

**PAPEL DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE  
SUCCINATO DURANTE LA ESTIMULACIÓN DE LAS  
CÉLULAS DENDRÍTICAS POR PATRONES  
MOLECULARES ASOCIADOS A HONGOS**

---

**Ana Yolanda Rodríguez Torres**

**Tutores: Dr. Mariano Sánchez Crespo**

**Dra. M<sup>a</sup> Nieves Fernández García**

Valladolid, Septiembre 2018

---

# ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Inmunidad y Sistema Inmune.....	
1.2 Las células dendríticas.....	2
1.3 El inmunometabolismo.....	3
1.4 Reprogramación metabólica en células dendríticas.....	4
1.4.1 Metabolitos intracelulares en la reprogramación de las células dendríticas.....	4
1.4.2 El succinato como señal inflamatoria.....	5
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
1. Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos humanos.....	8
2. Condiciones experimentales.....	8
3. Análisis de la expresión génica.....	9
3.1 Extracción del RNA.....	9
3.2 Obtención del DNA complementario.....	9
3.3 Análisis mediante PCR a tiempo real.....	10
4. Análisis de los metabolitos intermediarios.....	11
4.1 Extracción de metabolitos.....	11
4.2 Análisis mediante UPLC-MS.....	11
5. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal láser de barrido.....	12
6. Citometría de flujo.....	12
7. Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS.....	14
1. Reprogramación aguda del metabolismo energético durante la estimulación de las células dendríticas y efecto sobre la producción de citocinas.....	14
2. Efecto de la suplementación de succinato sobre los niveles de los metabolitos intermediarios del TCA.....	17
3. Efecto de moduladores farmacológicos de succinato en la expresión de mRNA de citoquinas en DCs.....	18
4. Expresión del receptor SUCN1/GPR91.....	18
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	20
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23

---

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

---

- **ACLY**: ATP citrato liasa
- **APCs**: Células presentadoras de antígeno.
- **ATP**: adenosín trifosfato
- **DAG**: diacilglicerol
- **DAMPs**: Señales endógenas asociadas a daño tisular.
- **DAPI**: 4',6-diamino-2-fenilindol
- **DCA**: dicloroacetato
- **cDCs**: Células dendríticas convencionales
- **DCs**: Células dendríticas.
- **iDCs**: Células dendríticas inmaduras.
- **moDCs**: Células dendríticas derivadas de monocitos.
- **pDCs**: Células dendríticas plasmocitoides.
- **DEPC**: dietilpirocarbonato
- **DMM**: dimetil-malonato
- **DMS**: dimetil-succinato
- **EAAT1**: transportador de glutamato de alta afinidad 1 o transportador de aminoácidos excitatorios 1.
- **GABA**: ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- **GAPDH**: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- **GM-CSF**: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
- **HIF-1 $\alpha$** : subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
- **IL-1 $\beta$** : interleuquina-1 beta.
- **IL-10**: Interleuquina-10.
- **IL-23**: Interleuquina-23.
- **IP3**: trifosfato de inositol
- **MHC**: complejo mayor de histocompatibilidad
- **MQ**: milliQ
- **OXPHOS**: Fosforilación oxidativa.
- **PAMPs**: Patrones moleculares asociados a patógenos.
- **PDH**: Prolil-hidroxilasa
- **PIP2**: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
- **PRRs**: Receptores de reconocimiento de Patrones.
- **TCR**: receptor de linfocitos T
- **TCA**: Ciclo de los ácidos tricarbónicos o Ciclo de Krebs.
- **TLRs**: Receptores tipo Toll
- **TNF  $\alpha$** : factor de necrosis tumoral alfa
- **UPLC-MS**: Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry o cromatografía líquida de ultra-eficacia acoplada a espectrometría de masas.
- **SUCN1/GPR91**: Receptor de succinato

---

---

# INTRODUCCIÓN

---

## **1.1. Inmunidad y sistema immune**

La inmunidad, entendida como excepción de enfermedad, se describió por primera vez por el historiador griego Tucídides durante la epidemia de peste que azotó Atenas en el 430 A.C., para referirse a la resistencia a la reinfección que se observaba en los supervivientes.<sup>(1,2)</sup> En la actualidad, el concepto de inmunidad se define como la resistencia a la infección dependiente de la funcionalidad del sistema inmune, lo que incluye los mecanismos moleculares, celulares y tisulares encargados del mantenimiento de la integridad del organismo y la defensa frente a agresiones por patógenos y toxinas.

La generación de una respuesta inmunológica eficiente requiere una regulación rigurosa que impida los daños colaterales. Esta actividad reguladora evita la respuesta frente a antígenos propios y la respuesta excesiva a los patógenos que podría producir daño tisular, por lo que una correcta respuesta inmune debe combinar el reconocimiento de los agentes patógenos con la tolerancia frente a lo propio.<sup>(3)</sup>

Tradicionalmente se han descrito dentro del sistema inmunitario dos subsistemas, que funcionan de forma interconectada en la defensa del huésped ante los patógenos. El sistema immune adaptativo se organiza alrededor de dos clases de células especializadas, los linfocitos T y B, que exhiben un amplio repertorio de receptores de reconocimiento específico. Esto permite la especificidad del reconocimiento de patógenos y su eliminación selectiva. De esa forma, se produce una respuesta immune “a medida” y se crea una memoria inmunológica que protege de posibles reinfecciones. En contraste, la inmunidad innata se compone de efectores que proporcionan una respuesta inmediata y no específica a partir de elementos humorales y celulares. Estos últimos permiten la detección de los gérmenes invasores empleando un limitado número de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) que interaccionan con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y señales endógenas asociadas al daño tisular (DAMPs). Entre los PRR mejor caracterizados se encuentran los receptores de membrana tipo Toll (TLRs), que reconocen componentes de la pared bacteriana, proteínas virales y ácidos nucleicos, mientras que la familia de los receptores de lectina tipo-C (CLRs) es fundamental para el reconocimiento de patrones fúngicos.<sup>(4,5)</sup>

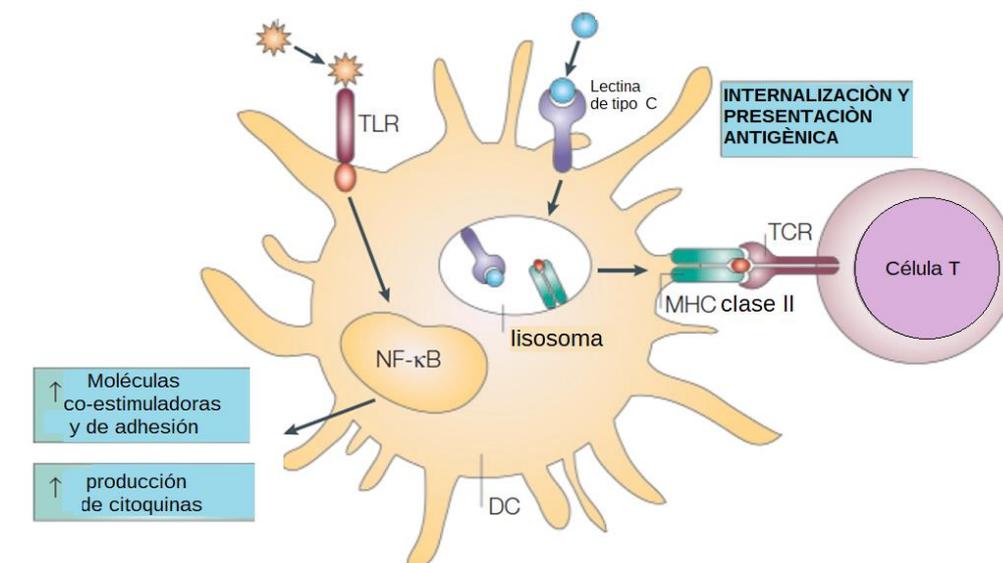
Los microorganismos presentan gran cantidad de PAMPs que por no encontrarse en los mamíferos, representan una diana ideal para el reconocimiento de lo “infeccioso no propio”.<sup>(3)</sup> Los PAMPs son

estructuralmente diversos y entre ellos se encuentran: el lipopolisacárido bacteriano, los ácidos teicoicos, el DNA bacteriano y los glucanos y mananos de la pared fúngica, de los cuales el zymosán es el estímulo arquetípico. El zymosán es una preparación insoluble y particulada de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que se ha utilizado desde hace más de 50 años como modelo de para el estudio de la respuesta celular frente a patrones fúngicos y la activación del sistema del complemento por la vía alternativa. Se compone principalmente de  $\beta(1-3)$  y  $\beta(1-6)$  glucanos y  $\alpha$ -mananos, además de cantidades menores de quitina, proteínas y lípidos. Se reconoce principalmente por TLR2 y las dectinas 1 y 2.<sup>(6)</sup>

## 1.2. Las células dendríticas

La iniciación de la respuesta inmune depende de las células dendríticas (DCs). Estas son células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, que se describieron originalmente por Steinman and Cohn en el bazo por su morfología característica con pseudópodos retráctiles de gran envergadura, que las distinguía de los macrófagos.<sup>(7)</sup> Estas células están presentes en tejidos y órganos linfoides y no linfoides, en los linfáticos aferentes y en la sangre periférica.

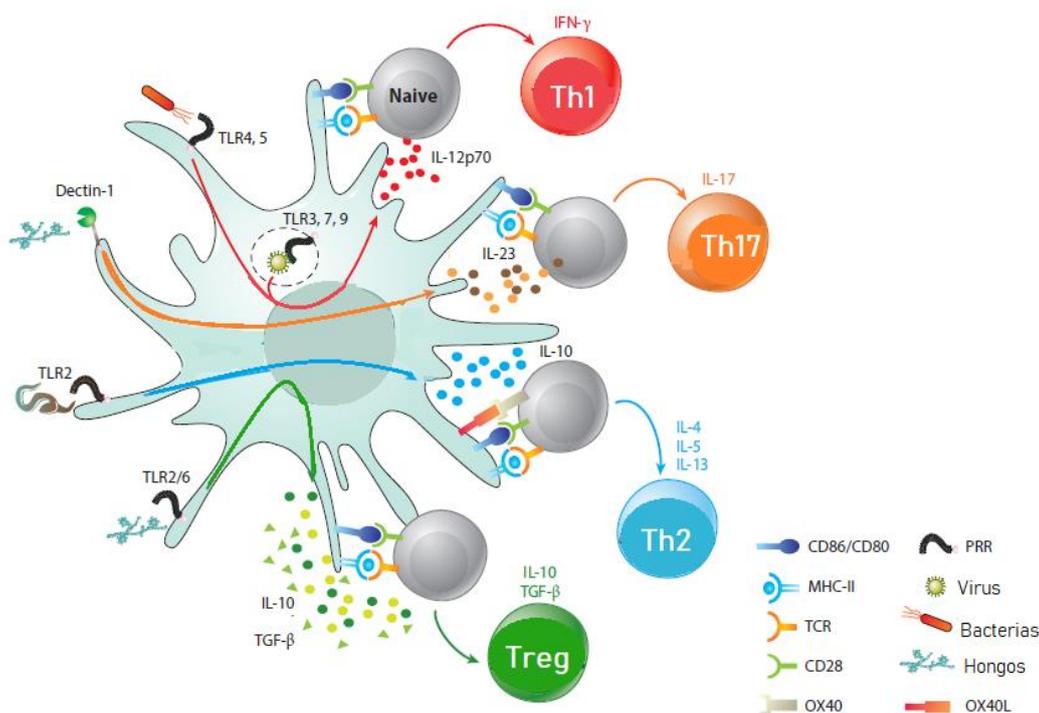
Existen varias subclases de DCs en humanos: DCs convencionales (cDCs), células de Langerhans, células dendríticas plasmocitoides (pDCs) y células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs). Las DCs conectan funcionalmente la inmunidad innata y adquirida. Como se muestra en la Figura 1, las DCs están presentes en los tejidos como células inmaduras con gran capacidad de fagocitosis. De esa forma pueden procesar continuamente antígenos del medio en el que se encuentran y presentarlos asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad a los linfocitos T.<sup>(7-9)</sup>



**Figura 1:** Funciones de las DCs. Las DCs participan en el reconocimiento antigénico y la producción de citocinas, y además presentan los antígenos a los linfocitos T. Modificado de Ivette van Kooy (2003).<sup>(9)</sup>

El proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas 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 *in vitro* moDCs. Estas células poseen la capacidad de capturar y procesar antígenos, y presentan en su superficie altos niveles de MHC, CD1, FcγRII, CD40, complejo B7 (CD80/CD86), CD44, ICAM-1 y CD11c y escasa expresión de CD14.<sup>(10)</sup>

La especialización funcional de las DCs se ha comprobado en estudios en los que se ha demostrado la plasticidad de su respuesta ante diferentes estímulos.<sup>(11)</sup> Como se muestra en la Figura 2, la activación de las DCs por los TLR induce una robusta producción de IL-12 y una respuesta tipo Th1. En contraste, ligandos del TLR2 inducen una elevada producción de IL-10 y TGFβ, lo que se relaciona con una respuesta tipo Th2 o Treg. Asimismo, la señalización a través de ligandos que activan Dectin 1 induce la producción de IL-23 que se asocia con la inducción de una respuesta de tipo Th17.



**Figura 2:** El reconocimiento de diferentes patógenos por los PRR expresados en las DCs puede inducir distintos tipos de respuesta inmune. Modificada de Pulendran.<sup>(11)</sup>

### 1.3. El inmunometabolismo

La activación de las células del sistema inmune implica cambios en los patrones de expresión de un gran número de genes, y la adquisición de nuevas funciones, como la producción de citoquinas, mediadores lipídicos y la capacidad para

migrar a los nódulos linfáticos. Esta transición entre los estados quiescente y activado requiere del aporte de nutrientes para la producción de energía y, por lo tanto, existe un creciente interés en el estudio de cómo se regulan las vías metabólicas para proporcionar soporte energético y dirigir los cambios funcionales de las células inmunes activadas. <sup>(12)</sup> Las células inmunes tienen distintas opciones para la producción de ATP y la cooptación entre las distintas vías metabólicas depende de la disponibilidad de glucosa, glutamina, ácidos grasos y la existencia de suficiente oxígeno para la fosforilación oxidativa (OXPHOS). <sup>(13)</sup>

#### **1.4. Reprogramación metabólica en células dendríticas:**

En condiciones no inflamatorias, las DCs residen en los tejidos periféricos en un estado inmaduro en el que existe relativamente poca demanda anabólica, por lo que las necesidades energéticas se reducen al aporte anaplerótico necesario para la realización del ciclo de Krebs (TCA) en la mitocondria a partir de triacilglicéridos, aminoácidos y ácidos grasos para la producción de ATP mediante la OXPHOS. <sup>(14)</sup>

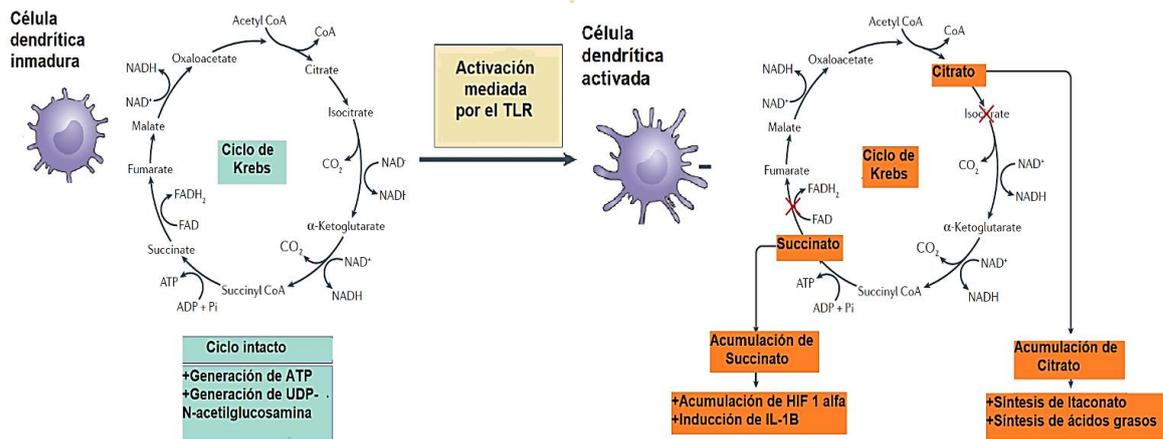
La utilización de la glucosa se inicia en la vía glicolítica que conduce a la generación de piruvato, que puede entrar en la mitocondria a través del transportador mitocondrial de piruvato (MPC1) y convertirse en acetil-CoA que alimenta el TCA. Alternativamente, el piruvato se convierte en lactato y se secreta al espacio extracelular. Esta conversión de piruvato en lactato permite la generación acoplada de NAD<sup>+</sup> y la producción de ATP en la vía glicolítica, incluso en condiciones aerobias, lo que se ha denominado efecto Warburg, como fuera descrito por este investigador en células tumorales hace ocho décadas. La utilización de la glicólisis aerobia es energéticamente desfavorable en comparación con la OXPHOS, sin embargo, confiere ciertas ventajas, como la generación de intermediarios biosintéticos para otras vías metabólicas (como la vía de las pentosas fosfato), de gran importancia para las funciones efectoras celulares. <sup>(12-14)</sup>

##### **1.4.1. Metabolitos intracelulares durante la reprogramación de las DCs**

Acompañando a la disminución de la OXPHOS y a la adopción del metabolismo tipo Warburg en DCs activadas y macrófagos <sup>(15)</sup>, se producen cambios notables en las concentraciones de los metabolitos que intervienen en el TCA y sus derivados, que a su vez pueden actuar como señales inflamatorias como se muestra en la Figura 3.

Tras la activación de las DCs, se inicia la formación de citrato y su consumo en el TCA y en el compartimento citoplasma/núcleo. El citrato exportado hacia el exterior de la mitocondria a través del transportador de citrato mitocondrial puede utilizarse para la producción de los ácidos grasos necesarios para la biosíntesis de membranas. La enzima cis-aconitato decarboxilasa genera itaconato a partir

del citrato. El itaconato es un metabolito con propiedades antimicrobianas por su capacidad para inhibir la enzima isocitrato liasa en especies como *Salmonella enterica* y *Mycobacterium tuberculosis*. Recientemente se ha descrito que, en macrófagos, el itaconato forma parte de un mecanismo que regula el remodelado del TCA y la activación celular por su capacidad para inhibir la succinato deshidrogenasa y regular los niveles intracelulares de succinato. (16)



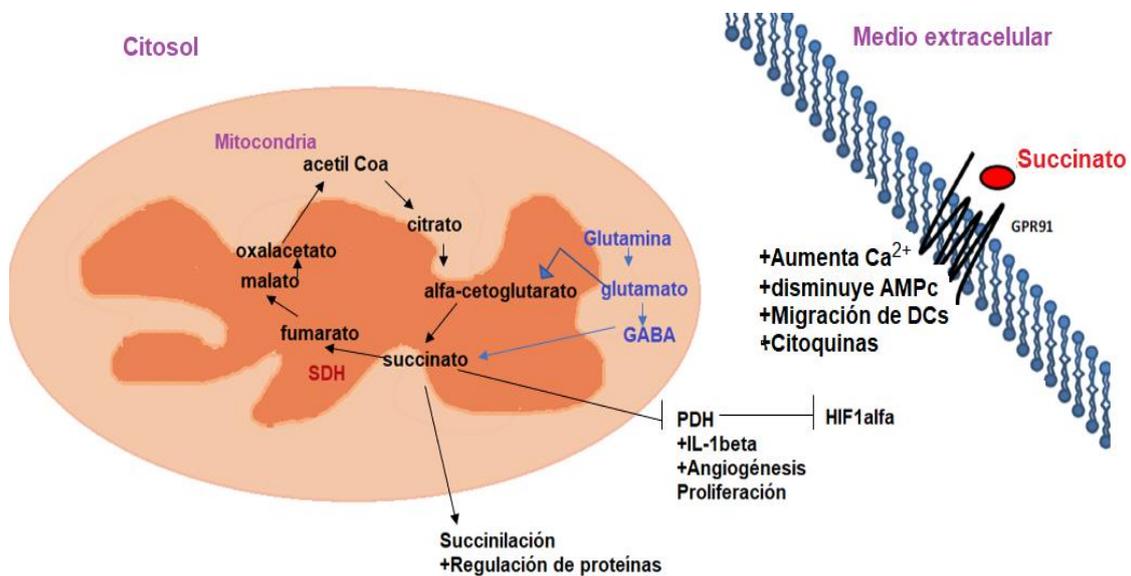
**Figura 3:** Cambios metabólicos en DCs quiescentes y activadas. En DCs quiescentes el TCA supe la demanda energética y de metabolitos celulares. Tras la activación de las células se produce una fragmentación del TCA en dos niveles. El citrato sale de la mitocondria y genera acetil-CoA e itaconato en el citoplasma. En sentido opuesto, el succinato puede acumularse a partir de L-glutamina. Los niveles de estos intermediarios metabólicos influyen en la lipogénesis, la acetilación de proteínas y la inducción de citocinas.

### 1.4.2. El succinato como señal inflamatoria

Estudios recientes sugieren que además del citrato y el itaconato, el succinato puede actuar como una molécula con capacidad de señalización en la respuesta inflamatoria, (17,18) bien por su acumulación intracelular tras la activación por agonistas de los TLR y la estabilización de HIF-1α o mediante su unión a un receptor específico de membrana y la activación de una vía de señalización intracelular. (18)

El aumento de las concentraciones de succinato en células inmunes se ha explicado por mecanismos que no son mutuamente excluyentes: una disminución de la actividad de la succinato deshidrogenasa relacionada con la menor actividad de la OXPHOS o indirectamente por la capacidad del itaconato para inhibir la succinato deshidrogenasa y el incremento del metabolismo de la L-glutamina y del ácido γ-aminobutírico (GABA-shunt) que incrementan la disponibilidad de α-cetoglutarato en el TCA y, en consecuencia, de succinato. (18)

El succinato es un inhibidor de la prolil-hidroxilasa (PDH), una actividad enzimática dependiente de  $\alpha$ -cetoglutarato, y de esa forma impide la hidroxilación del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , lo que conduce a su estabilización y permite su actividad como factor de transcripción implicado en la regulación de numerosos genes, entre los cuales se encuentra la IL-1 $\beta$ .<sup>(18-20)</sup> El succinato extracelular puede unirse a un receptor de membrana específico acoplado a proteínas G, el GPR91 o SUCNR1.<sup>(21-23)</sup> Como se muestra en la Figura 4, la unión del succinato a su receptor induce la movilización intracelular de calcio al activarse la fosfolipasa C que convierte fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) en trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros inducen la movilización de iones calcio y la activación de la proteína quinasa C, respectivamente, y la producción subsecuente de óxido nítrico, prostaglandina E<sub>2</sub> y la activación de la MAP quinasa p38.<sup>(25)</sup> En DCs activadas con agonistas del TLR, la unión del succinato a su receptor mostró un efecto sinérgico sobre la inducción de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .<sup>(22)</sup>



**Figura 4:** Señalización por succinato. El succinato a través de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  promueve la proliferación celular, la angiogénesis y la inducción de citoquinas. Otras respuestas dependen de la unión al receptor GPR91.

El succinato puede ser utilizado como sustrato en la succinilación de proteínas, una modificación post-transduccional en la que el grupo succinilo se añade a un residuo de lisina. En macrófagos y DCs activados a través de los receptores TLR, proteínas como la enzima glicolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la malato deshidrogenasa, la lactato deshidrogenasa y el transportador de glutamato 1 (EAAT1) son susceptibles de esta modificación, si bien no se conoce suficientemente el modo en que ésta afecta a su función.<sup>(18)</sup>

---

## HIPÓTESIS

---

La activación de células dendríticas por zymosán induce una reprogramación metabólica, que modifica su funcionalidad e influye en la regulación transcripcional de la producción de citocinas.

---

## OBJETIVOS

---

### **Objetivo general:**

Analizar la reprogramación metabólica con especial interés en el papel del bloque piruvato, citrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinato en la inducción transcripcional de citocinas en respuesta a patrones fúngicos en células dendríticas.

### **Objetivos específicos:**

1. Describir el fenotipo metabólico y el patrón de expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con zymosán en presencia y ausencia de moduladores farmacológicos de la concentración intracelular de succinato.
2. Describir el efecto del succinato extracelular a partir de la caracterización de la expresión del receptor de succinato en células dendríticas.

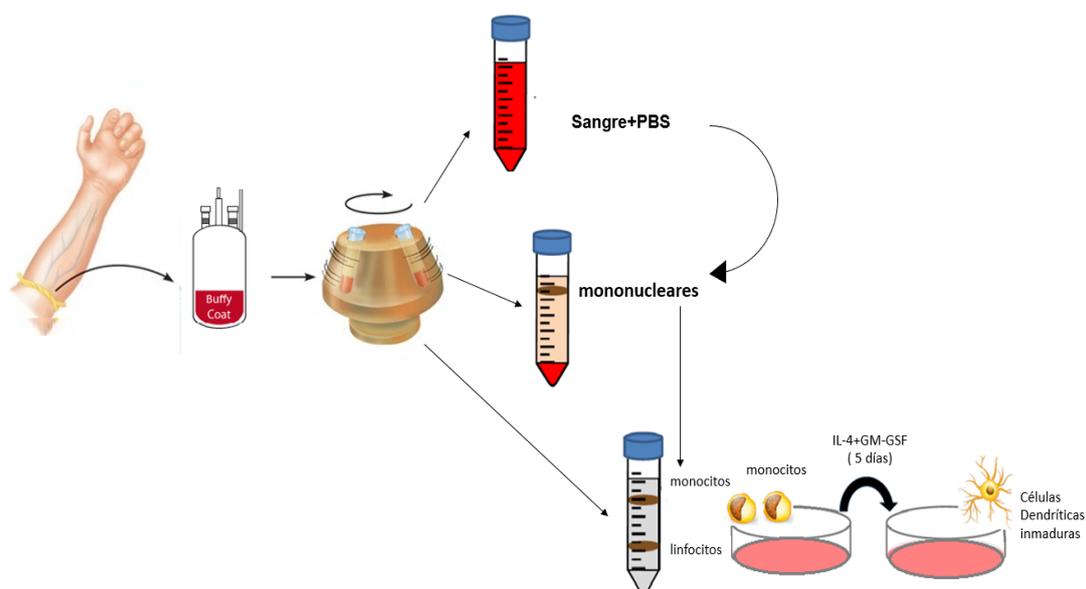
---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. Obtención de células dendríticas (DCs) derivadas de monocitos humanos

Se obtuvieron monocitos humanos a partir de la capa leuco-plaquetaria que aparece tras la centrifugación de la sangre total entre el plasma y los glóbulos rojos de donantes sanos y que se denomina *buffy coat*. Estos fueron proporcionados por el Centro de Hemoterapia de Castilla y León, procedentes de donantes sanos. El concentrado sanguíneo se diluyó 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de composición: 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La preparación se añadió suavemente sobre Ficoll-Paque en proporción 1:3 (sangre-PBS:Ficoll-Paque) como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5:** Esquema del proceso de obtención de monocitos y su diferenciación a células dendríticas.

Las muestras se centrifugaron a 1900 rpm, durante 30 minutos, a 20°C sin freno. Ello permite la obtención de una fase acuosa compuesta del PBS y plasma, un anillo de células mononucleares, una capa de Ficoll-Paque y un *pellet* de polimorfonucleares y eritrocitos. Las células mononucleares se recogieron por aspiración con pipeta Pasteur y se añadieron a un tubo con PBS para su lavado por centrifugación a 1500 rpm, durante 10 minutos, con freno.

La fracción celular se resuspendió en 3 ml de OptiPrep, sobre el que se añadieron 7 ml de Ficoll-Paque de densidad 1.072 g/ml, para crear un gradiente discontinuo al añadir una solución de OptiPrep de densidad 1.068 g/ml, suplementada con 0,5% BSA y 1 mM EDTA en una solución tamponada con HEPES.

La mezcla se centrifugó a 1900 rpm, durante 25 minutos a 20°C, lo que permite una separación en varias fases en función de la densidad: la fase superior se compone de un anillo de monocitos sobre la solución de OptiPrep, otro anillo de linfocitos y el Ficoll-Paque en el fondo del tubo. Se recogió el anillo de monocitos con pipeta Pasteur y se lavó con PBS por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 20°C. El proceso de separación usando soluciones de OptiPrep y Ficoll-Paque de distintas densidades se repitió para conseguir la eliminación completa de linfocitos. Tras esta última purificación, se hizo el recuento de monocitos extraídos utilizando una cámara de Malassez y un microscopio óptico. Los monocitos se resuspendieron en medio RPMI, suplementado con 10% FBS, L-glutamina 4 mM y penicilina/estreptomicina. Las células se distribuyeron en placas de cultivo a la concentración de  $6 \times 10^6$  células/ml. Al cabo de una hora, los monocitos se adhieren a las placas y se procede a retirar por aspiración el medio con los linfocitos que permanecen en suspensión. Posteriormente, se inicia diferenciación a células dendríticas inmaduras en medio RPMI suplementado con citocinas; 500 U/ml de IL-4 y 800 U/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). La diferenciación se mantiene durante 5 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2. Condiciones experimentales**

Tras 5 días, las DCs se incubaron en medio RPMI en el que se redujo la concentración de FBS al 2%, en presencia y ausencia de acetato a la concentración de 5mM, UK 5099 a 50 μM, DCA (dicloroacetato) a las concentraciones de 1mM, 5mM y 10mM, dimetil-malonato (DMM) a la concentración de 2 mM y dimetil-succinato (DMS) 5 mM; en función del diseño experimental, durante 30 minutos. Trascorrido este periodo las DCs se estimularon con zymosán (Sigma-Aldrich, número de producto: Z4250) a la concentración de 1 mg/ml durante 30 minutos para el análisis de metabolitos y durante 4 horas para el análisis de la expresión génica.

## **3. Análisis de la expresión génica**

### **3.1 Extracción del RNA**

La extracción de RNA total se realizó siguiendo el protocolo descrito por Chomezynski y Sacchi<sup>(26)</sup> utilizando Trizol (Invitrogen). Se añadió 1 ml de Trizol para cada  $6 \times 10^6$  células. Una vez conseguida una solución homogénea, se añadieron 200 μl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. De esta forma se obtuvieron dos fases: la acuosa con el ARN y la orgánica con el ADN y las proteínas. Una vez recogida la fase acuosa, se añadieron 500 μl de isopropanol o 250 μl de isopropanol y 250 μl de una solución de sales (0.8 M citrato sódico, 1.2 M NaCl) en el caso de las muestras con gran contenido en polisacáridos. Se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con etanol al 75 % en H<sub>2</sub>O-DEPC y la muestra se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DEPC (H<sub>2</sub>O desionizada con dietilpirocarbonato al 0,01%). La concentración de ARN presente en la muestra se cuantificó en un NANO DROP utilizando la razón de absorbancias A260/A280 y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **3.2 Obtención del DNA complementario (cDNA)**

Para obtener 20 µl de cDNA se realizó la transcripción reversa partiendo de 3 µg de RNA que se diluyeron en 11,1 µl de H<sub>2</sub>O-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 RT: Tampón 5x, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 4 µM de mezcla de hexanucleótidos, 1 U/µl RNasin, 10 U/µl de RT del virus de la leucemia murina (M-MLV) y H<sub>2</sub>O-DEPC hasta completar el volumen de 20 µl. Las muestras se incubaron a 37°C durante una hora. El cDNA se almacenó a -20°C.

### **3.3 Análisis mediante PCR a tiempo real**

A partir del cDNA se amplificaron mediante reacciones de PCR las secuencias específicas de cDNA de los genes de interés, empleándose 12,5 µl de SyBr Green I Master (Roche), 1,5 µl de cDNA, 10 µM de cada cebador. Los cebadores se diseñaron según las secuencias humanas obtenidas del GeneBank, como se muestra en la Tabla 1, elegidas de distintos exones con el fin de descartar la contaminación genómica y H<sub>2</sub>O milliQ hasta un volumen final de 25 µl, en un equipo de PCR LightCycler 480 software (Roche).

Tabla 1: Relación de *primers* utilizados para PCR:

Gen	Número de identificación en <i>Genbank</i>	Secuencias	
		Foward	Reverse
<i>IL23A</i>	NM_016584	5'-GTTCCCATATCCAGTGTGG-3'	5'-TTAGGGACTCAGGGTTGCTG-3'
<i>IL1β</i>	NM_000576.2	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'
<i>TNFα</i>	NM_000594.3	5'-GTTGTAGCAAACCCCTCAA-3'	5'-TTGAAGAGGACCTGGGA-3'
<i>IL10</i>	NM_000572.2	5'-GAGAACAGCTGCACCCACTT-3'	5'-GGCCTTGCTCTTGTTCAC-3'
<i>SUCNR1</i>	NM_033050.5	5'-CTGGCAGAGTTCCTGTCAAG-3'	5'-CAGCATGTCGTAGTTGTTCA-3'
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'

Aunque se modificó el programa en función del fragmento amplificado y de los oligonucleótidos usados, las condiciones estándares usadas en la PCR se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones generales de la qPCR

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Preincubación	95	5 minutos	1X
Desnaturalización	95	15 segundos	45X
Hibridación	60	20 segundos	
Elongación	72	5 segundos	
Melting	55 a 95	5 segundos	1X
Cooling	40	10 minutos	1X

La curva de fusión (*melting*) se obtuvo midiendo la emisión de fluorescencia para SyBr Green durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C a razón de 0,2° C/seg. Para la verificación de la eficiencia del proceso, se amplificó en todas las muestras un gen con expresión constitutiva, el de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se realizó la cuantificación relativa mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (*fold increase*), en el que se determina el ciclo umbral (Ct). Los resultados se expresan como la media de los Ct del gen que se analiza con respecto a los Ct de la GAPDH ( $\Delta Ct$  condición x = Ct gen diana – Ct GAPDH) y a este valor se le resta el  $\Delta Ct$  del control ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  condición x -  $\Delta Ct$  control).

#### 4. Análisis de los metabolitos intermediarios

##### 4.1 Extracción de metabolitos

Se utilizó el procedimiento descrito por Kurczy y Forsberg. <sup>(27)</sup> Las células dendríticas se trataron con una mezcla fría acetonitrilo:metanol:agua (2:2:1, v/v/v), se congelaron en nitrógeno líquido y se descongelaron para su sonicación en baño durante 15 minutos a 4°C. Tras un ciclo adicional de congelación/sonicación/descongelación, la mezcla extraída se mantuvo a -20 °C durante 1 hora, tras la cual se centrifugó a 15000 x g a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y evaporó hasta su desecación, tras lo cual, el residuo sólido se solubilizó en acetonitrilo:agua (1:1, v/v). Para el análisis de cromatografía líquida de ultra rendimiento/espectrometría de masas (UPLC-MS), el solvente de las muestras se evaporó a sequedad en un evaporador SpeedVac® y el pellet se resuspendió en agua Milli-Q (MQ).

##### 4.2 Análisis mediante UPLC-MS

El análisis de las concentraciones intracelulares de piruvato, lactato, oxalacetato (medido como  $[M-H_2O+H]^+$ ), citrato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinato, itaconato, fumarato y malato se realizó utilizando un análisis de cromatografía líquida de ultra-eficacia acoplada a espectrometría de masas. La separación cromatográfica se llevó a cabo con un T Acquity CORTECS UPLC® C18, en una columna (Waters) de 1.6  $\mu m$ , 2.1×100 mm interconectada con la fuente de ionización por electroespray de un espectrómetro de masas *híbrido cuadrupolo-*

*tiempo de vuelo*, Q-TOF (SYNAPT HDMS G2, Waters). La cromatografía se realizó con el siguiente gradiente de solventes: (A) H<sub>2</sub>O:metanol:ácido fórmico (95:5:0.1, v/v/v) con 5 mM formato de amonio, y (B) 100% acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico y 5 mM formato de amonio. Se desarrolló desde 95% A a 20% A durante 4 min y se mantuvo de forma isocrática durante 30 segundos, para volver al 95% A a los 6 minutos, lo que fue mantenido al 95% A por un período adicional de 2 min (período de elución total de 8 min), a una velocidad del flujo de 0.2 mL/min. El análisis de espectrometría de masas se realizó en modo de ionización negativo utilizando un método MS<sup>E</sup> que permite la detección simultánea de analitos a través de una función de baja energía (full scan) y una función de alta energía (energía de colisión) con una fragmentación iónica parcial.

## **5. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal láser de barrido**

Las células dendríticas se sembraron en cristales recubiertos con polilisina durante 12 horas tras lo cual se estimularon con zymosán. La fijación se hizo con una solución de formaldehído al 10% en PBS y la tinción con anticuerpo anti-SUCNR1/GPR91 (Novus Biologicals referencia NBP2-24549) a la concentración de 0,5 µg para 5 x 10<sup>5</sup> células. La incubación se mantuvo a 4°C durante 45 minutos, y posteriormente se realizó la tinción con el anticuerpo secundario anti-IgG marcado con Alexa-Fluor®488 (Thermo Fisher Scientific, ref A-11034, RRID AB\_2576217) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Thermo Fisher, número de catálogo: D1306). Los portaobjetos se analizaron con un microscopio confocal láser de barrido (Leica TCS SP5) equipado con un láser de luz blanca y un objetivo de inmersión Leica 63PL APO NA 1.40. Las imágenes y los fluorogramas de colocación subcelular se generaron y analizaron utilizando el software Leica Application Suite (Leica Microsystems) y el software Adobe Photoshop CS5.1 software (Adobe Systems, San Jose, CA).

## **6. Citometría de flujo**

Se analizó la expresión de GPR91 en células dendríticas mediante inmunofluorescencia indirecta. Las DCs se centrifugaron durante 5 minutos a 350 x g y se resuspendieron en PBS, tras lo cual se marcaron con anti-SUCNR1/GPR91 (Novus Biologicals ref NBP2-24549) y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-IgG marcado con Alexa-Fluor®488 (Thermo Fisher Scientific, ref A-11034, RRID AB\_2576217) previa realización de los lavados y la fijación con formaldehído. Como control negativo se utilizó un anticuerpo control de isotipo (Thermo Fisher Scientific). El análisis posterior se realizó en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter Life Sciences) y al menos 10,000 células fueron analizadas por cada muestra. Para el análisis cuantitativo de los datos se empleó el software Kaluza versión 1.1.

## **7. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Prism 7.0 (GraphPad software) y se representan como la media  $\pm$  SEM. La comparación entre dos grupos de experimentos se llevó a cabo usando el test t de Student de 2 colas. En los casos en los que la distribución de los datos no fue normal, las comparaciones entre los grupos experimentales se realizaron mediante los test de Kruskal-Wallis y Friedman. Los niveles de significación fueron, \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

---

## RESULTADOS

---

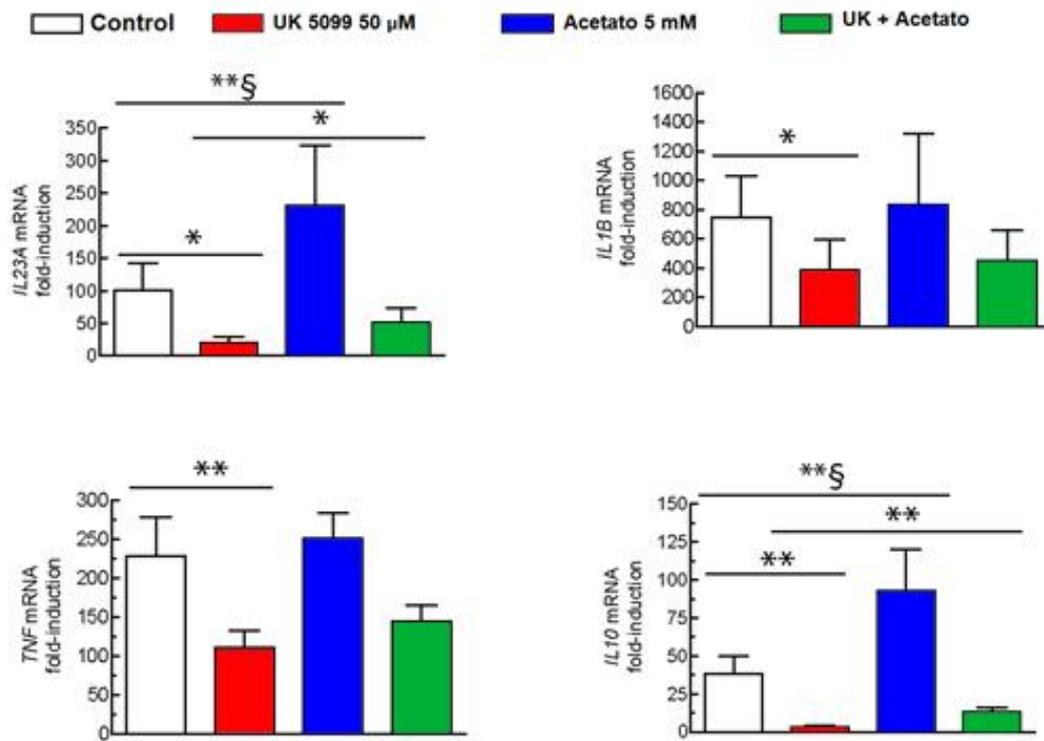
### **1. Reprogramación aguda del metabolismo energético durante la estimulación de las células dendríticas y efecto sobre la producción de citocinas**

La mayoría de los estudios han relacionado la activación de macrófagos y células dendríticas con un aumento de la glicolisis y una caída paralela de la OXPHOS. Sin embargo, un estudio reciente en el que se combinaba la inhibición farmacológica del flujo de piruvato y una técnica metabolómica de análisis del flujo de isótopos estables mostró la dependencia crítica de la inducción de la expresión de *Tnf* y otros marcadores inflamatorios de la oxidación del piruvato, mientras que la expresión del gen *Il1b* no se inhibía de forma significativa, lo que sugiere una cierta especificidad del control de la expresión de citocinas por la actividad mitocondrial.<sup>(28)</sup>

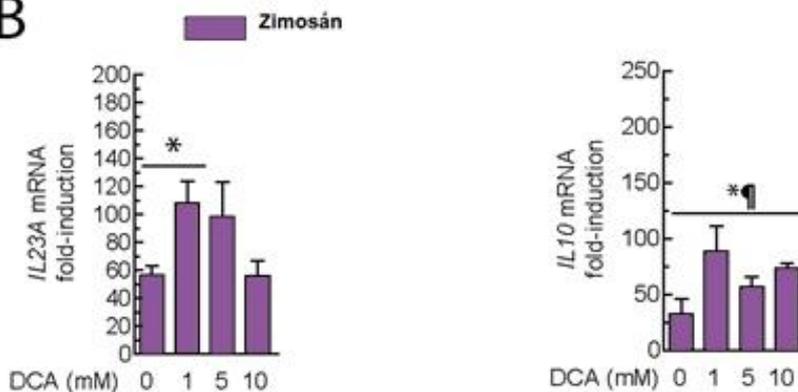
A la vista de estos datos y de la observación previa de que el incremento de la glicólisis no se seguía de forma obligada de la caída de la OXPHOS,<sup>(29)</sup> se realizaron experimentos con el inhibidor del transportador de piruvato a la mitocondria UK5099, con el fin de determinar su efecto sobre la inducción de citocinas. El UK5099 inhibió la expresión del mRNA de *IL23A*, *IL1B*, *TNF* e *IL10* mRNA con distinta intensidad. El efecto máximo se observó en el caso de *IL23A* e *IL10* en DCs estimuladas con zymosán, en las que la inhibición alcanzó el 81% y el 91%, respectivamente, mientras que en el caso de *TNF* e *IL1B*, las inhibiciones oscilaron entre el 10% y el 51% (Figura 6a). De forma opuesta, el refuerzo de la actividad de la piruvato deshidrogenasa mediante la inhibición de su regulador negativo piruvato deshidrogenasa quinasa por el dicloroacetato (DCA) indujo un incremento significativo de la expresión del mRNA de *IL23A* e *IL10* (Figura 6b). A la vista del papel crítico del ciclo de Krebs en la generación de citrato y la consiguiente producción de acetil-CoA en el citoplasma a través del flujo de citrato y la actividad de la ATP citrato liasa (ACLY), se realizaron experimentos en presencia de acetato exógeno, que puede contribuir a la producción de acetil-CoA mediante la actividad de las enzimas de la familia ACSS (acil-CoA sintetasas de ácidos grasos de cadena corta). El acetato indujo un incremento neto del mRNA de *IL23A* e *IL10* mRNA, y neutralizó parcialmente el efecto del UK5099 (Figura 6a). La medida de los metabolitos intermediarios mostró una serie de cambios coincidentes con la cinética de captación de partículas fagocitarias, que es máxima a los 30 min, como se muestra en la Figura 10c. El zymosán indujo una fuerte reducción de los niveles de piruvato y un incremento paralelo de los niveles de lactato que explica el gran incremento de la razón lactato/piruvato ratio (Figura 7a), que alcanzó niveles similares a los referidos en el músculo, donde la razón mínima lactato/piruvato es 10 y asciende por encima de 100 cuando el flujo glicolítico es elevado.<sup>(30)</sup> El citrato y el itaconato descendieron durante la estimulación por el zymosán (Figura 7a), al igual que la razón  $\alpha$ -cetoglutarate/succinato, cuyo marcado decremento se explica por la caída del nivel de  $\alpha$ -cetoglutarato y el incremento del succinato (Figura 7c). El acetil-CoA (Figura 7b) y el malato (Figura 7d) no mostraron cambios significativos, mientras que los niveles de oxaloacetato se incrementaron (Figura 7d). Estos cambios pueden explicarse por la anaplerosis concomitante de

substratos que compensan las discontinuidades del ciclo de Krebs. El acetato indujo una caída de los niveles de oxaloacetato y se opuso parcialmente al efecto del zimosán sobre la razón lactato/piruvato (Figura 7a). Asimismo, el acetato rescató parcialmente las caídas de citrato y  $\alpha$ -ketoglutarato e incrementó los niveles de acetil-CoA (Figuras 7b y 7c). Estos datos indican un escenario en el que el piruvato es consumido o redirigido a otros metabolitos en las fases iniciales de la fagocitosis, un rescate parcial de la depleción de algunos intermediarios por el acetato, y una fuerte dependencia de la expresión *IL23A* e *IL10* del aporte de piruvato.

**A**

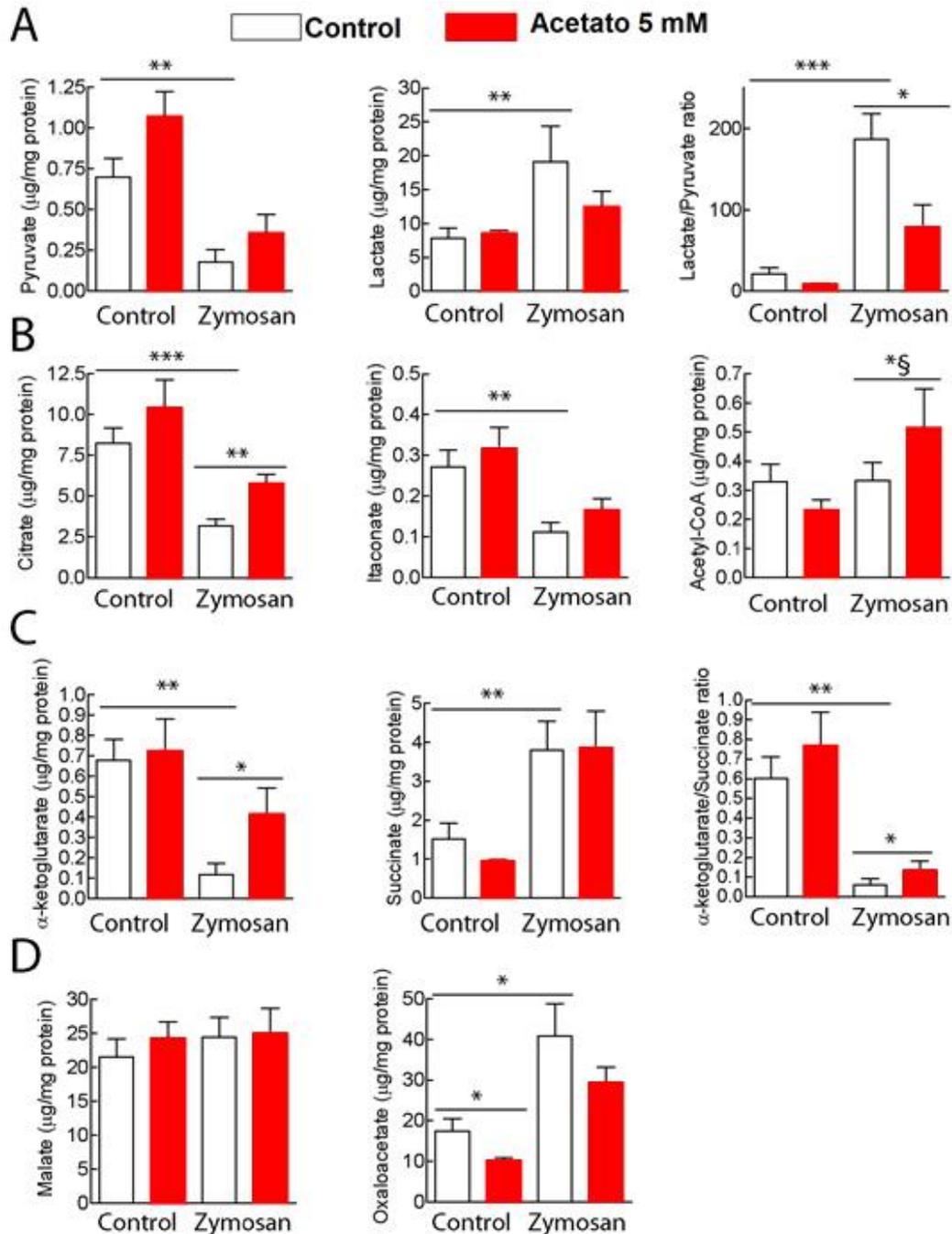


**B**



**Figura 6.** (A) Efecto de la inhibición del transportador de piruvato a la mitocondria y de la suplementación con acetato sobre la expresión del mRNA de varias citocinas. Las DCs se preincubaron con las adiciones indicadas durante 30 min previamente a la estimulación con 1 mg/ml de zimosán. Tras 4 horas de estimulación, el RNA se extrajo

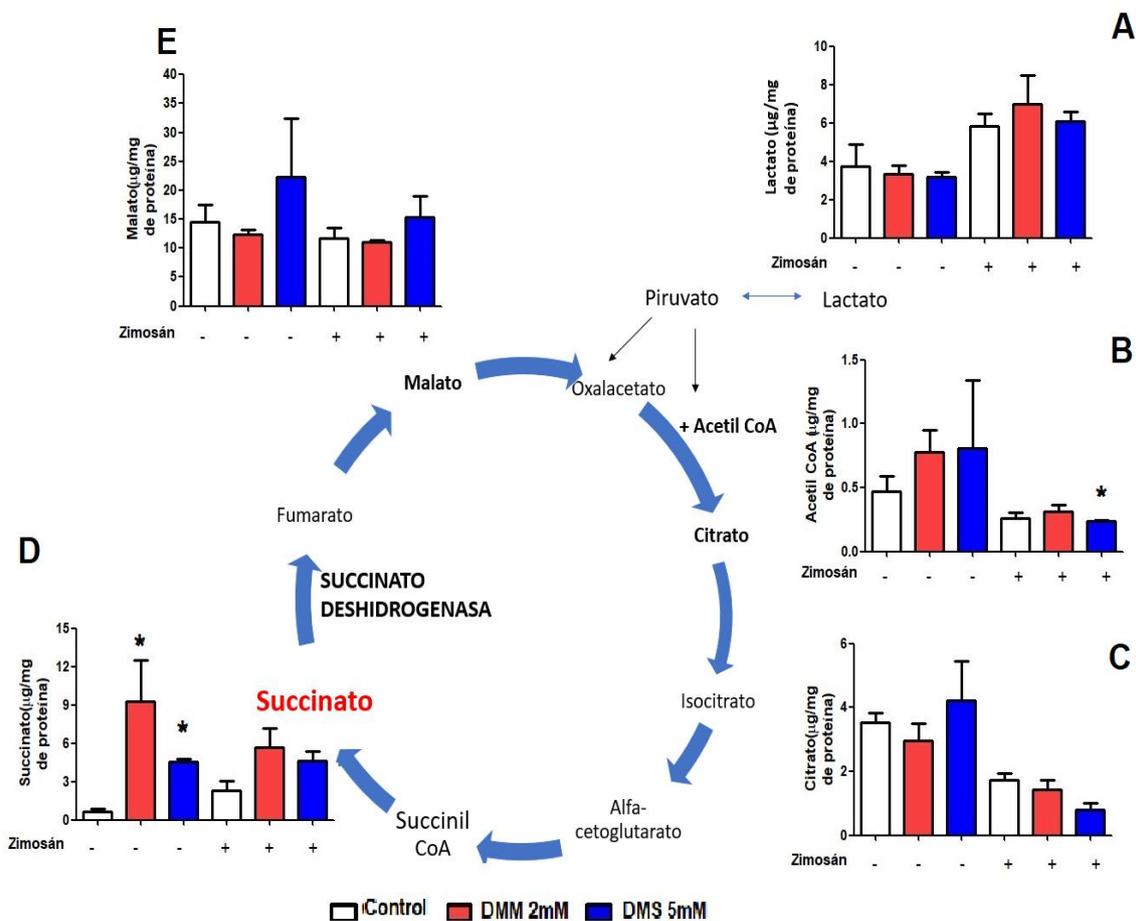
y se utilizó para la medida del mRNA que codifica las citocinas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Student's *t* test de dos colas, §, Wilcoxon signed-rank test. (B) Efecto del inhibidor de la piruvato deshidrogenasa kinasa DCA. Las DCs fueron tratadas con zymosán como se ha descrito previamente. Los resultados representan media  $\pm$  error standard de la media de 3 experimentos independientes con duplicados técnicos. \* $p < 0.05$ , ¶, Friedman test.



**Figura 7.** Medida de los intermediarios del ciclo de Krebs y efecto de la suplementación con acetato en respuesta al zymosán. (A-D) Las DCs se preincubaron en presencia y ausencia de acetato durante una hora, previamente a la estimulación con partículas de zymosán. Al cabo de 30 min se extrajeron los metabolitos para la medida mediante UPLC/MS. Los resultados representan media  $\pm$  error standard de la media de 3 experimentos. Student's *t* test de dos colas, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , §, Wilcoxon signed-rank test.

## 2. Efecto de la suplementación de succinato sobre los niveles de los metabolitos intermediarios del TCA

Para analizar el efecto que la actuación sobre los niveles de succinato podría tener en la reprogramación metabólica y teniendo en cuenta la escasa permeabilidad de la membrana plasmática al succinato, se intentó modular sus niveles mediante la inhibición de la succinato deshidrogenasa con DMM y utilizando el análogo permeable dimetil-succinato (DMS). Como se muestra en la Figura 8, el DMM y el DMS mostraron una tendencia a incrementar las concentraciones intracelulares de succinato, especialmente en las células en reposo.



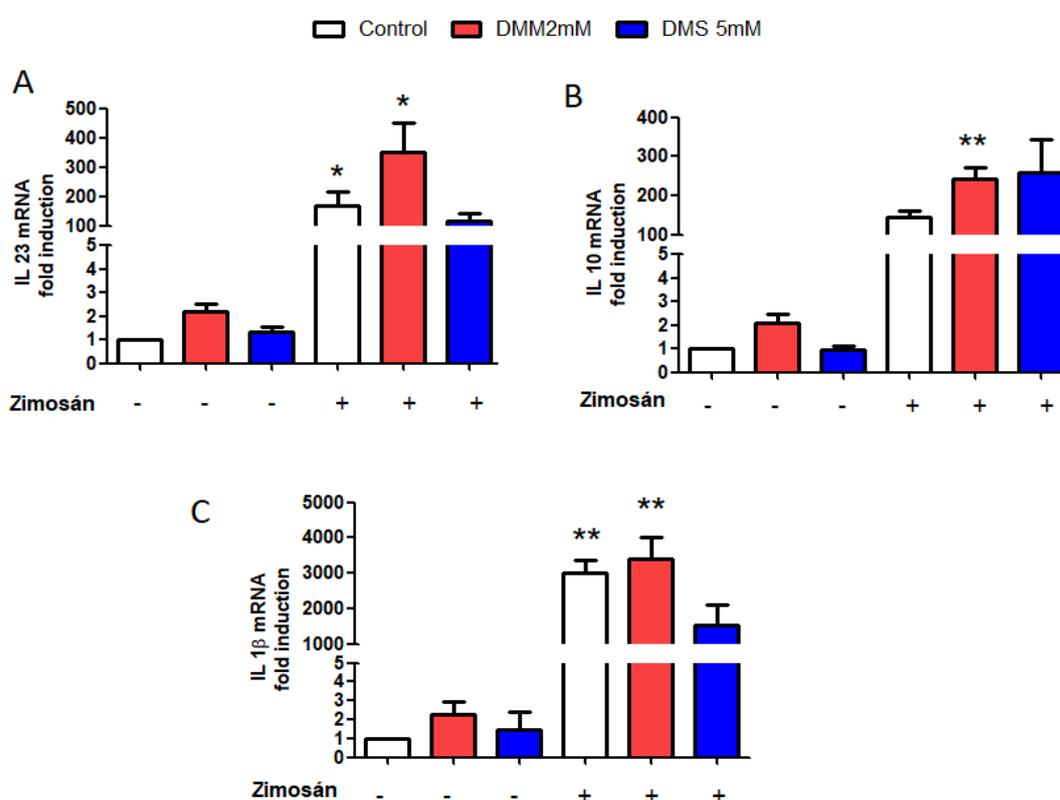
**Figura 8:** Análisis de los metabolitos intermediarios del TCA. Las DCs se preincubaron en presencia y ausencia de 2 mM DMM y 5 mM DMS durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con zimosán durante 1 hora. Tras este período se lisaron y se realizó el análisis de los diferentes intermediarios mediante UPLC/MS.

La estimulación en presencia de DMM y DMS no modificó de forma significativa el patrón metabólico inducido por el zimosán, excepto los niveles de acetil-CoA detectados tras la estimulación en presencia de DMS y los niveles de succinato. Curiosamente, la elevación del succinato fue más intensa en las células en reposo, llegando a ser más elevada que en las células estimuladas, lo que

contrasta con la gran elevación del succinato inducida por el zimosán en ausencia de estos compuestos.

### **3. Efecto de moduladores farmacológicos de succinato en la expresión de mRNA de citoquinas en DCs**

Para determinar el efecto de los cambios metabólicos sobre la expresión de citoquinas, las DCs se mantuvieron en presencia y ausencia de DMM y DMS durante 30 minutos, al cabo de este tiempo, las DCs se estimularon con zimosán durante 4 horas. Tras lo cual, se extrajo el mRNA para el análisis de la expresión de varias citoquinas mediante qPCR. Como se muestra en la Figura 9, a diferencia del DMS, el tratamiento con DMM aumentó la inducción del mRNA de *IL23A*, *IL10* e *IL1B*.

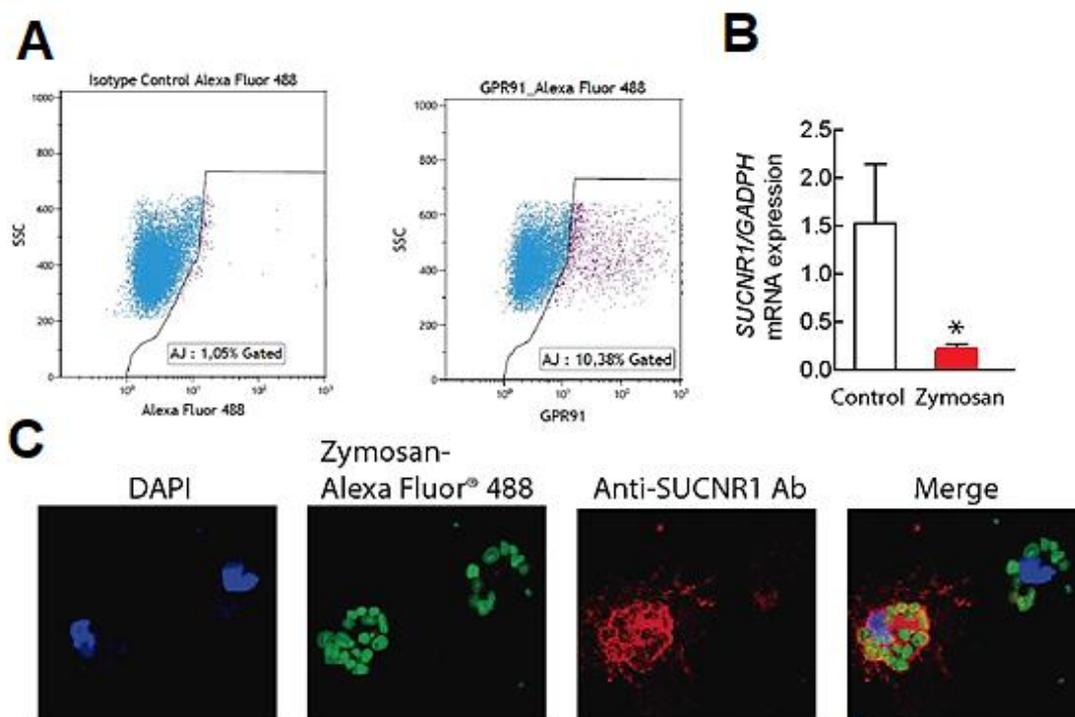


**Figura 9:** Las DCs se preincubaron en presencia y ausencia de 2 mM DMM y 5 mM DMS durante 30 minutos, previamente a la estimulación con zimosán durante 4 horas. El mRNA se extrajo y se utilizó para el análisis de la expresión de citoquinas. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , Test de Student de 2 colas.

### **4. Expresión del receptor SUCN1/GPR91**

A la vista de la elevación en los niveles de succinato que se produce en respuesta a la activación de las DCs con zimosán y teniendo en cuenta la existencia de referencias donde se describe la desensibilización del receptor SUCN1/GPR91 tras la estimulación de las DCs con lipopolisacárido bacteriano, <sup>(21)</sup> se analizó la

expresión de este receptor mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia indirecta y qPCR. Como se muestra en la Figura 10a, alrededor del 10% de las DCs mostraron una expresión detectable mediante citometría de flujo que se confirmó mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, en la que se pudo observar que no todas las células muestran tinción positiva (Figura 10c). El tratamiento con zymosán durante 4 horas indujo una marcada reducción de la expresión del mRNA del SUCN1/GPR91. Estos datos concuerdan con estudios previos en los que se describe que el SUCN1/GPR91, si bien se expresa funcionalmente en DC inmaduras o en reposo, sufre una rápida regulación negativa tras la maduración por un estímulo proinflamatorio, lo que sugiere que el efecto del succinato en estas células se pueda explicar a través de la interacción con sensores intracelulares<sup>(21)</sup> o a través de cambios en la razón  $\alpha$ -cetoglutarato/succinato que influyan en las reacciones mediadas por la prolil-hidrosilasa, como sugiere un estudio reciente<sup>(31)</sup> en el que se describe que una elevada razón  $\alpha$ -cetoglutarato/succinato conduce a la regulación de un grupo de genes que representan marcadores de los macrófagos M2 mediante la acción de las demetilinas que contienen dominios Jumonji, cuya actividad depende de la presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato y se inhibe por el succinato, de lo que se deduce que una disminución de la razón  $\alpha$ -cetoglutarato/succinato provocada por el tratamiento con zymosán se asociaría con una actividad proinflamatoria y la disminución de la expresión de los marcadores de macrófagos M2.



**Figura 10:** Expresión del receptor de succinato SUCNR1/GPR91 en células dendríticas. **(A)** Citometría de flujo de DCs en reposo mostrando la expresión de SUCNR1/GPR91. **(B)** Expresión del mRNA que codifica *SUCNR1* en DCs tratadas con zymosán durante 4 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  error standard de la media de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , Test de Student de 2 colas. **(C)** Expresión de SUCNR1 en DCs adheridas a placas recubiertas de polilisina e incubadas con partículas marcadas de zymosán(en verde) durante 30 minutos. Tras este tiempo, las DCs se fijaron y tiñeron con anti-SUCNR1 Ab (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

---

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

---

Las células dendríticas inmaduras en estado quiescente tienen una escasa actividad anabólica, con un metabolismo asociado a la utilización de sustratos en el TCA y la producción de ATP mediante la OXPHOS a partir de glucosa y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. La maduración de las DCs iniciada por la activación de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares, conduce a un aumento variable de la OXPHOS, según el estímulo y el grado de diferenciación, y a la aparición de glicólisis aeróbica, en forma similar al efecto Warburg descrito en células tumorales.<sup>(32)</sup> Estos cambios metabólicos no solo son importantes para la generación de ATP y precursores biosintéticos, puesto que intermediarios metabólicos como el succinato y el lactato pueden actuar como moléculas de señalización durante la respuesta inflamatoria.<sup>(33)</sup>

En el presente estudio se han descrito el perfil general inducido en las fases iniciales del proceso fagocitario y las modificaciones inducidas por moduladores farmacológicos de las concentraciones de succinato intracelular en DCs activadas por zymosán. En este intervalo temporal se produce una caída significativa de los niveles intracelulares de piruvato, citrato y  $\alpha$ -cetoglutarato, al tiempo que se elevan los niveles de lactato y succinato. Este perfil bioquímico sugiere en primer lugar un consumo elevado de piruvato o su transformación en otros metabolitos como lactato o alanina, si bien este aminoácido no ha sido analizado. Por otra parte, la caída del citrato sugiere una formación deficiente mediante la condensación con el oxalacetato por la citrato sintasa o un consumo elevado tras su transporte al citoplasma y su conversión en acetil-CoA y oxalacetato por la ACLY(ATP citrato liasa) en el compartimento citoplasma/núcleo. La marcada elevación del succinato podría explicarse a través de la formación a partir de la glutamina y la formación de  $\alpha$ -cetoglutarato en reacciones de glutaminólisis. Si bien tanto el DMM como el DMS incrementan las concentraciones de succinato, llaman la atención algunos aspectos. En primer lugar, la elevación del succinato es mayor en las células en reposo que tras la estimulación por zymosán, y además no se observa aumento de los niveles de citrato ni lactato, lo que indicaría que no se produce la carboxilación reductora en estas condiciones. Asimismo, la estimulación con zymosán no modifica los niveles de malato, lo que pudiera explicarse a través de la conversión del oxalacetato en malato mediante la lanzadera malato/aspartato, teniendo en cuenta que, en el ciclo de Krebs, además de las fracturas catapleróticas a nivel de citrato y succinato, existen sustratos anapleróticos que permiten impedir la interrupción del TCA en estas condiciones.

El incremento de las concentraciones de succinato ya había sido referido en DCs estimuladas con lipopolisacárido bacteriano <sup>(17)</sup> en las que la razón  $\alpha$ -cetoglutarato/succinato se encuentra disminuida a expensas del incremento de la actividad de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, que convierte  $\alpha$ -cetoglutarato en succinil-CoA y el incremento de la actividad de la glutaminólisis, si bien los resultados referidos no alcanzan en precocidad e intensidad los encontrados en

este estudio. Los presentes datos concuerdan con la idea de que la glutaminólisis puede ser el soporte bioquímico de la inmunidad entrenada inducida por  $\beta$ -glucanos.

La modulación de los niveles intracelulares de succinato ha mostrado un incremento de la expresión del mRNA de *IL23A* e *IL10* en presencia de DMM, mientras que el DMS no modificó significativamente los niveles de estas citocinas, lo que sugiere que la modificación del flujo succinato/fumarato a nivel de la succinato deshidrogenasa posee un efecto distinto de la simple elevación del succinato mediante el empleo de un análogo permeable y sugiere que el empleo de intermediarios metabólicos puede ser una alternativa terapéutica en las enfermedades inflamatorias, pudiendo servir de ejemplo el efecto beneficioso del dimetil-fumarato en psoriasis y esclerosis múltiple.

La hipótesis contemplada al inicio del estudio donde se postulaba si los efectos del succinato se ejercen a través del receptor de membrana SUCN1/GPR91 o a través de un sensor intracelular, puede resolverse en el sentido de una acción intracelular. Sin embargo, no puede descartarse la salida del succinato intracelular a tiempos más tardíos dada la elevada concentración intracelular que puede alcanzarse. Esta hipótesis sería compatible con la idea de que la activación del SUCNR1 es un elemento necesario para la migración de las CD8 a través de los vasos linfáticos desde los tejidos a los nódulos linfáticos donde debe realizarse la presentación de antígenos en la sinapsis inmune. <sup>(21)</sup>

---

## CONCLUSIONES

---

1. La estimulación de las DCs por el patrón fúngico zymosán induce una serie de cambios en el metabolismo energético caracterizada por la elevación de lactato y succinato y una caída de los niveles intracelulares de piruvato y citrato.
2. La utilización de moduladores potenciales de los niveles intracelulares de succinato en DCs activadas por patrones fúngicos indujo cambios en los niveles intracelulares de succinato, más intensos en las células en reposo que tras la estimulación por zymosán, pero no afectó de forma significativa los niveles de otros intermediarios metabólicos, lo que sugiere que en esas condiciones no existe un flujo reverso de carboxilación reductora.
3. Las células dendríticas estimuladas con zymosán presentan una elevada expresión del ARNm de *IL2A3*, *IL 10* e *IL 1B* que incluso puede incrementarse en presencia de DMM.
4. El receptor de succinato SUCN1/GPR91 se expresa funcionalmente en DCs inmaduras y sufre una regulación negativa tras la maduración inducida por patrones fúngicos.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Silverstein, AM. 2009. A history of Immunology. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press, Elsevier Inc. San Diego. ISBN: 978-0-12-370586-0. doi:10.1016/B978-0-12-370586-0.X0001-7
2. Igea, JM. 2015. From the old *immunitas* to the modern immunity: do we need a new name for the immune system? *Curr Immunol Rev* 11, 55-65. doi: 10.2174/1573395510666141013224016
3. Janeway CA, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
4. van Kooyk, Y. 2008. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans* 36:1478-81. doi: 10.1042/BST0361478.
5. Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C. and Akira, S. 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3:352-63.
6. Steinman, R., and Cohn, Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.1973. *JEM Home* 137:1142. doi: 10.1084/jem.137.5.1142
7. Dillon S., Agrawal S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning,T,L., Oswald-Richter, K., Kasproicz. D.J., Kellar, K, Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D., and Pulendran, B. 2006. Yeast zymosán, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116:916-28. doi: 10.1172/JCI27203
8. Collin, M.,and Bigley,V. 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154:3–20. doi:10.1111/imm.12888.
9. van Kooy,I. 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3:697–709. doi:10.1038/nri1182
10. Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-18. doi: 10.1084/jem.179.4.1109

11. Pulendran, B. 2015. The varieties of immunological experience: of pathogens, stress, and dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 33:563–606. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075049
12. O’Neil, L., Kishton, R., and Rathmell, J. 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 16:553–65. doi: 10.1038/nri.2016.70
13. Diskin, C., and Palsson-McDermott, E.M. 2018. Metabolic modulation in macrophage effector function. *Front Immunol* 9:270. doi: 10.3389/fimmu.2018.00270
14. Kelly, B., and O’Neill, L.A. 2015. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 25:771–84. doi: 10.1038/cr.2015.68.
15. Van den Bossche, J., O’Neill, L., and Menon D. 2017. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends Immunol* 38:395–406. doi: 10.1016/j.it.2017
16. Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Bambouskova, M., Nair, S., Vincent, E.E., Loginicheva, E., Cervantes-Barragan, L., Ma, X., Huang, S.C., Griss, T., Weinheimer, C.J., Khader, S., Randolph, G.J., Pearce, E.J., Jones, R.G., Diwan, A., Diamond, M.S., and Artyomov, M.N.. 2016. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab* 24:158–66.
17. O’Neil, L., and Mills, E. 2014. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol* 24:313–20. Doi: 10.1016/j.tcb.2013.11.008
18. Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., Pearce, E.J., Driggers, E.M., and Artyomov, M.N. 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 496:238–42.
19. Mills, E.L., and O’Neill, L.A. 2016. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *Eur J Immunol* 46:13–21. doi:10.1002/eji.201445427
20. Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Tzoulmou, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., and Latorre, I.I. 2016, Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell* 167:457–70.e13.

21. Rubic, T., Lametschwandtner, G., Jost, S., Hinteregger, S., Kund, J., Carballido-Perrig, N., Schwärzler, C., Junt, T., Voshol, H., Meingassner, J.G., Mao, X., Werner, G., Rot, A., and Carballido, J.M. 2008. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol* 9:1261-69. doi: 10.1038/ni.1657.
22. Gilissen, J., Jouret, F., Pirotte, B., and Hanson, J. 2016. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol Ther* 159:56-65. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.01.008
23. Geubelle, P., Gilissen, J., Dilly, S., Poma, L., Dupuis, N., Laschet, C., Abboud, D., Inoue, A., Jouret, F., Pirotte, B., and J. 2017. Identification and pharmacological characterization of succinate receptor agonists. *Br J Pharmacol* 174:796–808. doi: 10.1111/bph.13738.
24. Haas, R., Cucchi, D., Smith, J., Pucino, V., Macdougall, C.E., and Mauro, C. 2016. Intermediates of metabolism: from bystanders to signalling molecules. *Trends Biochem Sci* 41:460-71. doi: 10.1016/j.tibs.2016.02.003
25. de Castro Fonseca, M., Aguiar, C., da Rocha Franco, J.A., Gingold, N., and Leite, F. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. 2016. *Cell Commun Signal* 14:3. Doi: 10.1186/s12964-016-0126-1
26. Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162:156-9. DOI:10.1006/abio.1987.9999
27. Kurczyk, M.E., Forsberg, M.P., Thorgersen, F.L., Poole 2nd, H.P., Benton, J., Ivanisevic, M.L., Tran, J.D., Wall, D.A., Elias, M.W., and Siuzdak, G. 2016. Global isotope metabolomics reveals adaptive strategies for nitrogen assimilation *ACS Chem Biol* 11:1677-85.
28. Meiser J, Krämer L, Sapcariu SC, Battello N, Ghelfi J, D'Herouel AF, Skupin A. 2016. Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. *J Biol Chem* 291:3932-46. doi: 10.1074/jbc.M115.676817
29. Márquez S, Fernández JJ, Terán-Cabanillas E, Herrero C, Alonso S, Azogil A, Montero O, Cubillos Ruiz, J.R., Fernández, N., and Sánchez Crespo M. 2017. Endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 $\alpha$  enhances IL-23 expression by human dendritic cells. *Front Immunol* 8:639. doi: 10.3389/fimmu.2017.00639
30. Brooks, G.A. 2018. The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metab* 27:757-85. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.008
31. Jensen, S.S., and Gad, M. 2010. Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based

cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. *J Inflamm.* 27;7:37.doi: 10.1186/1476-9255-7-37

32. Scott, K., Manunta, M., Germain, C., Smith, P., Jones, M., Mitchell, P., and Lombardi, G. 2005. Qualitatively distinct patterns of cytokines are released by human dendritic cells in response to different pathogens. *Immunology* 116:245–54. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02218.x>
33. Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., and Banchereau, J.2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:41-52. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.10.004.