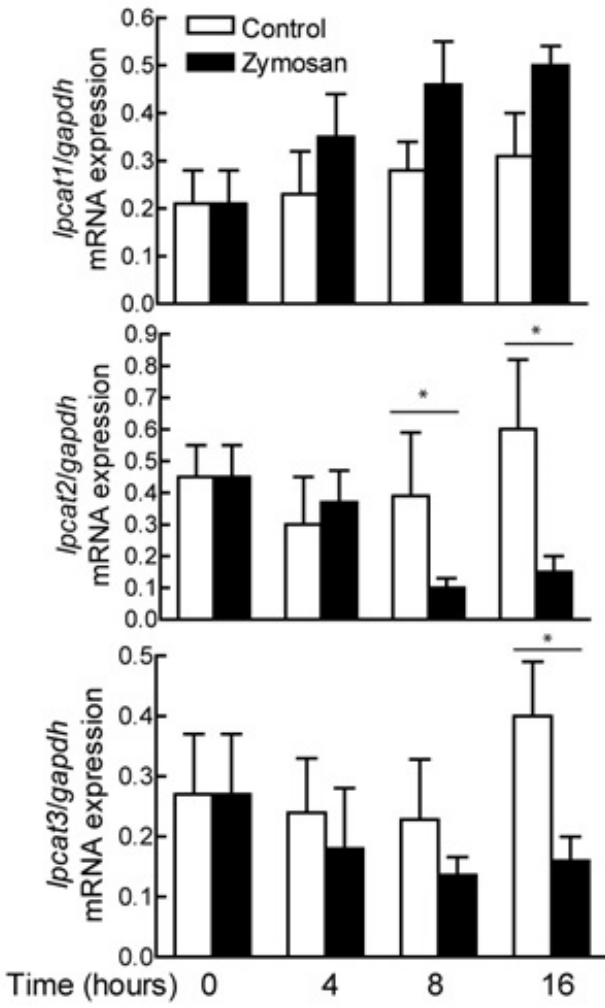
La investigación de la expresión de las lisofosfatidilcolina aciltransferasas se abordó con la determinación de la expresión relativa de sus mRNA mediante RT-PCR con los primers indicados en la Tabla 1. Se analizó la expresión de LPCAT1, LPCAT2, LPCAT3 tras la diferenciación durante 3 días en condiciones basales (Fig. 4A) y tras la estimulación con Zymosan durante 6 horas (Fig. 4B). Se observó una aparente disminución de la expresión en condiciones basales de las 3 enzimas a los 3 días, que no fue estadísticamente significativa. Los valores se normalizaron con relación a la expresión de *GAPDH*, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, una enzima constitutiva que se considera invariable durante las condiciones experimentales. En los experimentos de estimulación con Zymosan, los mRNA de *LPCAT2* y *LPCAT3* mostraron una disminución significativa a las 8 y 16 h, y la *LPCAT3* a las 16h. El otro sustrato de las lisofosfatidilcolina aciltransferasas, el acetil-CoA se analizó mediante ensayo enzimático (Fig. 4C). Se observaron niveles estables en condiciones control y ampliamente variables en presencia de Zymosan 1 mg/ml. Con disminuciones significativas a 1 y 6 h y aumento a las 3 h. Probablemente relacionados con requerimientos metabólicos de la célula causados por el esfuerzo energético requerido para la fagocitosis y digestión de las partículas de zymosan.

Figura 4

A



B



C

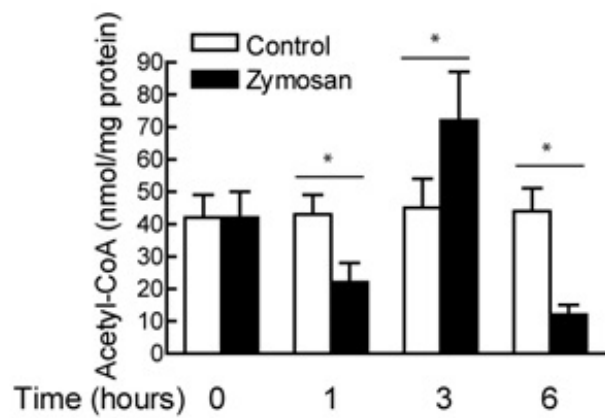


Figura 4. Inducción del mRNA de *LPCAT1*, *LPCAT2* y *LPCAT3* y medida enzimática de acetil-CoA. Los monocitos cultivados durante los días indicados en presencia de GM-CSF y IL-4 (A) o en el día 5 en presencia y ausencia de zymosan (B). La medida de acetil-CoA se muestra en (C). La expresión de mRNA se expresa en forma de razón frente a *GADPH* ( $2^{-\Delta Ct}$ ). Las barras representan media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos para los ensayos de mRNA y de 4 experimentos independientes en caso del ensayo enzimático del acetil-CoA. \*p < 0.05.

### **Producción de exosomas por las células dendríticas.**

El término exosoma se aplica a complejos multiproteicos que pueden incluir otros componentes y a vesículas de membrana de diámetro alrededor de 30 nm (del orden de magnitud de las LDL<sup>8</sup>) secretadas por diversos tipos celulares, incluyendo células dendríticas, y que se pueden detectar en células de la mayoría de los tejidos<sup>9</sup>. Este es un campo de investigación activa con potencial implicación en la creación de un microambiente neoplásico<sup>10</sup> y su utilización en inmunoterapia antineoplásica<sup>11</sup>. Debido a su estructura encapsulada se ha investigado la posibilidad de que funcionen como vehículo de transporte de fosfolipasas activables y prostaglandinas<sup>12</sup>. Se ha demostrado su implicación en presentación antigénica por expresar, en el caso de exosomas derivadas de células dendríticas (DEX), elementos del complejo HLA-II. Se ha detectado el transporte de microRNA<sup>13</sup> e incluso su papel como mecanismo de transporte entre macrófagos y células epiteliales de proteínas implicadas en cascadas de señalización en el sistema inmune como las proteínas SOCS<sup>14</sup>. Sin embargo, en el caso de DEX humanas el conocimiento es más limitado. Previamente se detectaron exosomas en líneas celulares murinas mediante espectrometría de masas múltiples enzimas como la COX2<sup>12</sup> y prostaglandinas. Por este motivo estudiamos la presencia de enzimas de la ruta biosintética de eicosanoides como la cPLA<sub>2</sub>, la 5-lipooxigenasa y COX2 mediante inmunodetección en membrana de nitrocelulosa utilizando la técnica de SDS-PAGE. En la Fig. 5 se muestran los resultados.

Figura 5

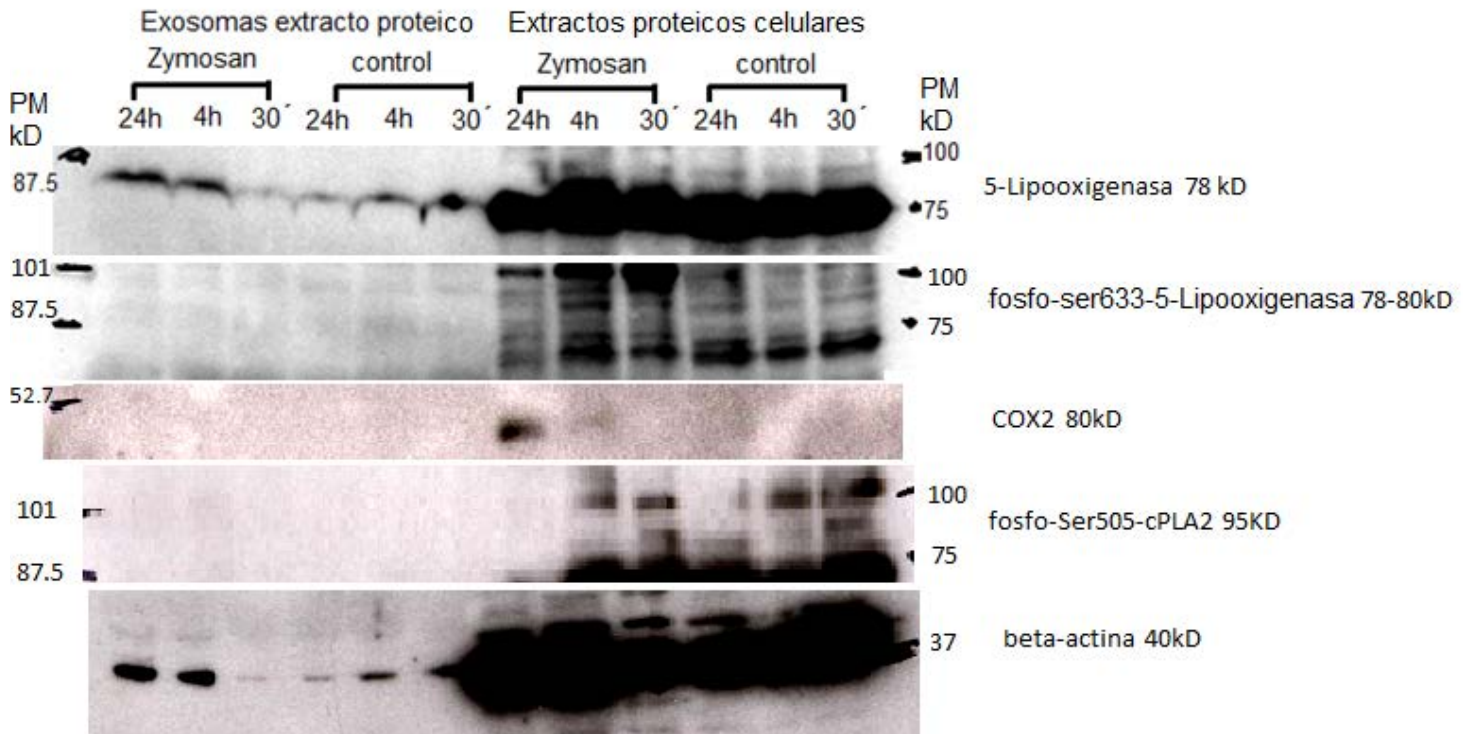


Figura 5. Inmunodetección de varias enzimas de rutas sintéticas de mediadores lipídicos y  $\beta$ -actina en exosomas obtenidos a 30 minutos, 4 y 24 horas en condiciones control y tras estimulación con Zymosan 1mg/ml. Las fosforilaciones estudiadas se asocian con aumento de actividad.

Se observa la presencia de 5-lipoxygenasa en los exosomas y su aumento tras la estimulación con Zymosan a las 4 y 24 h. Sin embargo, no se observó expresión de la forma activa fosforilada en el residuo Ser633, encontrándose multitud de bandas inespecíficas de diferentes tamaños en el rango de peso molecular esperado, lo que no se observó en los extractos celulares. Un fenómeno parecido ocurrió con la P-Ser505-cPLA<sub>2</sub>. Su forma no fosforilada, tampoco se observó en los extractos proteicos exosómicos, aunque sí en los extractos celulares (datos no mostrados). La COX2 se detectó en los extractos celulares de células estimuladas con Zymosan a las 24 h y débilmente a las 4 h. A pesar de que su movilidad electroforética es de alrededor de 50 kD, significativamente menor que la teóricamente

esperada de 80 kD, consideramos válida la detección por la especificidad de las bandas y patrón de expresión temporal concordante con experimentos previos. No se detectó su expresión en exosomas. La  $\beta$ -actina, una proteína del citoesqueleto frecuentemente utilizada como marcador de carga proteica, se observó en niveles similares a los detectados en los extractos celulares. Los niveles en los exosomas son mayores a 4 y 24 h. Aunque la imagen de la Fig. 5 muestra sobreexposición por estar forzada con el fin de detectar los niveles exosómicos, con menor exposición no se observaron diferencias significativas en los 6 extractos celulares. Estos datos pueden interpretarse como indicativos de un proceso de alteración cualitativa de la producción de micropartículas tras la estimulación con Zymosan en las células dendríticas, pero que parece no relacionarse con el transporte de enzimas del metabolismo de eicosanoides .

## Discusión

Estudios previos habían demostrado la capacidad del Zymosan para inducir la producción de IL-23 y habían identificado el papel de la secreción autocrina de mediadores lipídicos en la fijación del fenotipo productor de citoquinas de las células dendríticas. Sin embargo, existen diferencias notables por el empleo de distintos modelos experimentales como células peritoneales murinas<sup>20</sup> o diversas líneas celulares murinas y humanas. La extrapolación al humano no es siempre unívoca, observándose frecuentemente incongruencias y procesos específicos de especie.

Los resultados obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación demuestran la dependencia de la expresión de *IL23A* a la expresión de ATF2. También encontramos una rápida producción de leucotrienos y PAF en respuesta a Zymosan.

Tras el análisis de la ruta observamos la intervención de receptores de  $\alpha$ -glucano y  $\beta$ -mannano así como la importante contribución de SYK quinasa que es reclutada por los motivos ITAM de Dectin 1 y 2. Los tratamientos farmacológicos mostraron diferente efectividad según su posición en la cascada señalizadora, siendo piceatanol, el inhibidor de la SYK quinasa mas efectivo en la inhibición de la síntesis de leucotrienos que en la liberación de ácido araquidónico (dato no mostrado).

Zymosan indujo una liberación masiva de ácido araquidónico, cuantitativamente mayor que la observada en otros tipos celulares<sup>21</sup> y que era solo modestamente procesado hacia la producción de sus metabolitos oxidados. Este hallazgo es un dato específico de células dendríticas que podría explicarse porque el zymosan al activar PKA podría causar una fosforilación en Ser523 de la 5-lipoxigenasa que es inhibitoria<sup>22</sup>. PKA también inactiva otra enzima cuyo sustrato es AA, LTC<sub>4</sub> sintasa<sup>23</sup>. El enriquecimiento de las membranas celulares con AA, dado que es un ácido graso poliinsaturado, aumenta la fluidez de las membranas celulares y disminuye los requerimientos energéticos de procesos de generación de curvatura. Tales procesos son importantes en un tipo celular cuya función es el muestreo constante de la composición del medio interno mediante la emisión de prolongaciones móviles.

Se detectó también la presencia de abundante AA en exosomas, lo que sugiere su posible utilización para la síntesis de mediadores lipídicos por otras células en contexto de foco inflamatorio, lo que sería un ejemplo más del posible metabolismo trans-celular del ácido araquidónico .

La observación del potente efecto del antagonista del receptor del PAF WEB2086 sobre la trans-activación de *IL23A* es un dato no descrito previamente. La caracterización de la especie molecular C16:0 está en concordancia con descripciones de la distribución de estas especies moleculares en células humanas<sup>24</sup>. Otro dato relevante es el papel de LPCAT2. Esta enzima puede utilizar 2 sustratos el acetil-CoA y araquidonil-CoA, lo que da lugar a funciones distintas. En el caso de la utilización de acetil-CoA, participaría en la formación de un mediador proinflamatorio. Por el contrario, la utilización de araquidonil-CoA conduce a la formación del precursor 1-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina, que además de ser el depósito de los precursores de mediadores lipídicos, juega un papel importante en el transporte y movilización de lípidos . Curiosamente, la fosforilación en la Ser34 aumenta la actividad con acetil-CoA frente al empleo de araquidonil-CoA. Los exosomas que hemos extraído probablemente tienen un cierto componente de microvesículas no formadas por un proceso activo y no parecen contener una presencia de enzimas que permita su caracterización como una fábrica de de mediadores lipídicos en el medio extracelular.

## Conclusiones

1. Las células dendríticas derivadas de monocitos humanos muestran una gran capacidad para liberar ácido araquidónico y producir mediadores lipídicos. Sólo una parte del araquidónico liberado se transforma en metabolitos oxigenados, por lo que podría ser utilizado en reacciones de reacilación en la célula productora o canalizado a un metabolismo *trans*-celular.
2. La síntesis de mediadores lipídicos, especialmente leucotrienos y PAF, es un importante fenómeno autocrino de retroalimentación positiva para la regulación transcripcional de la cadena p19 de la IL-23.
3. Las exosomas derivadas de células dendríticas no parecen disponer de una maquinaria enzimática suficiente para la biosíntesis de mediadores lipídicos.

## Bibliografía:

<sup>1</sup>Charles Darwin On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life 1859

<sup>2</sup>Rodríguez M, Domingo E, Municio C, et al. Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals. Mol Pharmacol. 2014;85(1):187-97.

<sup>3</sup>Hirschmann, H. The nature of substrate asymmetry in stereoselective reactions. J. Biol. Chem. 1960; 235, 2762-7.



- <sup>4</sup>R. Morimoto, H. Shindou, Y. Oda, T. Shimizu. Phosphorylation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 at Ser34 enhances platelet-activating factor production in endotoxin-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* 285, 29857-29862 (2010).
- <sup>5</sup>Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, et al. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6532-9.
- <sup>6</sup>S. M. Prescott, G. A. Zimmerman, D. M. Stafforini, T. M. McIntyre. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 419-445 (2000).
- <sup>7</sup>E. G. Bligh, W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917, 10.1139/o59-099
- <sup>8</sup>Van Antwerpen R, Gilkey JC. Cryo-electron microscopy reveals low density lipoprotein substructure. *J Lipid Res.* 1994;35:2223–2231.
- <sup>9</sup>Théry, C., M. Ostrowski, E. Segura. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2009: 581–593
- <sup>10</sup>Roma-rodrigues C, Fernandes AR, Baptista PV. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:179486.
- <sup>11</sup> Pitt JM, Charrier M, Viaud S, et al. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol.* 2014;193(3):1006-11.
- <sup>12</sup>Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2105-20.
- <sup>13</sup>Buck AH, Coakley G, Simbari F, et al. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun.* 2014;5:5488.
- <sup>14</sup> Bourdonnay E, Zastona Z, Penke LR, et al. Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. *J Exp Med.* 2015;212(5):729-42.
- <sup>15</sup>Théry C, Boussac M, Véron P, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 2001;166(12):7309-18.
- <sup>16</sup> Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
- <sup>17</sup> 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;137(5):1142-62.
- <sup>18</sup> Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.

- <sup>19</sup> Peter M. Gayed Toward a Modern Synthesis of Immunity: Charles A. Janeway Jr. and the Immunologist's Dirty Little Secret. *Yale J Biol Med.* 2011 Jun; 84(2): 131–138.
- <sup>20</sup> Suram S, Silveira LJ, Mahaffey S, et al. Cytosolic phospholipase A(2) $\alpha$  and eicosanoids regulate expression of genes in macrophages involved in host defense and inflammation. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e69002.
- <sup>22</sup> Luo M, Jones SM, Phare SM, Coffey MJ, Peters-golden M, Brock TG. Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41512-20.
- <sup>23</sup> Esser J, Gehrman U, Salvado MD, et al. Zymosan suppresses leukotriene C<sub>4</sub> synthase activity in differentiating monocytes: antagonism by aspirin and protein kinase inhibitors. *FASEB J.* 2011;25(4):1417-27.
- <sup>24</sup> Thyssen E, Turk J, Bohrer A, Stenson WF. Quantification of distinct molecular species of platelet activating factor in ulcerative colitis. *Lipids.* 1996;31 Suppl:S255-9.
- <sup>25</sup> Etzel B. Hugo Gil. El papel de las células dendríticas en la respuesta de patrones moleculares de la pared de hongos y sobrecarga de células apoptóticas. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid. 2013.
- <sup>26</sup> Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
- <sup>27</sup> Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000;13(5):715-25.
- <sup>28</sup> José Francisco Zambrano-Zaragoza, Enrique Jhonatan Romo-Martínez, Ma. de Jesús Durán-Avelar, Noemí García-Magallanes, Norberto Vibanco-Pérez (Aug 2014). "[Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases](#)". *Int J Inflamm.* doi:10.1155/2014/651503. PMC 4137509.
- <sup>29</sup> The Cost Burden of Autoimmune Disease. The Latest Front in the War on Healthcare Spending American Autoimmune Related Diseases Association (AARDA) . 2011

Tabla 3

Primers sense ( S) y antisense (AS) utilizados

*IL23A* S: 5'-CATGGGCCTTCATGCTATTT-3'

*IL23A* AS: 5'-TTT GCATTG TCAGGTTTCCA-3'

*LPCAT1* S: 5'-GCTGGCTTTCAAGATGTACG-3'

*LPCAT1* AS: 5'-TCAATGGCTCGGAATAGGTC-3'

*LPCAT2* S: 5'-TTGCTTCCAATTCGTGTCTTATT-3'

*LPCAT2* AS: 5'-ATCCATTGAAAAGAACATAGCA-3'

*LPCAT3* S: 5'-CAGGGAGAGCTGATTGACAT-3'

*LPCAT3* AS: 5'-CAGAAGGGGTGGTTGTCATA-3'