



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Papel de la subunidad β de la toxina del cólera en la inducción de características de entrenamiento inmunológico en Células Dendríticas de la Piel”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

P R E S E N T A:

JULIÁN ARGENIS GAJÓN MARTÍNEZ

CIUDAD DE MEXICO 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Pérez Montesinos Gibran

VOCAL: Profesor: Castro Escamilla Octavio

SECRETARIO: Profesor: Tepale Segura Araceli

1er. SUPLENTE: Profesor: Ontiveros Padilla Luis Alberto

2° SUPLENTE: Profesor: Ramírez López Elena Guadalupe

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD MÉDICA DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOQUÍMICA, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
“BERNARDO SEPÚLVEDA” DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI. IMSS**

ASESOR DEL TEMA: ARACELI TEPALÉ SEGURA

SUSTENTANTE: JULIAN ARGENIS GAJON MARTÍNEZ

A mi madre

Agradecimientos.

Quisiera extender mi mas profundo agradecimiento a la UNAM y sobre todo a la Facultad de química por formarme como Q.F.B. y a cada uno de los profesores de los que tuve el privilegio de aprender.

En particular a mis profesores de Inmunología que despertaron el interés en esta ciencia tan sorprendente

Gracias también a la Dra Laura Bonifaz por aceptarme en su equipo de trabajo y hacerme crecer día con día, por creer en mi y mis ideas.

Un agradecimiento muy especial a la M. En C. Araceli Tepale por todas sus enseñanzas y su paciencia, por dirigir con tanto compromiso esta tesis.

Gracias infinitas a todos mis compañeros de laboratorio por su apoyo y por ser una gran fuente de inspiración.

Gracias también a mis amigos por el apoyo y la confianza

Mil gracias Lili por el apoyo incondicional y por siempre cambiar mi perspectiva

Gracias a mi familia por tantas enseñanzas de vida

Por último, quisiera intentar plasmar el profundo agradecimiento que tengo con mi madre, aunque sé que sería insuficiente por este medio.

Gracias ma por que sencillamente no podría haber logrado esto si no fuera por ti, por tu paciencia, por tu esfuerzo y esas ganas de salir adelante. Gracias por el cariño, por enseñarme a ser lo que soy...

Gracias totales.

INDICE

Indice de abreviaturas. -----	VII
Indice de Figuras -----	IX
Resumen. -----	1
Marco Teorico -----	2
<i>El Sistema Inmune</i> -----	2
Generalidades de la Inmunidad.-----	2
El Papel de las Celulas Dendriticas dentro de la inmunidad.-----	3
<i>Las Celulas Dendriticas</i> -----	4
Desarrollo de las Celulas Dendriticas. -----	4
Subtipos de DCs -----	5
fenotipo de DCs y localización anatómica -----	6
DCs en Tejidos no linfoides-----	7
<i>Activacion de las DCs</i> -----	10
Consecuencias funcionales de la activacion de las DCs. -----	10
metabolismo de la activación de las DCs -----	11
CTB Como Adyuvante -----	13
<i>Entrenamiento innato</i> -----	15
Dinamica Molecular del entrenamiento InMUNE innato. -----	17
Cambios metabolicos derivados del entrenamiento inmune innato -----	17
Cambios epigeneticos derivados del entrenamiento inmune innato-----	19
Estudio del entrenamiento inmune innato en DCs-----	22
<i>Antecedentes Directos.</i> -----	22
Justificación -----	23
Pregunta de Investigacion. -----	24
Hipotesis. -----	24
Objetivo General. -----	24
<i>Objetivos Particulares.</i> -----	24
MATERIALES y METODOS. -----	25
<i>Ratones.</i> -----	25
<i>Modelo de Inoculación.</i> -----	25
<i>Obtención de Celulas Totales de Piel y Ganglio Linfatico Drenante</i> -----	25
Piel. -----	25
obtención de células de Ganglio linfatico Drenante.-----	26
<i>Anticuerpos utilizados para citometria de flujo e inmunofluorescencia</i> -----	26
Citometria de Flujo:-----	26
<i>Citometria de Flujo</i> -----	26
<i>Conteo de Numeros Absolutos</i> -----	27
<i>Inmunoflouescencia</i> -----	27
<i>Analisis Estadistico</i> -----	28
Resultados. -----	29

<i>Una sola estimulación con CTB in vivo es suficiente para inducir un fenotipo de entrenamiento innato en DCs de piel</i>	30
<i>La re-estimulación in vivo con CTB incrementa la expresión de TNF-α en las poblaciones de DCs migratorias en ganglio linfático drenante.</i>	31
<i>Una sola estimulación con CTB in vivo incrementa los números absolutos de DCs en piel.</i>	33
<i>La administración intradérmica con CTB y la re-estimulación con CTB in vivo incrementa los números totales de DCs migratorias en ganglio linfático drenante.</i>	35
<i>La CTB induce el reclutamiento de precursores de DCs a la piel</i>	37
<i>La CTB no impacta en el reclutamiento de precursores de DCs en ganglio linfático drenante.</i>	38
<i>La inoculación de CTB induce la expresión de LDH en DCs de la piel.</i>	40
<i>La inoculación de CTB induce la expresión de LDH en DCs de ganglio linfático drenante.</i>	43
<i>La Activación de las DCs estimuladas con CTB in vivo es prolongada y sostenida en la piel.</i>	46
<i>La activación con CTB induce la expresión prolongada de CD86 en DCs migratorias de ganglio linfático drenante.</i>	49
Discusión.	51
Conclusiones.	59
<i>Perspectivas.</i>	61
Anexo I	61
Estrategia de análisis de poblaciones de DCs y sus precursores.	61
Estrategia de análisis de poblaciones de precursores de DCs.	62
Referencias.	63

INDICE DE ABREVIATURAS.

<i>ADN</i>	Acido desoxirribonucleico
<i>Ags</i>	Antigenos
<i>AKT</i>	Proteína cinasa B
<i>AMPc</i>	Adenosin monofosfato ciclico
<i>AMPK</i>	Cinasa de adenosin monofosfato
<i>APC</i>	Célula presentadora de antígeno profesional
<i>ARN</i>	Acido ribonucleico
<i>BCG</i>	Bacilo de Calmette-Guerin
<i>BCR</i>	Receptor de células B
<i>cDC1</i>	Célula dendritica clásica tipo 1
<i>cDC2</i>	Célula dendritica clásica tipo 2
<i>cDCs</i>	Célula dendritica clásica
<i>CDP</i>	Progenitor común dendritoide
<i>CLP</i>	Progenitor Linfoide común
<i>CmoP</i>	Progenitor común de macrófagos y monocitos
<i>CMV</i>	Citomegalovirus
<i>CoA</i>	Coenzima A
<i>CT</i>	Toxina del Cólera
<i>CTA</i>	Sub unidad alfa de la toxina del cólera
<i>CTB</i>	Sub unidad beta de la toxina del cólera
<i>DAMPS</i>	Patrones moleculares asociados a daño
<i>DC</i>	Célula dendritica
<i>dLN</i>	Ganglio linfático drenante
<i>ECAR</i>	Radio de acidificación extracelular
<i>FLT3</i>	Tirosina Cinasa 3 similar a FMS
<i>GM</i>	Receptor de gangliosidos
<i>HIF1-α</i>	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
<i>HIV</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<i>HK2</i>	Hexocinasa 2
<i>HMG-CoA</i>	Hidroximetil glutaril coenzima A
<i>ILCs</i>	Células Linfoides Innatas
<i>IGF1-R</i>	Receptor de crecimiento parecido a insulina
<i>IL</i>	Interleucina
	Interferón gamma

<i>IFN-γ</i>	
<i>ILC</i>	Célula linfoide innata
JMDJ	Proteína de unión al dominio JuMonJi
<i>InfDC</i>	Célula dendrítica inflamatoria
<i>LC</i>	Célula de Langerhans
<i>LDH</i>	Lactato deshidrogenasa
<i>LFT-β</i>	Linfotoxina beta
<i>LN</i>	Ganglio linfático
<i>LPS</i>	Lipopolisacárido
<i>MDP</i>	Progenitor común de macrófagos y células dendríticas
<i>MHC</i>	Complejo principal de histocompatibilidad
<i>MLP</i>	Progenitor Linfoide y Mieloide
<i>NK</i>	Célula "Natural Killer"
<i>oxLDL</i>	Lipoproteína de baja densidad oxidada
<i>PAMPS</i>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<i>PBMC</i>	Célula mononuclear de sangre periférica
<i>PD-L1</i>	Ligando 1 del receptor de muerte programada
<i>pDC</i>	Célula dendrítica plasmacitoide
<i>PDH</i>	Piruvato deshidrogenasa
<i>PFK2</i>	Fosfofructocinasa 2
<i>GLUD</i>	Glutamato deshidrogenasa
<i>GLS</i>	Glutaminasa
<i>pre-pDCs</i>	Precursor de células dendríticas plasmacitoides
<i>PRRS</i>	Receptores de reconocimiento de patrón
<i>TCA</i>	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
<i>TCR</i>	Receptor de células T
<i>Th</i>	Linfocito T cooperador
<i>TLR</i>	Receptor tipo Toll
<i>TNF-α</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>UV</i>	Ultra violeta

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia Experimental de Inoculación.	Página 29
Figura 2. Una sola estimulación con CTB in vivo es suficiente para inducir un fenotipo de entrenamiento en DCs de Piel.	Página 31
Figura 3. La re-estimulación con CTB in vivo incrementa la expresión de TNF α en las poblaciones de DCs migratorias en Ganglio Linfático Drenante.	Página 32
Figura 4. Una sola estimulación con CTB in vivo con incrementa los números absolutos de DCs en piel.	Página 34
Figura 5. La administración intradérmica con CTB y la re-estimulación con CTB in vivo incrementa los números totales de DCs migratorias en ganglio linfático drenante.	Página 36
Figura 6. La CTB induce el reclutamiento de precursores de DCs a la piel.	Página 38
Figura 7. La CTB no induce el reclutamiento de precursores en ganglio linfático drenante	Página 39
Figura 8. La estimulación con CTB y la re-estimulación in vivo induce la expresión de LDH en DCs CD11b ⁺ de la piel.	Página 41
Figura 9. La estimulación con CTB y la re-estimulación con CTB in vivo induce la expresión de LDH en DCs inf de la piel.	Página 42
Figura 10. La estimulación al día 1 con CTB y la re-estimulación in vivo induce la expresión de LDH en DCs CD11b ⁺ en ganglio linfático drenante.	Página 44

Figura 11. La estimulación al día 1 con CTB y la re-estimulación in vivo induce la expresión de LDH en DCs CD11b+ en ganglio linfático drenante.	Página 45
Figura 12. La activación de las DCs estimuladas con CTB in vivo es prolongada y sostenida en la Piel.	Página 48
Figura 13. La activación con CTB induce la expresión prolongada de CD86 en DCs migratorias de ganglio linfático drenante.	Página 50
Figura 14. Modelo propuesto para la inducción de entrenamiento innato en DCs de la piel mediado por la CTB.	Página 60
Figura 15. Estrategia de análisis para la caracterización de DCs en piel y ganglio linfático.	Página 61
Figura 16. Estrategia de análisis para la caracterización de Pre-DCs en piel y ganglio linfático.	Página 62

RESUMEN.

El entrenamiento inmune innato es un mecanismo recientemente descrito en macrófagos, monocitos y células NK. Se caracteriza por cambios a nivel funcional como el incremento cuantitativo en la expresión de citocinas pro-inflamatorias después de una segunda estimulación con un estímulo inflamatorio igual o distinto al primero.

Sin embargo, los estudios sobre entrenamiento inmune innato han dejado de lado a una de las células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) más importantes de la inmunidad innata, las Células Dendríticas (DCs), las cuales funcionan como puente de unión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Dicha unión se utiliza en las estrategias de inmunización para generar una inmunidad protectora de larga vida y además se ve potenciada con el uso de adyuvantes.

En este sentido el entrenamiento inmune innato se ha estudiado con componentes microbianos poco escalables en la inmunología clínica como el LPS y el β -glucano, perdiendo la oportunidad de comparar la efectividad de adyuvantes de nueva generación para establecer así mejores estrategias de inmunización.

Tal es el caso de la subunidad beta de la toxina del cólera (CTB), la cual en trabajos previos de nuestra unidad de investigación ha demostrado que su uso como adyuvante induce la activación tardía y sostenida de DCs de la piel en modelos de ratón. Así mismo, esta activación induce un incremento significativo tanto en la expresión de TNF α como en la cantidad de DCs TNF α ⁺ cuando estas células son re-estimuladas in vitro con LPS, sugiriendo la inducción de características de entrenamiento inmune innato. Sin embargo, es importante determinar si la CTB es capaz de inducir estas características de entrenamiento inmune innato in vivo.

En este trabajo se utilizaron Ratones C57BL6, los cuales fueron inoculados una o dos veces con CTB y se obtuvieron células de piel o ganglio drenante (dLN). Se evaluó la presencia de subpoblaciones de DCs, la presencia de progenitores y la función de las DCs por citometría de flujo o inmunofluorescencia. Los resultados muestran que una sola administración de CTB incrementa los números de DCs y la expresión de TNF α en DCs de la piel. La doble estimulación con CTB favorece el reclutamiento de precursores de DCs a la piel, incrementa el número en las DCs que migran al dLN, así como la expresión de TNF α . Finalmente la CTB es capaz de inducir la expresión de LDH así como mantener la activación en las DCs por tiempos prolongados.

MARCO TEORICO

EL SISTEMA INMUNE

GENERALIDADES DE LA INMUNIDAD.

El sistema inmunológico es una red altamente compleja que comprende efectores moleculares y celulares que en conjunto con órganos y tejidos brindan protección en contra de estímulos que alteran el estado homeostático del organismo.

La respuesta inmunitaria ha sido clasificada tradicionalmente en dos extremos debido a las diferencias que existen entre ambas respuestas. En primer lugar se encuentra la inmunidad innata y en segundo la inmunidad adaptativa¹. Sin embargo, poco a poco se han ido describiendo mecanismos intermedios entre ambas respuestas que no podrían considerarse exclusivos de la respuesta innata o de la adaptativa. Tal es el caso de la protección ante una infección crónica en donde ambas respuestas juegan un papel importante en la resolución de la infección^{2,3}.

La inmunidad innata está compuesta principalmente por células de acción rápida como neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, macrófagos, células NK, ILCs y monocitos. Estas células son de vida corta y tienen poca o nula expansión. La mayoría reconocen señales asociadas a daño o a organismos patógenos mediante receptores codificados en línea germinal (PRRS) como TLRs, receptores tipo lectinas, receptores “scavenger” o receptores tipo NOD, los cuales poseen diversidad limitada a los alelos del heterocigoto. Estos receptores reconocen principalmente patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPS) como componentes de la pared de bacterias Gram positivas o componentes de la membrana externa de bacterias Gram negativas, así como los diferentes patrones de glicosilación de las proteínas de la pared celular de hongos y levaduras o bien ARN y ADN viral^{4,5}. De igual manera mediante estos receptores pueden reconocerse señales endógenas asociadas a daño (DAMPS) como material nucleico, células apoptóticas, necróticas y otros mediadores moleculares asociados a estrés como el ATP.

Por otro lado, la inmunidad adaptativa está compuesta por células linfoides muy particulares como los linfocitos T y los linfocitos B. ambos tienen la capacidad de recombinar la información genética que codifica para sus receptores, TCR y BCR respectivamente, permitiendo el reconocimiento de una amplia variedad de determinantes antigénicos, en su

mayoría proteicos. Estas células se expanden clonalmente cuando sufren una estimulación antigénica mediante su receptor lo que permite la generación de diversos fenotipos efectores y de memoria.^{6,7} Esta memoria celular es un componente característico de la respuesta adaptativa, en el cual, las clonas de memoria permanecen en estado quiescente pero ante un segundo reto antigénico responden de manera más rápida y eficiente.

Sin embargo, la activación y expansión efectiva de las células de la respuesta adaptativa particularmente de los linfocitos T no ocurre sin la participación de las células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Estas células innatas se encargan de procesar y presentar antígenos peptídicos en moléculas del MHC-I o MHC-II a linfocitos T ^{1,8,9}. Así mismo la expresión de moléculas de co-estimulación en la superficie de las APCs permite que los linfocitos T “Naive” se activen y diferencien de manera correcta. Entre las diferentes APC, las células dendríticas son las más importantes en el inicio de una respuesta adaptativa.

EL PAPEL DE LAS CELULAS DENDRITICAS DENTRO DE LA INMUNIDAD.

Caracterizadas por Ralph Steinman y Zanvil Cohn en 1973¹⁰, las células dendríticas (DCs) se encuentran dentro de el componente celular de la inmunidad innata. Son células hematopoyéticas totalmente diferenciadas capaces de unir la respuesta inmune innata con la respuesta inmune adaptativa¹¹⁻¹³.

Las DCs han demostrado ser las mejores en activar a linfocitos T “Naive”; con los cuales establecen una red compleja de señales que influye en la diferenciación y función de los linfocitos T. Esta interacción entre DCs y linfocitos T está determinada por el estado de maduración de las DCs, la localización tisular y el microambiente de citocinas presente¹⁴⁻¹⁸. La capacidad en la inducción de distintos tipos de respuestas inmunes por parte de las DCs se atribuye principalmente a la existencia de diversos subtipos especializados de estas células. Estos pueden ser clasificados en función del precursor, su perfil transcripcional, su localización anatómica y su funcionalidad, lo cual en conjunto muestra la complejidad de las DCs en la inmunidad^{13,19,20}.

Lo anterior posiciona a las DCs como una de las células centrales en la regulación e inducción de las diversas respuestas inmunológicas.

DESARROLLO DE LAS CELULAS DENDRITICAS.

Progenitores de DCs en ratón.

Las DCs son células hematopoyéticas que provienen de progenitores en medula ósea, siendo el primero de ellos el progenitor común de macrófagos y células dendríticas (MDP) caracterizado por la expresión de FLT3, CD115, c-kit y CX3CR1. Esta célula puede dar lugar al precursor común de monocitos (CMoP) o al precursor común de Células dendríticas (CDP)^{11,12,19,21}. Este último precursor está comprometido a la generación de células dendríticas y el cual se caracteriza por la expresión de FLT3, y la nula expresión de Ly6C. El CDP puede dar lugar a una pequeña proporción de células dendríticas plasmacitoides (pDCs) las cuales completan su maduración a través de un precursor transitorio pre-pDCs caracterizado por la expresión de FLT3, pérdida de la expresión de CD115 y la nula presencia de CD11c y SIRP α ¹⁹.

Por otro lado, el CDP puede diferenciarse a un pre-DC (caracterizado por la expresión de FLT3, CD11c y SIRP α) que migra de medula ósea a tejidos periféricos en donde da lugar a los distintos fenotipos de células dendríticas clásicas (cDCs)^{22,23}.

Citocinas para el desarrollo de las DCs.

FLT3/Csf-1

Para que un linaje se desarrolle y se diferencie adecuadamente a partir de progenitores, es necesaria la presencia de toda una gama de citocinas que ayudan a definir el compromiso hacia los fenotipos diferenciados. En el caso de las células dendríticas se han descrito un par de citocinas que generan la correcta diferenciación de los precursores en medula ósea así como el mantenimiento homeostático de las DCs en la periferia¹¹.

Principalmente se ha descrito que el ligando de FLT3 (FLT3-L) funciona como un factor clave en el desarrollo de las células dendríticas en medula ósea. Su expresión es constitutiva en células estromales, células endoteliales y en linfocitos T activados, mientras que su receptor asociado (FLT3 o CD135) es expresado en progenitores linfoides (CLP) y mieloides (MLP). Esta expresión es mantenida en precursores tardíos y tempranos asociados a células dendríticas, se sabe que la ausencia tanto del receptor como del ligando, impacta de manera

negativa en la frecuencia de MDPs, CDPs y preDCs así como en las cDCs^{24,25}. De tal forma que la vía FLT3/FLT3L es determinante en el desarrollo y diferenciación de las cDCs

SUBTIPOS DE DCS

Considerando el desarrollo de las DCs a partir de precursores, se han descrito 2 subtipos de células dendríticas que son las células dendríticas clásicas (cDCs) y las células dendríticas plasmacitoides (pDCs)²⁶⁻²⁹. Sin embargo, se ha propuesto tanto en ratón como en humano la existencia de DCs originadas a partir de monocitos, estas células son conocidas como Células Dendríticas Inflamatorias (InfDCs)^{21,30,31}.

Células dendríticas clásicas (cDCs)

Las cDCs se encuentran tanto en tejidos linfoides y no linfoides en donde se localizan de manera estratégica para cumplir con su función clásica de centinelas encargadas de detectar señales asociadas a patógenos o señales de daño. En estado homeostático las cDCs se caracterizan por la alta expresión de la integrina CD11c y moderada expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en la superficie, así como la expresión de diversos PRRs. Cuando estas cDCs se activan por distintos estímulos inflamatorios, incrementan la expresión de MHC-II en la superficie, moléculas de co-estimulación como CD80/CD86 y se caracterizan por migrar a ganglio linfático en donde se encargan de presentar antígeno a los linfocitos T "Naive". Se ha descrito que a su vez las cDCs pueden subdividirse en 2 tipos funcionalmente distintos, las cDC1 y las cDC2^{23,26,29,32}. El desarrollo de cada subtipo de cDC es dependiente de la expresión de factores de transcripción muy particulares. En el caso de las cDC1 se sabe que su desarrollo está determinado por los factores de transcripción IRF8, ID2 y Batf3³³⁻³⁵, mientras que el desarrollo de las cDC2 está asociado a IRF4 en un mecanismo hasta el momento poco descrito^{36,37}. Sin embargo, se sabe que los patrones de expresión de moléculas de membrana es distinto entre los tejidos linfoides y no linfoides lo que sugiere que la diferenciación de las cDCs concluye una vez que se encuentran en el tejido^{21,28,38}.

Sumado a lo anterior, se sabe que cada subtipo de cDCs tiene una función distinta en el montaje de la respuesta inmune, esto debido a la expresión de distintos PRRs con los cuales cada subtipo de cDC puede reconocer a diversos patógenos contra los cuales se expresan citocinas de manera diferencial con el fin de montar una respuesta de T adecuada a el tipo

de patógeno (IL-23, IL-15, IL-12). Se ha descrito que el papel de las cDC1 es la inducción de la respuesta inmune en contra de patógenos intracelulares y virus, así como contra tumores. Por otro lado, las cDC2 se ha descrito que participan en la respuesta inmune en contra de patógenos extracelulares³⁹. Se sabe que la ausencia de las cDC2 impacta en la protección en contra de patógenos fúngicos como *C.albicans*^{26,27}.

Células dendríticas inflamatorias (InfDCs)

Las células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) o células dendríticas inflamatorias (infDCs) han sido identificadas como DCs CD11c+, MHC-II+, CD11b+, F4/80+, Ly6C+ diferenciadas a partir de monocitos. Las cuales están presentes exclusivamente en tejidos linfoides y periféricos bajo condiciones inflamatorias muy particulares como la infección cutánea asociada a *L.major* y la infección sistémica asociada a *L.monocytogenes*⁴⁰. Sin embargo, reportes recientes han identificado la presencia de InfDCs en otras condiciones inflamatorias como infecciones por herpes virus, bacterias Gram positivas, entero bacterias y mycobacterias así como en procesos inflamatorios como artritis reumatoide y encefalomiелitis autoinmune experimental³¹.

El desarrollo de las InfDCs es poco claro. Estudios señalan que los monocitos con alta expresión de Ly6C son los que pueden diferenciarse hacia infDCs en presencia de GM-CSF. Aunado a esto se observó que los ratones deficientes de FLT-3 presencia de InfDCs no se ve afectada, señalando una diferencia ontogénica con las cDCs⁴¹.

Se sabe que el reclutamiento de las infDCs a los tejidos inflamados, es dependiente de CCR2 mientras que la migración de las InfDCs hacia ganglio linfático es dependiente de CCR7^{42,43}. Se ha descrito que estas infDCs, al igual que las cDCs, poseen la capacidad de activar a los linfocitos T "Naive" tanto CD4 como CD8 y que el fenotipo de Linfocito T cooperador (Th) diferenciado es dependiente del microambiente inflamatorio del cual provenga la InfDC. Sin embargo, existen pocos estudios donde comparen la eficiencia de migración y activación entre las cDCs y las InfDCs^{42,44}.

FENOTIPO DE DCS Y LOCALIZACIÓN ANATÓMICA

Dado que la clasificación de las DCs basada en su desarrollo a partir de precursores no refleja la diversidad de estas células, la descripción desde una perspectiva fenotípica y anatómica es útil para comprender la complejidad de las DCs y su función en la inmunidad. Las células dendríticas pueden residir en tejidos linfoides como los ganglios linfáticos, en donde se encargan de censar antígenos propios o derivados de microorganismos, procesarlos y presentarlos a los linfocitos T “Naive” para inducir tolerancia o respuesta inmune²⁷. Así también las DCs pueden encontrarse en tejidos no linfoides en los cuales cumplen con la misma función censar antígenos, sin embargo estas células requieren migrar a ganglio linfático (LN) para cumplir con su función de APC^{32,38}.

DCS EN TEJIDOS NO LINFOIDES

En los tejidos periféricos (Tejidos no linfoides) las DCs cumplen con su función de centinelas de la inmunidad ya que aquí entran en contacto con diversos estímulos que comprometen la homeostasis de los tejidos²⁷. En caso de existir una disrupción del tejido, las DCs censan las señales asociadas a daño o a patógenos y migran al ganglio linfático para poder activar y diferenciar a linfocitos T¹⁶.

Entre los tejidos no linfoides destaca la piel la cual es uno de los órganos mas grandes del cuerpo. Está compuesta por una red celular compleja que involucra funciones tan importantes como la protección en contra de agentes patógenos en la cual participan principalmente células del sistema inmunológico⁴⁵. La piel sobresale como un tejido modelo en el estudio de las DCs ya que contiene una gran proporción de estas células tanto en el compartimento dermal como en el epidermal. En este sitio anatómico pueden encontrarse al menos 3 tipos de células dendríticas clásicas distribuidas de manera específica en los diversos estratos de la piel⁴¹.

DCs en la epidermis.

En la placa epidermal se encuentran las células de Langerhans (LCs) las cuales son las únicas células presentadoras de antígeno profesionales (APC) presentes⁴⁶. Siendo la primera línea de defensa en contra de microorganismos y alérgenos ambientales. Además de su papel en la inducción de la respuesta inmune adaptativa en contra de patógenos, las LCs son importantes en la inducción de tolerancia periférica debido a su estrecho contacto con antígenos de la microbiota comensal así como con auto-antígenos de la epidermis, en donde el TGF β secretado por queratinocitos regula la migración de las LCs a LN y por lo tanto la activación de Linfocitos T¹¹.

Las LCs se caracterizan por la expresión ubicua de CD207 (Langerina) además de la expresión de CD11b y F4/80 así como de marcadores clásicos de DCs como CD11c y MHC-II. Se ha caracterizado que su desarrollo es independiente de FLT3L y por lo tanto no comparten origen ontogénico con las cDCs. Estas células pueden diferenciarse a partir de monocitos y progenitores mieloides embrionarios a través de citocinas como M-CSF además de IL-34 secretada por queratinocitos^{41,46}.

En cuanto a la capacidad de estas células de activar a linfocitos T de manera diferencial, se sabe que las LCs tienen un papel importante junto con las cDC2 en la inducción de linfocitos Th17 así como Th2 y T foliculares^{36,47}. Se ha descrito que la ausencia de estas LCs impacta de manera negativa en los niveles plasmáticos de IgE. Aunado a esto se sabe que las LCs pueden activar a linfocitos T CD8⁺ mediante la presentación cruzada de antígeno, aunque en menor grado que las cDC1⁴⁸.

DC en la Dermis.

Entre las diversas células del SI presentes en la placa dermal se encuentran los fagocitos mononucleares como células dendríticas clásicas⁴¹. De estas, se ha descrito que pueden encontrarse al menos 2 subtipos en condiciones homeostáticas: las cDC1 y las cDC2. Ambas poblaciones tienen la capacidad de migrar a ganglio y participar en la inducción de la respuesta adaptativa así como en la inducción de tolerancia periférica⁴⁹. Cada uno de estos subtipos de cDCs residentes de tejido no linfóide posee características fenotípicas y funcionales muy particulares.

Por un lado las cDC1 presentes en piel se caracterizan por la expresión de la integrina CD103 así como marcadores de DCs como CD11c y MHC-II.⁵⁰ De igual manera se ha descrito que ciertas poblaciones de estas DCs CD103⁺ expresan CD207, un marcador

considerado exclusivo de las LCs hasta hace unos años⁵¹. Las DCs CD103+ también se caracterizan por la retención en la expresión de FLT3 en comparación con las CD11b+ las cuales retienen la expresión de SIRP- α , ambos marcadores asociados a células precursoras de DCs^{11,52}. Las DCs negativas para la expresión de CD103 en dermis se caracterizan por la alta expresión de la integrina CD11b y se les considera cDC2 ya que comparten una alta homología con las DCs CD8 α ⁻ residentes de ganglio linfático tanto funcional como fenotípica⁵³.

Las DCs CD11b de dermis son un grupo muy heterogéneo y difícil de caracterizar ya que comparten el marcador CD11b con macrófagos y monocitos los cuales a su vez pueden expresar MHC-II en condiciones de activación e inclusive niveles considerables de CD11c. De tal forma que la identificación de las DCs CD11b+ tiene que considerar marcadores característicos de macrófagos y monocitos como F4/80 o CD115 sumados a los marcadores clásicos de linaje negativo como CD3, CD19 y CD49b¹¹. Así mismo, en dermis pueden encontrarse LCs activadas en camino a ganglio linfático las cuales expresan CD11b haciendo aun mas compleja la descripción de las cDCs CD11b+^{46,54}.

En cuanto a funcionalidad son marcadas las diferencias entre cada fenotipo de DCs. Las DCs CD103+ por ejemplo pueden activar de manera mas eficiente a linfocitos T CD8+ en comparación con las CD11b+ y por lo tanto en montar una mejor respuesta en contra de patógenos intracelulares tanto virales como bacterianos⁵⁵⁻⁵⁷. Al igual que las DCs CD8 α ⁺ residentes de ganglio linfático, las DCs CD103+ realizan presentación cruzada, lo cual les permite presentar antígenos propios en condiciones homeostáticas y contribuir de esta manera con la generación de la tolerancia periférica⁵⁵.

Sumado a lo anterior se ha descrito que bajo condiciones de inflamación crónica las DCs CD103+ expresan en mayor proporción PD-L1 en comparación con las DCs CD11b, lo cual deriva en una mejor inducción de linfocitos T reguladores por parte de las DCs CD103+⁵⁸. Además se ha demostrado que las DCs CD103+ cumplen con un papel importante en la inducción de Linfocitos T foliculares en conjunto con las LCs⁵⁹.

A pesar de su heterogeneidad las DCs CD11b+ cumplen un papel importante en la activación de linfocitos T cooperadores y en la protección en contra de patógenos extracelulares así

como en el desarrollo de hipersensibilidades y alergias⁴³. Lo anterior mediado por la alta expresión de citocinas asociadas a la diferenciación de linfocitos Th2 y Th17⁶⁰. Tal es el caso de la IL-23 la cual perfila a los linfocitos T cooperadores hacia el fenotipo Th17 en conjunto con IL-6⁶¹. De igual manera se ha descrito que las DCs CD11b+ expresan en mayor cantidad TGF- β en comparación con las DCs CD103+ lo cual puede contribuir en el re-establecimiento de la homeostasis después de una condición inflamatoria crónica¹⁸.

ACTIVACION DE LAS DCS

Las DCs necesitan activarse para ejercer su función en la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Esta activación al igual que en otras células del sistema inmune innato se genera por el reconocimiento de moléculas inflamatorias como lo puede ser la presencia de microorganismos patógenos o condiciones de daño celular en el tejido a través de PRRs^{8,62}. La activación de las DCs involucra cambios fenotípicos y metabólicos que favorecen su función como APCs^{11,38}.

CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE LA ACTIVACION DE LAS DCS.

En estado homeostático, las DCs se encuentran en un estado no inflamatorio en donde la mayoría del tiempo se encuentran inmaduras, censando las señales del microambiente y estableciendo tolerancia periférica a través de la migración homeostática hacia LN en donde al presentar antígenos en un contexto deficiente de inflamación, se generarán clones de linfocitos T reguladores. Una vez que las células dendríticas censan PAMPs o DAMPs se activan e inician el proceso de maduración caracterizado por el procesamiento antigénico y la posterior presentación en moléculas de MHC, la cual se ve acompañada por la expresión de moléculas de co-estimulación para la correcta presentación de antígeno, como CD80/CD86 y CD40^{8,62}.

Este fenómeno está acompañado por cambios morfológicos en la DCs las cuales modifican su citoesqueleto para adquirir su morfología dendroide clásica, incrementando la superficie de contacto entre la célula presentadora y el linfocito T. Esto tiene como consecuencia un incremento en la capacidad de presentación de antígeno⁶³. Además, la activación de las DCs induce su migración al ganglio linfático mas cercano conocido como ganglio linfático drenante (dLN). Esta migración es necesaria para que la DCs cumplan con su función en la activación de linfocitos T "Naive"⁶⁴.

Se ha reportado que dicha migración es dependiente del receptor de quimiocinas CCR7 el cual se expresa en las DCs activadas. Este receptor guía a las DCs a través de los vasos linfáticos mediante la interacción con sus quimiocinas ligando CCL19 y CCL21, ambas expresadas constitutivamente por células presentes en ganglio linfático⁶⁵. De igual manera se ha reportado que la interacción de CCR7 con sus ligandos retroalimenta positivamente la expresión de moléculas de co-estimulación así como la expresión en la membrana de los complejos MHC-I/II-antígeno⁶⁶.

Derivado de la activación mediante PRRs se induce, en las DCs la expresión de citocinas pro-inflamatorias asociadas al factor de transcripción NF κ B. Tales como TNF- α , IL-6, IL-8 e inclusive la pro-IL-1. Esta última puede procesarse mediante la activación del inflamosoma y generar su escisión en IL-1 α e IL-1 β . De igual manera las DCs pueden expresar otras citocinas como IL-23, IL-12, INF γ , IL-10 así como TGF- β , estas últimas asociadas a la polarización efectiva de los diferentes fenotipos de linfocitos Th^{8,62,67}.

METABOLISMO DE LA ACTIVACIÓN DE LAS DCS

Otra consecuencia importante asociada a la activación de las DCs es la transición metabólica que sufren. Las DCs activadas tienen requerimientos metabólicos muy distintos en comparación con las DCs en reposo, así como con sus precursores. Estos cambios a nivel metabólico influyen en la correcta diferenciación y activación de las DCs e inclusive en su funcionalidad⁶⁸.

Se ha descrito que el mecanismo por el cual los precursores de DCs responden a FLT3-L y se reclutan en tejido está asociado a la vía de señalización de mTOR y que la activación de esta vía regula el metabolismo de las DCs en los distintos estadios tanto de diferenciación y maduración así como de activación⁶⁹.

Las DCs en reposo al igual que los precursores tienen incrementada la síntesis y oxidación de ácidos grasos aunque las DCs quiescentes son más glucolíticas respecto a los precursores, lo cual podría estar asociado a una fase de preparación ante una posible activación^{68,70}.

Durante la activación de DCs a través de PRRs existen al menos 2 estadios metabólicos: uno temprano y uno tardío. El estado de activación temprano se caracteriza por la activación de las vías de señalización asociadas a PRRs como son la vía de AKT y mTOR^{8,62}. También se ha observado que estas DCs activadas incrementan de manera substancial su consumo de glucosa y la secreción de lactato adquiriendo un fenotipo glucolítico. En el cual el metabolismo de la glucosa se convierte en el eje central para la supervivencia de las DCs. Sin embargo, en esta activación temprana las DCs siguen utilizando la síntesis de ácidos grasos como fuente de Acetil-CoA en el TCA.^{68,71}

La activación tardía de las DCs se establece horas (6 Horas aproximadamente) después de la activación del PRR, y se da cuando las vías de señalización desencadenan en la activación del factor de transcripción HIF1 α . En ese momento las DCs disminuyen la fosforilación oxidativa y los intermediarios del TCA son utilizados en procesos anabólicos como la síntesis de ácidos grasos y colesterol^{68,71}. Lo anterior con el fin de mitigar el estrés asociado al retículo endoplásmico causado por el incremento en la síntesis de citocinas y moléculas de co-estimulación. Así mismo se ha observado que algunos intermediarios del TCA acumulados en dicha transición metabólica pueden servir en procesos asociados a la remodelación de cromatina⁷² ya sea activando complejos remodeladores o inclusive sirviendo como sustrato en esta remodelación. Por ejemplo, al acumularse la Acetil-CoA puede servir como sustrato para la acetilación de histonas.

Aunado a lo anterior, algunas evidencias muestran que presencia de metabolitos (tanto endógenos como exógenos) característicos de la glucolisis o el TCA son suficientes para modular la activación de las DCs positiva o negativamente⁷³. Por ejemplo, la presencia de lactato exógeno favorece la estabilización de HIF1 α retroalimentando positivamente el establecimiento de la glicolisis aerobia⁷⁴. También se ha descrito que HIF1 α puede activarse con la acumulación de succinato endógeno en DCs altamente glucolíticas que presentan el fenómeno de Warburg^{75,76}. Es así como los intermediarios metabólicos en las DCs no solo cumplen con funciones anabólicas o catabólicas ya que también pueden cumplir funciones importantes en la señalización celular tanto en la activación de las DCs como en la regulación de su función.

Lo anterior respecto a la modulación por intermediarios metabólicos, adquiere importancia en la activación de las DCs y el sistema inmune innato en general ya es este componente es el blanco principal en estrategias de inmunización basadas en el uso de adyuvantes. Los cuales en su mayoría son moléculas ligandos de PRRs que favorecen la activación y direccionamiento de la respuesta inmune. Sin embargo, considerando la influencia de los metabolitos en el estado de activación de las DCs, resulta pertinente enfocar las estrategias de inmunización hacia el uso de adyuvantes que no solo influyan en la activación de PRRs, si no que también generen el perfil metabólico adecuado en estas células para la inducción de la respuesta adaptativa.

CTB COMO ADYUVANTE

La vacunación es sin duda uno de los mayores logros de la medicina moderna la cual requiere de la búsqueda de nuevos adyuvantes que activen la respuesta inmune de manera mas eficiente⁷⁷. En este sentido se han descrito diversos adyuvantes de nueva generación que han demostrado activar de manera eficiente al sistema inmune, además de ser mas seguros. Estos adyuvantes comprenden una amplia gamma de moléculas que de manera directa o indirecta activan a las células del sistema inmune innato.

Tal es el caso de la subunidad beta no tóxica de la toxina del cólera (CTB) la cual cumple con una función importante en el mecanismo de patogenicidad de la toxina del cólera (CT)⁷⁸ ya que es el principal factor de virulencia de *Vibrio cholerae*. La CTB está compuesta por un homopentámero de subunidades beta unidas de manera no covalente a un monómero alfa (CTA). Se sabe que la CTA es la subunidad con actividad biológica que funciona como cinasa que activa la AMPK lo que incrementa la cantidad de AMPc en el citoplasma. Esto genera un incremento en el flujo de iones calcio intracelular, así como la expulsión de iones sodio hacia el lumen intestinal lo cual genera el cuadro clásico del cólera.

Para que la CTA ejerza su función toxica en el citoplasma celular requiere de la unión de la CTB a la membrana externa de las células epiteliales de intestino. Esto ocurre mediante la unión estable al receptor GM1 presente en diversas células como las células epiteliales, neuronales, células T y APCs como DCs, macrófagos y linfocitos B. La unión de CTB a GM1 induce la endocitosis de la CT mediada por clatrin y viaja por vía retrograda del aparato de Golgi al Retículo endoplásmico en donde la CTA se escinde de la CTB y sale al citoplasma para ejercer su función^{79,80}. Además de su actividad tóxica se ha demostrado que la CT tiene

propiedades inmunogénicas y propiedades adyuvantes. Por ejemplo se ha demostrado que la CT activa APCs e inclusive mejora la presentación de antígeno, sin embargo por su actividad toxica la CT se ha descartado como adyuvante siendo el uso de la CTB mas prometedor que el oligómero de la CT^{78,80}.

Activación mediada por CTB

La CTB es el adyuvante principal en la vacuna Dukoral, diseñada para proteger en contra de la intoxicación con *V. cholerae*. Esta vacuna se ha probado de manera segura y eficiente tanto en niños como en adultos con pocos efectos adversos, generando protección durante 5 años en algunos individuos^{81,82}. Así mismo, estudios asociados a la inmunización en contra de *B. pertussis* han demostrado la efectividad del uso de la CTB como adyuvante en conjunto con antígenos de la bacteria. Esta inmunización generó un decremento en la carga bacteriana en vías respiratorias. Además la inmunización tanto intraperitoneal como intramuscular no demostró efecto adverso alguno⁸³. De tal forma que la CTB se perfila como un adyuvante seguro y eficaz que puede inducir protección duradera en modelos de inmunización en mucosas^{84,85}.

Sin embargo, el mecanismo asociado a la activación del sistema inmune por la CTB está poco descrito. Diversos ensayos de interacción proteica han sugerido al menos una decena de receptores a los que puede unirse la CTB además de GM1. Entre estos receptores destacan TLR4 , FcR γ , TREM2 , LMIR5 y SIGNR1⁸⁵ aunque solo se ha descrito que la CTB activa al sistema inmune mediante vía TLR4 y FcR γ ⁸⁶. Esta evidencia abre la posibilidad a que esta molécula pueda ser utilizada como adyuvante en el desarrollo de vacunas de nueva generación en contra de enfermedades de las cuales la vacunación ha sido inefectiva , como el HIV y el Ébola.

Cabe destacar que los esquemas de vacunación actuales, hacen uso de refuerzos con el fin de re estimular a la respuesta adaptativa para generar una protección mas robusta y eficiente. En estos refuerzos no solo se vuelve a administrar el antígeno si no también el adyuvante primario del cual a diferencia de la re estimulación antigénica, no se sabe muy bien cual sea su efecto en la inducción de la respuesta inmune.

Evidencia reciente ha demostrado que ciertas estirpes celulares después de la activación mediante un ligando de PRRs mejoran su funcionalidad cuando son re estimuladas con el mismo ligando e inclusive con ligandos distintos. Esto adquiere relevancia si se considera que la mayoría de las estrategias de inmunización tanto en el ámbito clínico como la investigación, utilizan como adyuvantes a ligandos de PRRs para mejorar la respuesta hacia el antígeno. Estos mecanismos cada vez mejor descritos han cambiado por completo la concepción clásica de la generación de memoria inmunológica.

ENTRENAMIENTO INNATO

En la inducción de memoria inmunológica existe el paradigma que establece que exclusivamente las células del sistema inmune adaptativo son capaces de desarrollar estos mecanismos sin embargo evidencia reciente señala que las células del sistema inmune innato también pueden adquirir estas características de memoria inmunológica.

Este mecanismo que pone en duda el paradigma sobre la función del sistema inmune innato es denominado entrenamiento inmune innato y se ha descrito como la capacidad que tienen células innatas para responder de mejor manera ante un segundo estímulo infeccioso, lo cual es similar a lo observado en la memoria inmunológica de la respuesta adaptativa. Dicho mecanismo se había descrito tiempo atrás en organismos carentes de memoria inmunológica clásica como los animales invertebrados e inclusive los vertebrados sencillos^{87,88}. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que macrófagos, monocitos y células NK de mamíferos como ratones y humanos (animales vertebrados complejos) son capaces de desarrollar estas características de entrenamiento inmune innato^{77,89}.

Se ha descrito que las células innatas incrementan su tiempo de vida media después de una primer activación mediante PRRs^{90,91}. Además, esta activación genera una impronta en las células entrenadas lo que mejora su funcionalidad cuando son re-estimuladas con un agente inflamatorio igual o distinto al primero. Algunas de las características funcionales que se han visto modificadas son la expresión de citocinas, ya que la re-estimulación genera un incremento sustancial en la expresión de citocinas inflamatorias como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ ^{92,93}.

La evidencia que soporta la existencia de este mecanismo se basa en estimulaciones *in vitro* de fagocitos mononucleares (Macrófagos y Monocitos) con dosis muy bajas de ligandos de

PRRs como β -glucano e inclusive microorganismos completos como *C.albicans* y BCG^{94,95}. Así mismo se ha demostrado que las células NK se entrenan al reconocer moléculas de la cápside viral de CMV y la protección derivada de este entrenamiento puede durar hasta 4 semanas después del estímulo entrenador^{2,96}.

Este estímulo entrenador como su nombre lo indica es el encargado de inducir el entrenamiento inmune innato en estas células, ya que es el primer estímulo que reciben las células y el que desencadena toda la dinámica molecular que establece el entrenamiento inmune innato. Además, para que las células puedan responder al segundo estímulo igual o diferente al estímulo entrenador es necesario un periodo de descanso de al menos 5 días^{93,97}.

En este contexto existen diversos estímulos que funcionan como estímulos entrenadores en células del sistema innato, todos son ligandos de PRRs y convergen en la vía de señalización que activan⁹⁸. Hasta ahora los estímulos entrenadores más estudiados son *C.albicans* y el derivado molecular de su pared celular β -glucano⁹⁹⁻¹⁰². Sin embargo también se ha observado que moléculas ligando de TLRs pueden inducir características de entrenamiento inmunológico como flagelina, muramil dipeptido y oligonucleótidos CpG^{103,104}. Además, otros microorganismos aparte de *C.albicans* y BCG pueden inducir estas características como el agente causal de la malaria *Plasmodium falciparum*.¹⁰⁵ Así mismo, algunos reportes indican que la presencia de IL-1 β es suficiente para generar un fenotipo parecido al entrenamiento en astrocitos retados con *E.coli* ¹⁰⁶. También se ha demostrado que la estimulación con IL-1 β recombinante en ratones granulopénicos es suficiente para generar protección en contra de una infección letal con bacterias Gram negativas¹⁰⁷.

Sin embargo, el estudio de las características de entrenamiento inmunológico no se ha descrito desde una perspectiva *in vivo*. La única información que se tiene sobre este fenómeno *in vivo* es la protección heteróloga generada por la vacunación tanto de ratones como humanos con BCG^{92,97}. Este fenómeno se refleja en un incremento en la expresión de IL-6 y TNF α cuando los PBMCs de los sujetos vacunados fueron estimulados *ex vivo* con LPS.

Interesantemente estos trabajos con BCG también han demostrado que los monocitos circulantes en sangre periférica retienen la impronta asociada al entrenamiento durante

muchos meses después de la inmunización. Esto ha llevado a pensar que el entrenamiento de alguna forma repercute en los precursores de las células innatas entrenadas.

Respecto a esto, un par de acercamientos han demostrado que después de la estimulación intraperitoneal en ratones con β -glucano incrementa la hematopoyesis, específicamente en los precursores de fagocitos mononucleares y que estos precursores poseen una impronta genética asociada a el entrenamiento¹⁰⁸. En este trabajo demuestra que estos precursores obtenidos de ratones que fueron entrenados con β -glucano responden mejor a la estimulación con LPS que los grupos control. Así mismo se ha demostrado que esta impronta es la encargada de la activación crónica en monocitos de ratones sometidos a una dieta rica en grasas y que esta activación es dependiente de NLRP3 e IL-1 β ¹⁰⁹.

DINAMICA MOLECULAR DEL ENTRENAMIENTO INMUNE INNATO.

La caracterización del establecimiento del entrenamiento inmune innato hace uso de distintos esquemas de inducción, así como de distintas estirpes celulares. Se ha estudiado principalmente en monocitos de sangre periférica, así como en macrófagos derivados de médula ósea. Los cuales son re-estimulados como mínimo 5 días después del estímulo entrenador para establecer el periodo de descanso. Sin embargo hay trabajos en los que la re-estimulación se realiza hasta 28 días después del estímulo entrenador^{92,93,99}. A pesar de lo heterólogos que resultan estos esquemas de inducción de entrenamiento inmunológico se ha logrado establecer la dinámica molecular de este fenómeno la cual comprende modificaciones metabólicas y epigenéticas que mejoran la función de las células^{94,110}. Cabe señalar que al menos las modificaciones metabólicas observadas en el entrenamiento innato también se han descrito en la activación misma de las células innatas^{6,8}. De tal forma que este fenómeno podría confundirse con un estado de activación crónica en las células. Sin embargo, el establecimiento del periodo de descanso previamente mencionado es suficiente para discernir entre células innatas activadas crónicamente y células innatas entrenadas.

Respecto a las similitudes entre células innatas entrenadas y activadas crónicamente, se ha asociado un estado metabólico altamente glucolítico a estas células entrenadas de manera análoga a lo sucedido en la activación normal de las células innatas mediante PRRs⁸⁹. Sin embargo, se ha demostrado que la capacidad glucolítica de las células entrenadas es muy superior a la capacidad glucolítica de las células activadas. Lo anterior demostrado por un incremento en la acidificación extracelular (ECAR), así como un incremento de intermediarios moleculares asociados a esta vía como el lactato^{70,94}.

De igual forma se ha demostrado que la expresión de enzimas características de la glucólisis aerobia es mucho mayor en células entrenadas. Como lo es un incremento en la expresión de enzimas clave en el mantenimiento del estado glucolítico de la célula como la Hexocinasa 2 (HK2) así como Fosfofructocinasa (PFKP). También puede haber un incremento en la expresión de la Lactato deshidrogenasa (LDH). lo que correlaciona con el incremento de la acidificación extracelular y la secreción de lactato en las células entrenadas^{92,94}.

Por el contrario algunos reportes señalan que la expresión de Piruvato deshidrogenasa (PDH) se regula a la baja y por lo tanto el TCA también^{70,89}. Sin embargo, esto no descarta que rutas anapleróticas del TCA suplan el decremento del piruvato que ingresa a la mitocondria para así mantener el ciclo y la cadena transportadora de electrones. Se ha descrito que una de estas vías es la del metabolismo de la glutamina la cual entra al TCA en forma de α -cetoglutarato mediante la transaminación de glutamato a través de glutaminasa (GLS) y Glutamato deshidrogenasa (GLUD). La expresión de estas enzimas incrementa en monocitos entrenados^{94,111}.

Así mismo en macrófagos entrenados ha sido descrito que incrementa el ratio de NAD⁺/NADH, lo que se asocia con la desregulación del TCA como fuente central de ATP siendo suplido por la actividad glucolítica. En contexto con esto, en estos macrófagos entrenados hay un incremento de intermediarios moleculares asociados al TCA como succinato y fumarato los cuales en conjunto con el NAD⁺. Estas moléculas pueden servir como activadores o represores de complejos remodeladores de la cromatina y por lo tanto afectar la epigenética de las células entrenadas^{110,112}. Además, ambos intermediarios metabólicos cumplen con funciones importantes en el establecimiento de la inflamación. Se sabe que tanto el fumarato como el succinato funcionan como moléculas estabilizadoras de HIF1- α mediante la inhibición de las prolihidroxilasas^{75,76,111}. De igual forma se ha descrito

que el succinato se une a su receptor en células dendríticas y a través de un incremento en el flujo de calcio sinergiza la activación de TLRs, particularmente el 3 y el 7⁷⁵.

Por último se sabe que en estas células entrenadas uno de los intermediarios metabólicos que más se acumula es el aspartato. Esta molécula es importante en el transportador de malato, ya que se encarga de transportar el malato hacia el exterior de la mitocondria en anti-sentido al ingreso del aspartato. Además, el incremento de malato en el exterior de la mitocondria genera que se intercambie esta molécula por acetil coenzima A para que esta sirva como precursor en la síntesis de ácidos grasos y de colesterol.

Esta última ruta metabólica, también se modifica en el entrenamiento inmune innato^{89,111}. Por ejemplo, los monocitos entrenados con β -glucano o con proteínas lipídicas oxidadas como oxLDL, sobre expresan enzimas clave en la ruta de síntesis del colesterol. Sin embargo el entrenamiento observado puede inhibirse con el uso de fármacos que bloquean esta vía como la fluvastatina¹¹³. También se demostró que el entrenamiento no se asocia a el colesterol, si no a intermediarios de la vía así como la actividad de la enzima *HMG-CoA reductasa* la cual genera la acumulación de mevalonato¹¹³. Este incremento es capaz de inducir características de entrenamiento innato a través de la modulación positiva del receptor de factores de crecimiento (IGF1-R)¹¹³. De manera interesante en este estudio demuestran que los pacientes con síndrome de hiper inmunoglobulina D, que son deficientes de la mevalonato cinasa presentan un fenotipo parecido a el entrenamiento innato y abren la posibilidad a la modulación metabólica de este padecimiento¹¹³.

Se ha descrito que las vías de transducción de señal asociadas a la inducción de el entrenamiento son vías anabólicas clave en la función celular como lo es la vía de AKT-PI3K-mTOR-HIF1- α las cuales al activarse generan el perfil metabólico en las células entrenadas y a su vez influyen en el control transcripcional de la célula entrenada¹¹⁴.

CAMBIOS EPIGENETICOS DERIVADOS DEL ENTRENAMIENTO INMUNE INNATO

El control transcripcional asociado a el entrenamiento inmune innato, funciona a nivel epigenético. Se ha descrito que diversos intermediarios metabólicos que se acumulan en el entrenamiento funcionan a su vez como activadores o represores de complejos remodeladores de cromatina¹¹⁰. Tal es el caso de la activación de acetiltransferasas de histonas las cuales se activan en respuesta al incremento de Acetil coenzima A derivado de el incremento en la síntesis de ácidos grasos. Se sabe que la actividad de las

acetiltransferasas de histonas esta fuertemente relacionada con el incremento de marcas permisivas en la cromatina¹¹⁵. Así mismo se sabe que durante la inducción del entrenamiento inmune innato, se activa de manera transitoria la enzima Sirtuina 1 en respuesta al incremento de NAD⁺. Esta enzima participa en la deacetilación de histonas y por lo tanto en la adquisición de marcas restrictivas en los promotores de los genes blanco. Estos trabajos muestran que en la dinámica del control transcripcional a nivel epigenético en el entrenamiento inmune innato no solo se activan remodeladores permisivos de la cromatina si no también remodeladores restrictivos^{94,110}. Esta activación transitoria de la Sirtuina 1 en células entrenadas sugiere la remodelación en sitios distintos a los asociados a la función efectora de las células. Por ejemplo, podrían ser sitios de la cromatina asociados a la inducción de apoptosis lo que explicaría el incremento en el tiempo de vida media de las células entrenadas¹⁰⁰.

Sumado a lo anterior se sabe que la acumulación de α -Cetoglutarato y Succinato participa en la dinámica de la actividad de las enzimas de la familia TET, las cuales están asociadas a la demetilación de histonas lo que genera una disminución de marcas restrictivas en la cromatina¹¹⁶. Así mismo se ha descrito que el succinato pueden influir en la activación de el complejo JMJD que tiene un papel importante en la metilación de histonas y por lo general en la represión de la actividad de la cromatina¹¹⁷. Sin embargo, esta dinámica resulta compleja si se considera que el α -Cetoglutarato acumulado en el entrenamiento inmune innato funciona como inhibidor de estas enzimas remodeladoras de la cromatina¹¹¹.

Sin embargo, el código de las marcas de histonas es heterogéneo ya que no siempre la metilación de las histonas funciona como marca restrictiva de la transcripción o la acetilación no siempre se asocia con marcas permisivas. Esto depende del aminoácido en donde se realice la modificación y además en que histona del nucleosoma se realice. Si se considera además que estas dos marcas no son las únicas que pueden encontrarse en las histonas, la interpretación de estas modificaciones epigenéticas y su participación en el entrenamiento inmune innato se vuelve aun mas compleja¹¹⁸.

Se ha descrito que las marcas epigenéticas mas enriquecidas en el entrenamiento innato son las marcas permisivas de la histonas cercanas a las regiones de los promotoras de los genes de moléculas clave en el entrenamiento inmune innato^{73,115}. Particularmente estudios

tanto en monocitos como en macrófagos entrenados indican que existe un incremento en marcas permisivas en las histonas cercanas a los promotores de citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α ¹¹¹. De igual forma estos estudios demuestran que estas marcas permisivas también se enriquecieron en los promotores de enzimas clave en la glicolisis aeróbica como HK2 , PFKP , GLS y GLUD¹¹¹.

Las marcas observadas son la triacetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27AC3) así como la trimetilación de la lisina 4 de la misma histona (H3K4Me3)⁹³. La primera marca se asocia con una actividad transcripcional alta y se localiza normalmente en sitios cercanos a el inicio de la transcripción sin embargo esta marca se considera transitoria. La segunda se asocia a el mantenimiento de la actividad de los promotores aun cuando no exista actividad transcripcional alguna, lo que mantiene la accesibilidad de la cromatina¹¹⁹. También se ha demostrado que en estos promotores se disminuye la cantidad de marcas represivas en las histonas ya que existe un decremento en la trimetilación del residuo 9 de lisina de la histona 3 (H3K9Me3)^{25,93,115}.

De tal manera que en conjunto estas marcas tanto permisivas como restrictivas son las encargadas del incremento en la expresión de citocinas inflamatorias y por lo tanto de el incremento en la funcionalidad de las células entrenadas. De igual forma el incremento en la transcripción de genes asociados a la vía de la glicolisis sirve para sostener el fenotipo glucolítico de las células entrenadas⁹⁴.

Sin embargo, poco se ha explorado en el contexto epigenético y en general en el entrenamiento inmune innato sobre la duración de este fenotipo. Que tan prolongado es el fenotipo glucolítico y si este también se abate en el periodo de descanso. Lo cual también lleva a preguntarse si estas marcas epigenéticas son transitorias y si es posible que en la inducción de este entrenamiento se enriquezcan otras marcas tanto en histonas como en el material genético mismo. De igual manera aun no se ha determinado si esta permisividad en la cromatina también se asocia a otros sitios importantes en la transcripción como sitios promotores distantes (enhancer) o inclusive si en este fenómeno existe un recambio de histonas en los nucleosomas involucrados en el incremento de la transcripción.

Es así como la descripción de la reprogramación epigenética en las células entrenadas requiere de mayor profundización respecto a la dinámica de la activación de los complejos remodeladores de la cromatina y sus blancos específicos en el entrenamiento innato.

Interesantemente son pocos los estudios respecto al entrenamiento inmune innato en células dendríticas. Considerando que estas células son el puente entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa resulta de vital importancia determinar si esta estirpe celular es capaz de desarrollar este entrenamiento inmune innato y como impacta en su funcionalidad. Los estudios que vinculan el entrenamiento y las DCs utilizan células diferenciadas *in vitro* con GM-CSF a partir de células de médula ósea, así como derivadas de monocitos *in vitro*¹⁰⁵. Sin embargo estudios recientes han demostrado que estas células obtenidas *in vitro* no comparten ninguna similitud con las DCs clásicas encontradas en ratones y humanos^{28,35}. De igual forma no se han realizado estudios de re-estimulación *in vivo* utilizando adyuvantes en ningún esquema de inducción de entrenamiento innato dejando la interrogante sobre la importancia de este fenómeno en condiciones fisiológicas reales.

ANTECEDENTES DIRECTOS.

En la búsqueda de nuevos adyuvantes que puedan activar a las DCs, estudios realizados en nuestra unidad de investigación han revelado que la CTB es capaz de activar a las DCs de manera tardía (72 horas después de su inoculación en piel). Esta activación fue evaluada por la expresión de CD86, la cual se mantiene hasta el día 7 en el sitio de inoculación¹²⁰. También se observó que la CTB es capaz de incrementar los números absolutos de DCs tanto en el sitio de inoculación como en el ganglio linfático drenante. Sumado a lo anterior, cuando la CTB se utiliza en conjunto con un sistema de direccionamiento de antígeno a DCs (DEC205) de piel se favorece la generación de linfocitos T residentes de tejido. Además, se observó que estos linfocitos no solo se reclutan en el sitio de inoculación sino también a tejidos periféricos distantes como intestino y pulmón¹²⁰. Además, este modelo de direccionamiento de antígeno adyuvado con CTB, demostró protección a largo plazo en modelos de melanoma murino e infección por rotavirus en comparación con los grupos control. De manera interesante, se observó que en esta inmunización se inducen preferencialmente los perfiles Th1 y Th17 en los linfocitos T CD4+ activados¹²⁰. La presencia de una activación tardía y sostenida lleva directamente al planteamiento sobre la posible inducción de entrenamiento inmune innato en DCs mediada por CTB. En este

sentido, Tepale Segura en su tesis de maestría demostró que la activación de DCs con CTB se asocia principalmente a DCs CD11b⁺ e interesantemente a InfDCs. Lo anterior demostrado por un incremento significativo en la expresión de CD86 en ambos fenotipos. Es de resaltar que estas DCs estimuladas *in vitro* con LPS muestran una mayor expresión de TNF α respecto a las DCs estimuladas con LPS provenientes de ratones control. Sumado a esto también se observó un incremento en la proporción de DCs TNF α + en los ratones inoculados con CTB.

De tal forma que estos resultados sugieren fuertemente que las DCs pueden adquirir características de entrenamiento inmune innato, al menos en el incremento en la expresión de citocinas, así como el incremento en los números totales.

Derivado de estos antecedentes, resulta importante determinar si estas DCs adquieren otras características de entrenamiento inmune innato como lo es la transición metabólica en un contexto de re estimulación *in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

La activación no clásica en DCs mediada por la CTB en modelos de inmunización murinos apunta claramente a que este adyuvante pudiera estar induciendo características de entrenamiento inmune innato en dichas células. De igual forma, los ensayos de re estimulación *in vitro* realizados en el laboratorio suman evidencia para asumir que este entrenamiento inmune innato puede ser adquirido por las DCs.

Es así que el propósito de este trabajo es determinar si las características de entrenamiento inmune innato ,observado *in vitro*, reproducen en un modelo de re estimulación *in vivo*. Lo anterior para demostrar si las DCs pueden adquirir el fenotipo de entrenamiento, utilizando un adyuvante seguro y eficaz del cual se ha explorado poco sobre su impacto en la re estimulación en los sistemas de refuerzos de vacunación.

PREGUNTA DE INVESTIGACION.

¿La CTB induce cambios a nivel funcional y metabólico característicos de entrenamiento inmune innato en DCs de la piel *in vivo*?

HIPOTESIS.

La inoculación de CTB inducirá características de entrenamiento inmunológico en Células Dendríticas de piel que generarán cambios a nivel funcional y metabólico.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar cambios a nivel funcional y metabólico en Células Dendríticas de la piel que determinen la capacidad de la CTB de inducir características de entrenamiento inmunológico *in vivo*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar si la CTB induce características de entrenamiento inmune innato *in vivo* en DCs de Piel y Ganglio Linfático.
- Determinar si la inducción de características de entrenamiento inmune innato *in vivo* impacta en el reclutamiento de los precursores de DCs en piel y Ganglio Linfático.
- Evaluar si la inducción de entrenamiento inmune innato *in vivo* de DCs de piel y Ganglio Linfático impacta en estado metabólico de estas células.
- Determinar si la inducción de entrenamiento inmune innato *in vivo* impacta en la expresión de moléculas de co-estimulación.

MATERIALES Y METODOS.

RATONES.

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 8 a 12 semanas, libres de parásitos y patógenos. Fueron alimentados con “LabDiet 5010 Autoclavable Rodent diet” (LabDiet, Estados Unidos) y agua *ad libitum*. Fueron provistos por el bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina U.N.A.M. del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Todos los experimentos fueron conducidos en concordancia con el Comité local de investigación en salud (Protocolo 3601). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética animal de la facultad de medicina U.N.A.M. Siguiendo la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

MODELO DE INOCULACIÓN.

Ratones C57BL/6 con las características mencionadas previamente, fueron inoculados vía intradérmica en la oreja con 5µg de CTB o con el vehículo (PBS estéril). Transcurridos 7 días fueron re estimulados con la misma cantidad de CTB o el vehículo y fueron sacrificados 7 días después mediante dislocación cervical.

OBTENCIÓN DE CELULAS TOTALES DE PIEL Y GANGLIO LINFATICO DRENANTE

PIEL.

Se obtuvieron las orejas de los ratones sacrificados y se separó la parte ventral y dorsal para posteriormente incubar con Liberasa (25µg/mL) y DNAasa (0.125 mg/mL) durante 45 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se cortó el tejido en partes pequeñas y se incubaron en las mismas condiciones en agitación constante a 200 RPM. Terminada la incubación se detuvo la digestión enzimática mediante la adición de EDTA 0.5 M y las suspensiones celulares se pasaron a través de un filtro de 70 µm seguido de la adición de DNAasa (0.125 mg/mL). Finalmente, las células se resuspendieron en medio de cultivo R-10 y se tomó una alícuota para realizar la cuenta celular o realizar tinción de superficie o intracelular.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE GANGLIO LINFÁTICO DRENANTE.

Se obtuvieron los ganglios linfáticos drenantes de piel de los ratones sacrificados y fueron disgregados en medio con Liberasa (25µg/mL) y DNAasa (0.125 mg/mL), durante 25 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción con EDTA 0.5M, a continuación, se filtró la suspensión celular a través de una malla de organza. Finalmente, las células se resuspendieron en medio de cultivo R-10 y se tomó una alícuota para realizar la cuenta celular con citómetro de flujo o para realizar tinción de superficie o intracelular.

ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA CITOMETRIA DE FLUJO E INMUNOFLUORESCENCIA

CITOMETRIA DE FLUJO:

Para la tinción de citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos : Anti-MCH-II/FITC (Biolegend), Anti-CD11c/Texas Red (Biolegend), Anti-CD11b/BV510 (Biolegend) , Anti-Ly6C/APC-Cy7(Biolegend) , Anti-CD45/APC (Biolegend), Linaje(Anti-CD3 ,Anti-CD19, Anti-CD49b, Anti-TER119)/PERCP (Biolegend), Anti-TNF α /PE (Biolegend), Anti-CD86/PE (Biolegend), Anti-CD103/PE-Cy7 (Biolegend) , Viabilidad-Hoechst 33258 (Life Technologies).

Para los ensayos de Inmunofluorescencia se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: IgG de Conejo Anti-LDH (AbCam), Anti-CD11c/Biotina (ThermoFisher), AntiCD11b/eF660 (Biolegend), AntiLy6C/PE (Biolegend) y fueron revelados con los siguientes anticuerpos secundarios: Anti-IgG Conejo/ AF488 (Jackson Immuno Research Lab), Streptavidin/Texas Red (Jackson Immuno Research Lab) o Streptavidin/APC (ThermoFisher). Los Núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (Life Technologies).

CITOMETRIA DE FLUJO

La Fenotipificación de aproximadamente 1×10^5 de células se realizó incubando a las células por 20 minutos a 4 °C con anticuerpos anti- MHC-II-FITC, CD11c-PE, CD103-PECy7, CD11b-BV510, Ly6C-APC/Cy7, linaje- (CD3, CD19, TERR119, CD49b)-PERCP, viabilidad-Hoechst33258 y CD45-APC. Seguido de 2 lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente

las células fueron fijadas y permeabilizadas durante 15 minutos con ρ -Formaldehído al 4% ^{v/v} en el caso de la tinción superficial o utilizando el kit “permeabilization and fixation buffer set” (Biologend) en el caso de la tinción intracelular con antiTNF- α -PE.

Todas las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Aria III (B.D.) del Centro de Instrumentos (CIS) del Centro Medico Nacional Siglo XXI y analizadas con el Software Flowjo 8.7 (Tree Star, Ashland, OR, United States)

CONTEO DE NUMEROS ABSOLUTOS

Para el conteo de números absolutos se tomaron alícuotas de 20 μ L de las células purificadas y se agregaron 20 μ L de una suspensión con anti-CD45/PE-Cy7 y se incubaron durante 20 minutos a 4°C.

Al momento de la adquisición en el citómetro se agregaron 55 μ L de DAPI 1:5000 y 5 μ L de perlas de conteo “CountBright™ Absolute Counting Beads” (Life Technologies).

Los números absolutos se calcularon de la relación entre el número de perlas contadas, y su proporción con las células de interés en la muestra adquirida, utilizando la siguiente fórmula:

$$\#Células = \frac{(Células\ Contadas) * (\#Perlas)}{(Perlas\ Contadas) * (Volumen\ Adquirido)} * Volumen\ de\ la\ muestra$$

Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Canto II (B.D.) del Centro de Instrumentos (CIS) del Centro Medico Nacional Siglo XXI. Y analizadas con el Software Flowjo 8.7 (Tree Star, Ashland, OR, United States).

INMUNOFLOURESCENCIA

Para los ensayos de microscopia de fluorescencia, los tejidos obtenidos de ratones C57BL/6 fueron incluidos en Tissue Tek (SAKURA). Se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ m de grosor los cuales se fijaron con p-Formaldehído al 4% durante 20 minutos. Después fueron rehidratados con un tren de etanol al (96, 80 y 50%) ^{v/v}, se lavaron con PBS los tejidos y se trataron con una solución de citratos a 90°C durante 20 minutos para recuperar las estructuras antigénicas del tejido. El tejido fue lavado con PBS durante 5 minutos y se permeabilizó durante 2 horas con solución de bloqueo y permeabilización (PBS, Triton 0.2%, BSA 1% y 2mM de Azida de sodio). Transcurrido el tiempo se descartó la solución y se agregaron los anticuerpos primarios en un volumen aproximado de 50ml y se dejaron incubar

toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. Cumplido el tiempo de incubación se realizaron 5 lavados de 5 minutos con “solución de bloqueo y lavado”. Los anticuerpos secundarios se incubaron cada uno durante dos horas a temperatura ambiente y agitación constante. Después se realizaron 5 lavados de 5 minutos con “solución de lavado” (PBS, BSA 1% y 2mM de Azida de sodio) por cada incubación de anticuerpos secundarios. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (diluido 1:5000) durante 10 minutos y se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS. Se agregó solución de montaje para microscopia de fluorescencia “VectaShield” (VectorLabs) y se cubrieron los tejidos. Al día siguiente se adquirieron las imágenes en el microscopio confocal de fluorescencia Nikon A1 con el aumento 20x y se analizaron con el Software ImageJ y FIJI (NIH).

ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se realizó con el software Prism 6 (GraphPad Software Inc.) y se realizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una y dos vías seguida de una prueba de Tukey para determinar entre que grupos existía diferencia significativa. Una $P < 0.05$ fue considerada como significativa.

RESULTADOS.

Para poder evaluar el papel de la re-estimulación *in vivo* en células entrenadas con CTB se realizó un esquema con duración total de 14 días. En el cual la estimulación al día 1 fue denominada como “entrenamiento prolongado” y al día 7 se denominó “entrenamiento clásico” (Dado que es el esquema utilizado frecuentemente para inducir entrenamiento). Así mismo la doble estimulación *in vivo* se realizó al día 1 y al 7.

Sumado a lo anterior para la determinación de la expresión de $TNF\alpha$ por Citometría de flujo, se realizó una estimulación adicional *in vitro* con LPS durante 6 horas en conjunto con Brefeldina-A.

Por esta razón se añadió un grupo control negativo PBS-PBS el cual no fue estimulado con LPS.

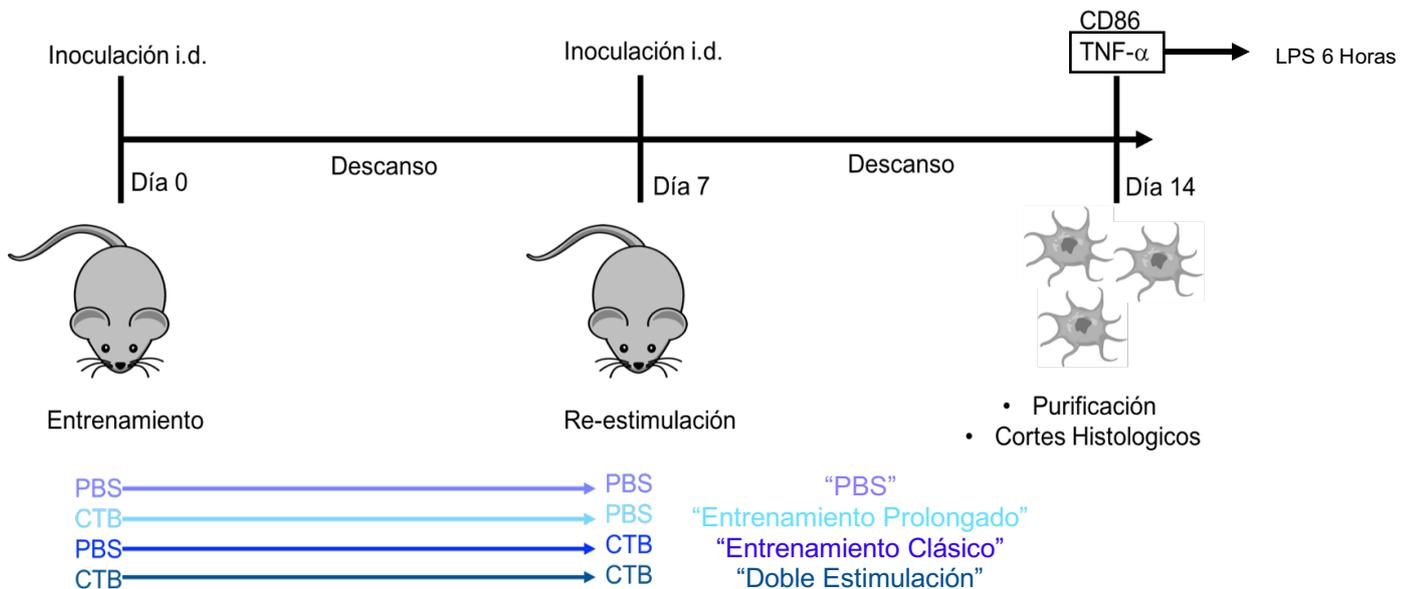


Figura 1. Estrategia Experimental de Inoculación. Ratones C57BL6 fueron inoculados vía i.d. en la oreja con 5 μ g de CTB 5 por oreja o el vehículo (PBS). Transcurridos 7 días fueron re-estimulados con la misma cantidad de CTB o el vehículo. Los animales fueron sacrificados 7 días posteriores a la última inoculación y se obtuvieron las orejas y los ganglios linfáticos drenantes para purificar las células o los tejidos fueron utilizados para la obtención de cortes histológicos de 5 μ m de grosor.

UNA SOLA ESTIMULACION CON CTB *IN VIVO* ES SUFICIENTE PARA INDUCIR UN FENOTIPO DE ENTRENAMIENTO INNATO EN DCs DE PIEL

Uno de los aspectos mejor documentados en el entrenamiento inmune innato es la capacidad de las células entrenadas para incrementar la expresión de citocinas pro-inflamatorias, como $\text{TNF}\alpha$ después de un segundo estímulo inflamatorio¹²¹. De tal forma que la primera pregunta de este trabajo es si esta característica de entrenamiento innato puede observarse en DCs re-estimuladas con CTB *in vivo*.

Para ello seguimos la estrategia experimental que se muestra en la figura 1 y la estrategia de análisis mostrada en el anexo I (Figura 15).

Se observó que la estimulación con CTB *in vivo* induce un incremento en la expresión de $\text{TNF}\alpha$ en las DCs respecto a los grupos control indicando que se está adquiriendo características de entrenamiento inmune innato (Figura 2A). Este fenómeno se observa para todos los fenotipos de DCs estudiados: CD11b+, CD103+ e InfDCs.

Los datos sugieren que existe una diferencia entre la expresión de la citocina en el grupo control estimulado con LPS en comparación con el grupo estimulado al día 7 (Figura 2 B, C y D). Este efecto se hace mas evidente en las DCs CD11b+ y las DCs CD103+ (Figura 2B y C) en comparación con las InfDCs (Figura 2D).

De igual forma se observa que las DCs CD11b+ y DCs CD103+ tienen una intensidad media de fluorescencia (IMF) de TNF superior al grupo control estimulado con LPS. (Figura 2 B y D). Esto sugiere que el fenotipo de entrenamiento puede mantenerse durante 14 días en las cDCs de la piel.

De manera interesante se observó que el grupo re-estimulado con CTB *in vivo* presenta una disminución aparente en la expresión de $\text{TNF}\alpha$ para todas las poblaciones de DCs en comparación con los grupos que recibieron una sola dosis de CTB, (Figura 2 D, E y F).

En conjunto los datos demuestran que una sola estimulación con CTB *in vivo* es suficiente para inducir características de entrenamiento inmune innato *in vivo* en DCs de la piel al incrementarse la expresión de $\text{TNF}\alpha$ y que este fenotipo se mantiene al menos por 14 días.

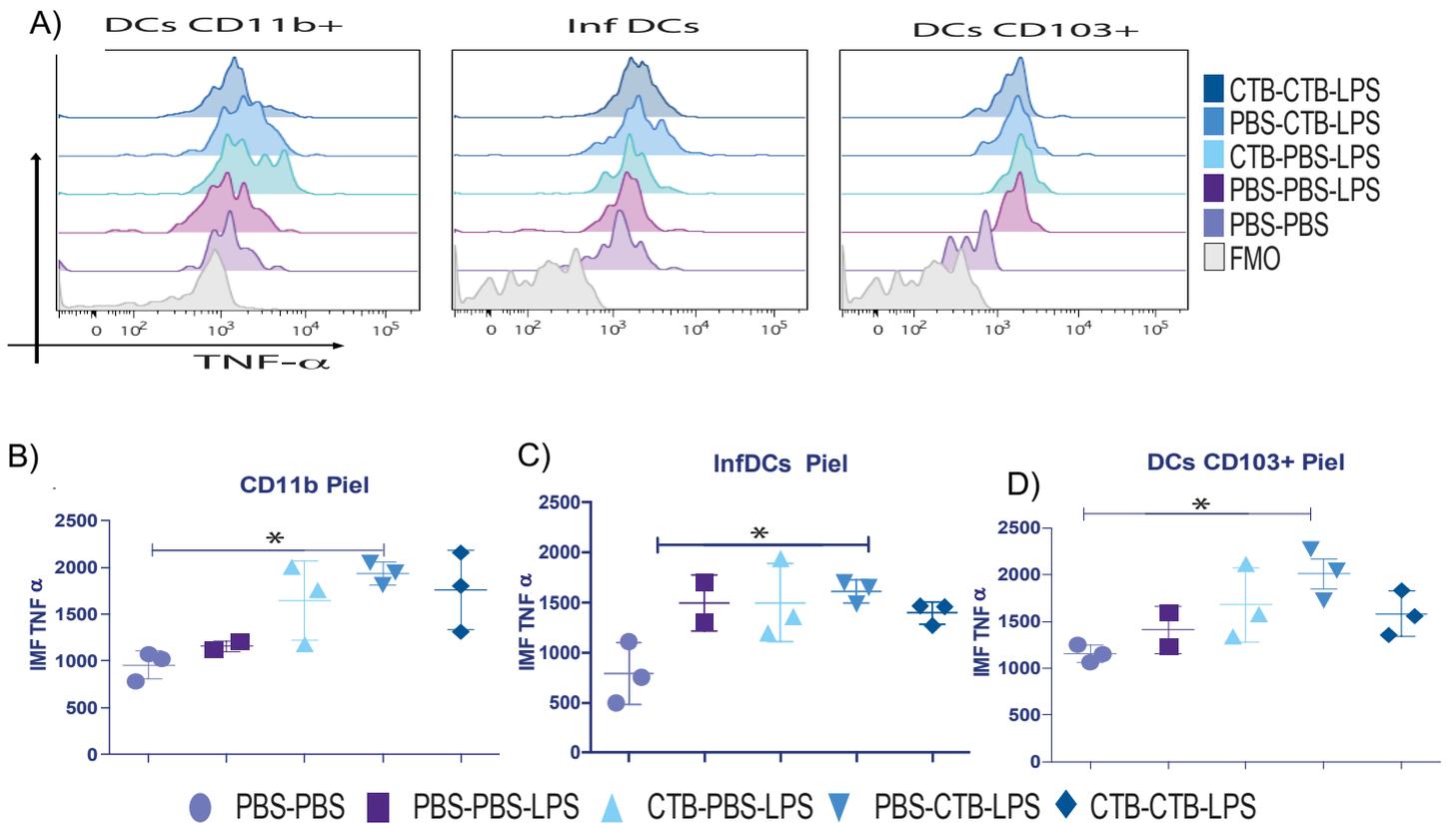


Figura 2. Una sola estimulación con CTB *in vivo* es suficiente para inducir un fenotipo de entrenamiento en DCs de piel. Ratones C57BL6 fueron inoculados con 10 μ g totales de CTB o PBS vía *i.d.* en la oreja. Transcurridos 7 días los ratones fueron re-inoculados con la misma cantidad de CTB o el vehículo y transcurridos 7 días más se obtuvo el tejido y se purificaron las células. Las células fueron estimuladas 6 horas con LPS *in vitro* para promover la expresión de TNF α . A) Histogramas representativos de la IMF de TNF α entre tratamientos y poblaciones de DCs. B), C) y D) Gráficas de la IMF de TNF α para cada uno de los tratamientos y poblaciones de DCs. $n = 2$ o 3, datos agrupados de 1 experimento independiente. Media \pm SEM (* $P > 0.05$).

LA RE-ESTIMULACION IN VIVO CON CTB INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE TNF- α EN LAS POBLACIONES DE DCs MIGRATORIAS EN GANGLIO LINFÁTICO DRENANTE.

Considerando los resultados observados en piel para la expresión de TNF α , el siguiente objetivo fue determinar si estas características de entrenamiento inmune innato podrían encontrarse en LN debido a que es este sitio a donde migran las DCs para ejercer su función de células inductoras de la respuesta inmune adaptativa. Para esto se utilizó el esquema de inducción de entrenamiento ya descrito y de igual forma se utilizó LPS para inducir la expresión de TNF α . De igual forma se siguió la estrategia de análisis del Anexo I (Figura 15). Se observa que la expresión de TNF α es totalmente distinta entre los tratamientos y poblaciones de DCs en comparación con lo observado en piel (Figura 2A y 3A). La expresión de TNF α en DCs migratorias de LN es menor en ratones estimulados al día 1 con CTB en comparación con los estimulados al día 7 y los re-estimulados *in vivo* con CTB. (Figura 3B, C y D).

Particularmente se observa que la doble estimulación con CTB tiene un efecto agonista en la expresión de $TNF\alpha$ en las DCs CD11b+ e InfDCs (Figura 3B y C). Así mismo es evidente que las DCs CD103+ solo incrementan la expresión de la citocina cuando los ratones fueron re-estimulados *in vivo* con CTB (Figura 3 D). También se observa que el fenotipo de entrenamiento es mas claro en las DCs CD11b+ respecto a las DCs CD103+ (Figura 3B y C). Cabe destacar que a pesar de encontrarse en poca proporción las InfDCs pueden expresar $TNF\alpha$ en cantidades comparables con las DCs CD11b+ (Figura 3 A, B y D). En conjunto estos resultados sugieren que una doble estimulación *in vivo* con CTB induce el incremento en proporción de DCs migratorias CD11b+. Así mismo esta doble estimulación favorece el incremento en la expresión de $TNF\alpha$ en todas las poblaciones migratorias estudiadas.

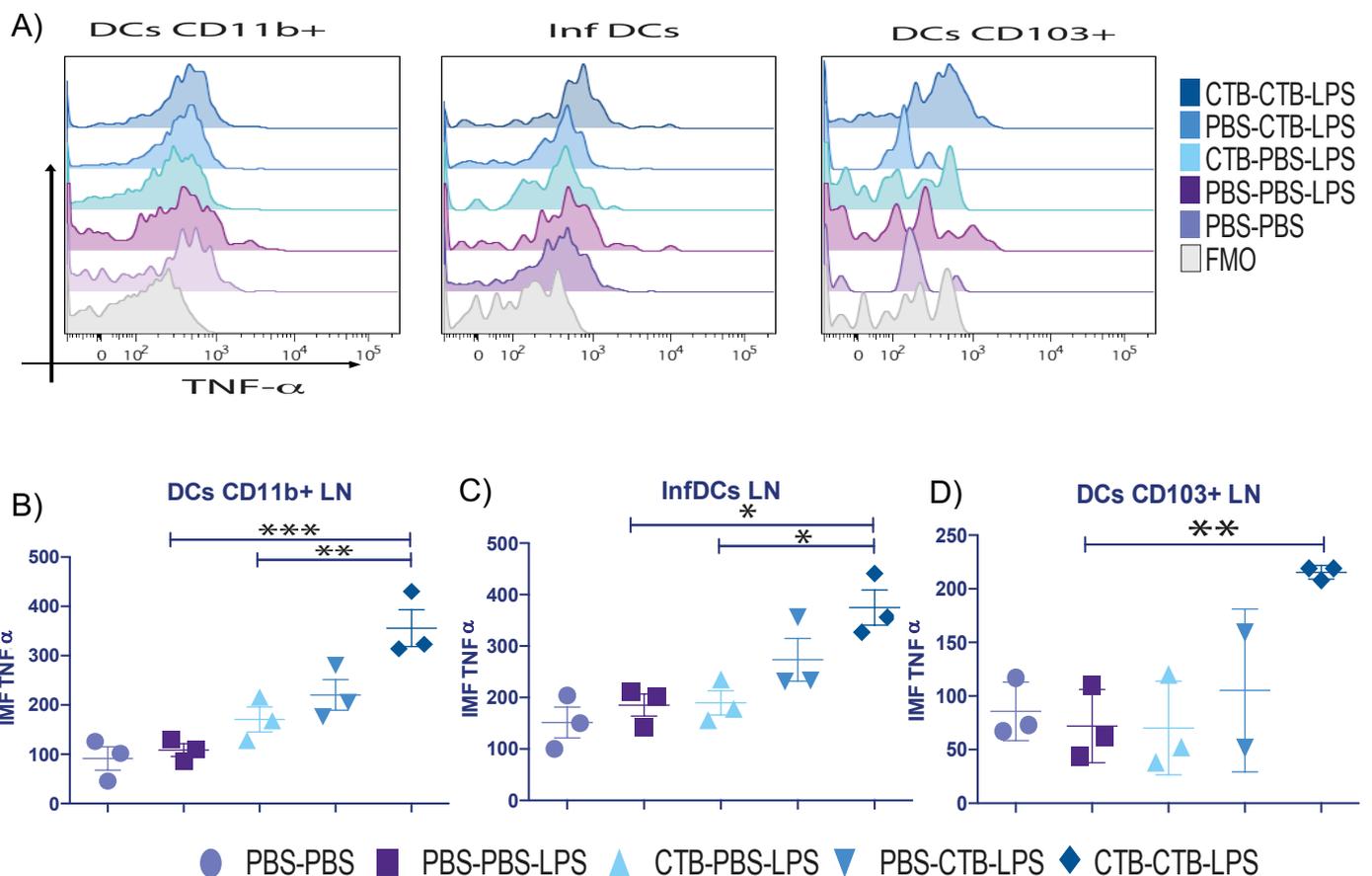


Figura 3. La re-estimulación con CTB *in vivo* incrementa la expresión de $TNF-\alpha$ en las poblaciones de DCs migratorias en Ganglio Linfático Drenante. Ratones C57BL6 fueron inoculados con 10 μg totales de CTB o PBS vía *i.d.* en la oreja. Transcurridos 7 días los ratones fueron re-inoculados con la misma cantidad de CTB o el vehículo y transcurridos 7 días mas se obtuvo el tejido y se purificaron las células. Las células fueron estimuladas 6 horas con LPS *in vitro* para promover la expresión de $TNF-\alpha$. A) Histogramas representativos de la IMF de $TNF-\alpha$ entre los tratamientos y poblaciones de DCs. B), C) y D) Graficas de la IMF de $TNF-\alpha$ para cada uno de los tratamientos y poblaciones de DCs. n= 2 o 3, datos agrupados de 1 experimento independiente. Media \pm SEM (* $P > 0.05$).

UNA SOLA ESTIMULACIÓN CON CTB *IN VIVO* INCREMENTA LOS NÚMEROS ABSOLUTOS DE DCs EN PIEL.

Uno de los aspectos poco explorados en el entrenamiento inmune innato es su impacto en el reclutamiento de las células innatas. De esta manera la siguiente pregunta de este trabajo fue si la inducción de características de entrenamiento inmune innato tenía un impacto en los números de DCs, así como el efecto de la re-estimulación *in vivo* con CTB.

Se encontró que la estimulación con CTB en todos los tratamientos es suficiente para incrementar la proporción de DCs totales en comparación con el grupo control (Figura 4A). Sumado a esto se observa que doble estimulación *in vivo* con CTB tiene un efecto aditivo en la proporción de DCs totales presentes en la piel (Figura 4A). Este fenómeno también se aprecia en cada una de las poblaciones de DCs analizadas (Figura 4 B y C). De manera interesante se observa que la estimulación con CTB en el entrenamiento prolongado o clásico, induce el reclutamiento de células dendríticas inflamatorias y que la re-estimulación *in vivo* incrementa la proporción de estas células en piel.

Contrastante con los datos asociados a la proporción de DCs en piel, los números absolutos de DCs reflejan que la doble estimulación *in vivo* con CTB no tiene un efecto aditivo en los números de DCs totales presentes en el tejido (Figura 4D, ni para los tres fenotipos de DCs estudiadas (Figura 4 E, F y G).

Al analizar las otras dos condiciones experimentales se observa que en el esquema de entrenamiento clásico con CTB se genera un pico máximo en el número de DCs presentes en el tejido. Mientras que bajo el entrenamiento prolongado con CTB, los números de DCs totales, así como DCs CD11b+ y DCs CD103+ se mantienen incrementados respecto al control. Sin embargo, también es evidente que los números de DCs en este grupo son menores a los demás grupos tratados, sugiriendo que a este tiempo las DCs en el tejido se encuentran en una fase de contracción. Sería interesante determinar el punto en que los números alcanzan niveles basales como lo observado en el caso de las InfDCs ya que los números al día 14 son comparables con el grupo control (Figura 4F).

Los resultados demuestran que la inducción de entrenamiento inmune innato con CTB incrementa los números totales de DCs en piel y que este incremento se mantiene durante 14 días, al menos para las cDCs.

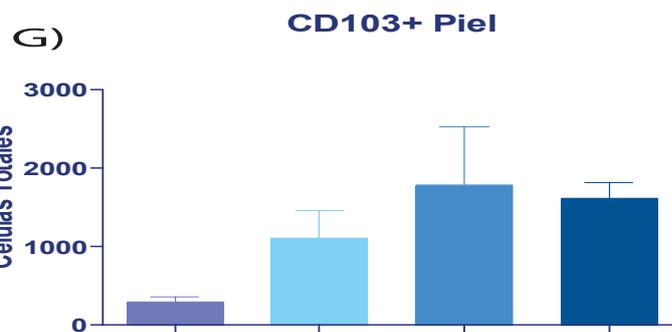
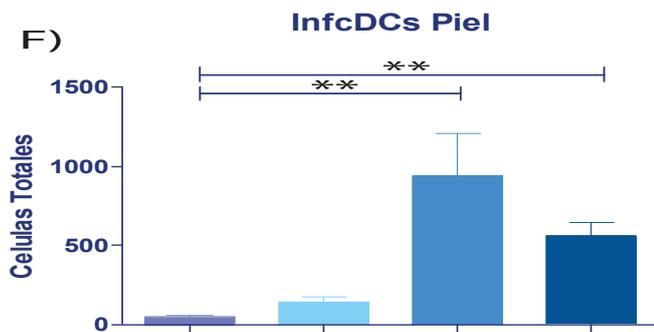
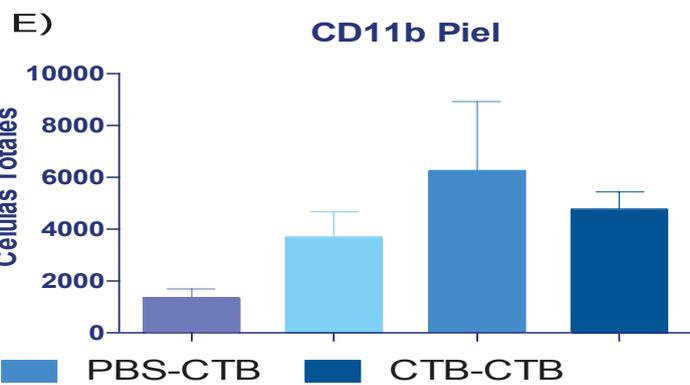
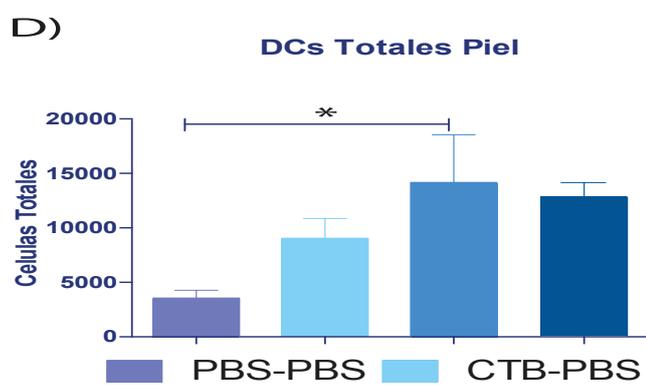
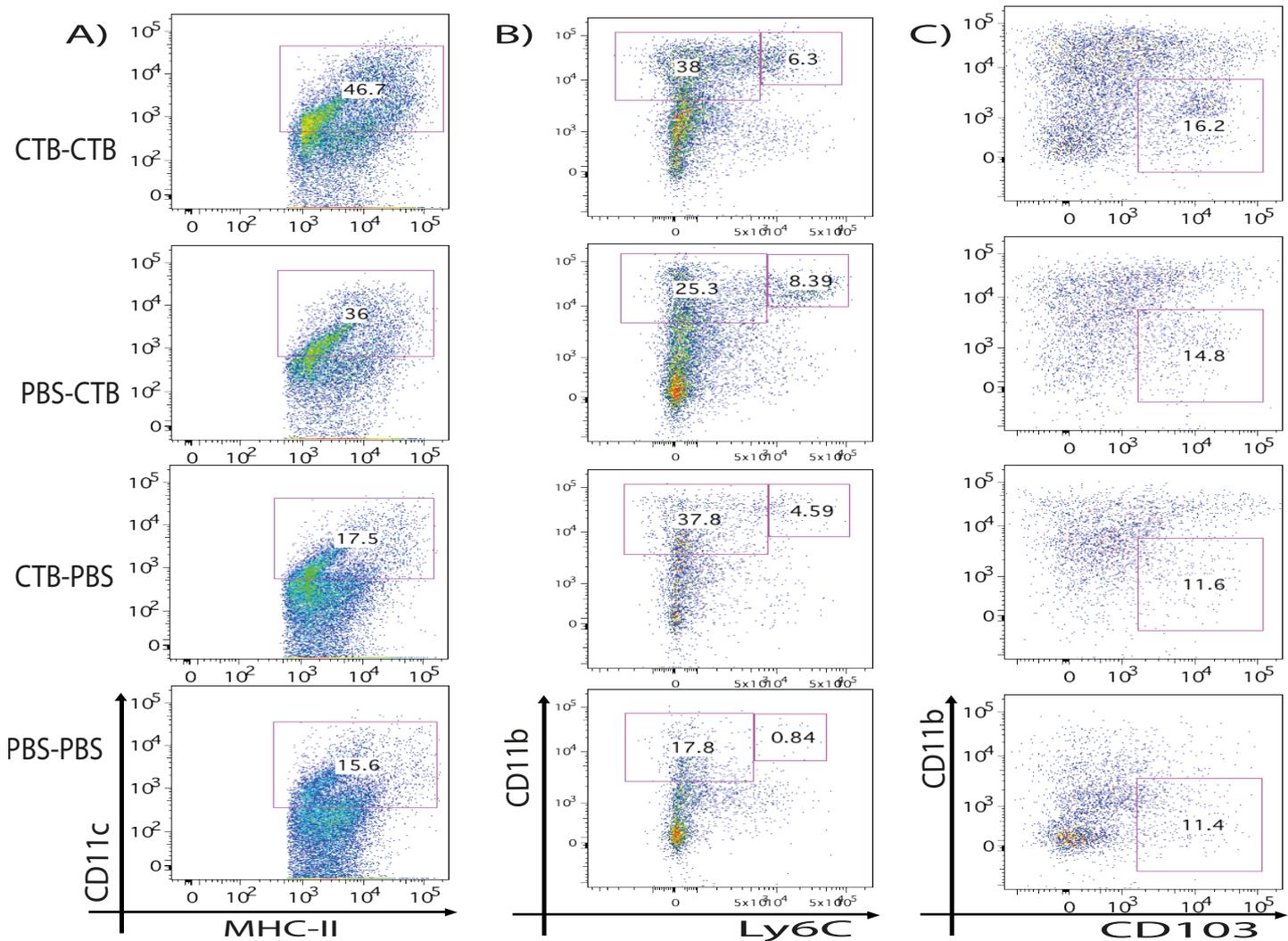


Figura 4. Una sola estimulación con CTB *in vivo* con incrementa los números absolutos de DCs en piel. Ratones C57BL6 fueron inoculados con 10 µg totales de CTB o PBS vía i.d. en la oreja. Transcurridos 7 días los ratones fueron re-inoculados con la misma cantidad de CTB o el vehículo y transcurridos 7 días mas se obtuvo el tejido y se purificaron las células. a), b) y c) Plots representativos para cada uno de los tratamientos y poblaciones de DCs. a) Gates de células CD11c+, MHC-II+ (DCs Totales). b) Gates representativos de DCs CD11b+ (CD11b+, Ly6C) e InfDCs (CD11b+, Ly6C+) c) Gates representativos de DCs CD103+ (CD103+, CD11b-) d), e), f) y g) Gráficas de barras de números totales para cada población de DCs así como DCs totales. n= 6, datos agrupados de 2 experimentos independientes. Media ± SEM (*P>0.05).

LA ADMINISTRACIÓN INTRADÉRMICA CON CTB Y LA RE-ESTIMULACIÓN CON CTB *IN VIVO* INCREMENTA LOS NÚMEROS TOTALES DE DCs MIGRATORIAS EN GANGLIO LINFÁTICO DRENANTE.

Uno de los primeros eventos derivados de la activación de las DCs es la migración a órganos linfoides secundarios. De tal forma que para evaluar si las diferencias en los números de DCs de piel podrían deberse a un incremento en la migración a LN, se determinaron los números totales de DCs migratorias (Anexo I) presentes en ganglio linfático drenante siguiendo el mismo esquema de entrenamiento.

Se encontró que el entrenamiento prolongado y la doble estimulación con CTB incrementa la proporción de DCs migratorias y residentes en LN (Figura 5A). Contrastantemente se aprecia que la proporción de InfDCs incrementa en todos los tratamientos con CTB mientras que la población de DCs CD11b+ solo incrementa con la doble estimulación de CTB y en el esquema de entrenamiento clásico (Figura 5B). De igual manera se observa que la proporción de DCs CD103+ incrementa exclusivamente en la re-estimulación *in vivo* con CTB (Figura 5C). Esto en conjunto apunta a distintos patrones de migración de las DCs estudiadas, aun cuando en la piel no pareciera haber diferencia en la adquisición de las características de entrenamiento inmune innato al menos para las DCs CD11b+ y las InfDCs. Al realizar la cuantificación de las DCs en ganglios se observa que tanto para las DCs residentes como para las DCs migratorias el entrenamiento prolongado con CTB favorece un incremento en los números absolutos de estas poblaciones (Figura 5D y E). De manera interesante se aprecia que la doble estimulación con CTB incrementa de manera sustancial los números absolutos de ambas poblaciones de DCs (Figura 5E). Este fenómeno también se observa en todas las subpoblaciones de DCs migratorias analizadas, siendo las CD11b+ y las InfDCs las que presentan un incremento significativo (Figura 5 F, G y H).

A diferencia de la piel en donde el entrenamiento prolongado con CTB presentaba números de DCs similares a el control (Figura 4D), en LN se aprecia que la estimulación con CTB en este esquema de entrenamiento es suficiente para incrementar tanto la proporción como los números absolutos de DCs presentes en este tejido.

Estos datos muestran un fenómeno completamente contrario a lo observado en la piel ya que una sola estimulación con CTB es suficiente para inducir la migración de estas células a LN, la cual requiere mas de 7 días para hacerse evidente. Así mismo los datos indican que a diferencia de la piel, la doble estimulación con CTB *in vivo* si tiene un efecto aditivo en la cantidad de DCs presentes en LN lo cual es análogo a el efecto aditivo observado para la expresión de TNF α en dicho tejido (Figura 4).

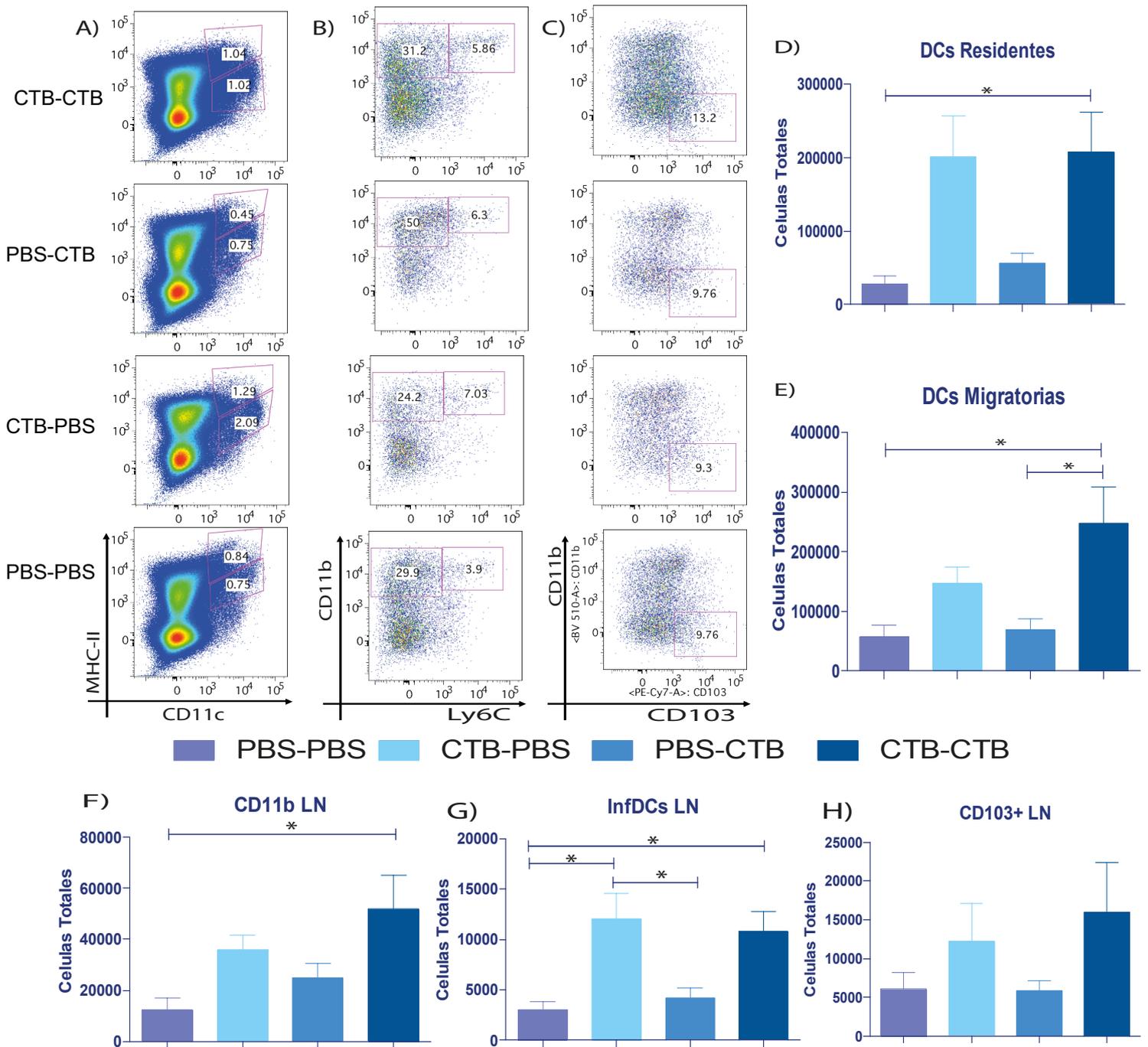


Figura 5. La administración intradérmica con CTB y la re-estimulación con CTB *in vivo* incrementa los números totales de DCs migratorias en ganglio linfático drenante. Ratones C57BL6 fueron inoculados con 10 µg totales de CTB o PBS vía i.d. en la oreja. Transcurridos 7 días los ratones fueron re-inoculados con la misma cantidad de CTB o el vehículo y transcurridos 7 días más se obtuvo el tejido y se purificaron las células. a), b) y c) Plots representativos para cada uno de los tratamientos y poblaciones de DCs. a) Gates de células CD11c+, MHC-II alto (DCs Migratorias) para todos los tratamientos b) Gates representativos para las DCs CD11b+ (CD11b+, Ly6C) y las InfDCs (CD11b+, Ly6C). c) Gates representativos de DCs CD103+ (CD103+, CD11b-) d), e), f) y g) Graficas de barras de los números totales para cada población de DCs. n= 6, datos agrupados de 2 experimentos independientes. Media ± SEM (*P>0.05).

LA CTB INDUCE EL RECLUTAMIENTO DE PRECURSORES DE DCS A LA PIEL

Los resultados del incremento de DCs en piel después de la estimulación y re-estimulación con CTB (Figura 4) plantearon la pregunta si este incremento podría estar asociado al reclutamiento y diferenciación de precursores de cDCs o precursores de InfDCs.

La estrategia para la caracterización de las poblaciones precursoras de detalla en el Anexo I

Se encontró que una estimulación con CTB es suficiente para inducir el reclutamiento de pre-DCs y monocitos inflamatorios precursores de InfDCs (pre-InfDC), aunque este reclutamiento es diferencial entre cada uno de los tratamientos. Puede observarse, que la estimulación con CTB genera un incremento en la proporción de pre-DCs en todos los tratamientos (Figura 6A). Sin embargo, las poblaciones pre-DC y pre-InfDC se definen mejor en el grupo re-estimulado *in vivo* con CTB y el grupo bajo el esquema de entrenamiento clásico (Figura 6 A y B).

El conteo de números absolutos de ambos precursores confirma que el pre-DC se recluta en la piel en cualquier esquema de estimulación con CTB. Además, el incremento ocurre en los ratones entrenados de manera clásica y en mayor numero en aquellos re-estimulados con CTB en comparación con los ratones control (Figura 6C).

Con respecto a los pre-InfDC se observa que el incremento solo es significativo en el esquema de entrenamiento clásico, aunque también hay un ligero incremento en el resto de los tratamientos (Figura 6D). De manera interesante la doble estimulación con CTB no tuvo un efecto aditivo en el reclutamiento de los pre-InfDCs como el observado con el pre-DC (Figura 6 C y D), sugiriendo patrones de reclutamiento diferenciales entre ambos precursores.

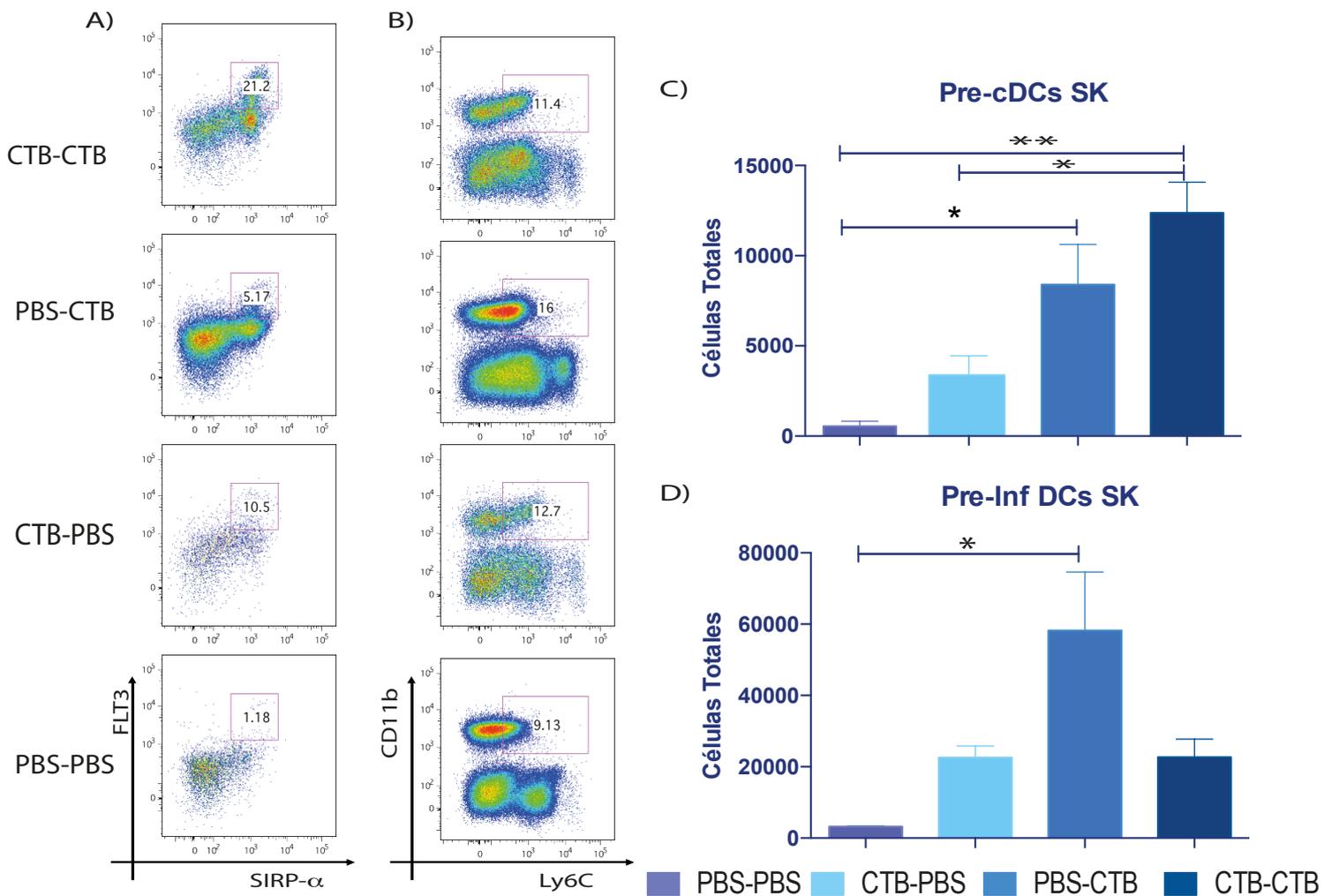


Figura 6. La CTB induce el reclutamiento de precursores de DCs a la piel. Ratones C57BL6 fueron inoculados vía *i.d* en la oreja con 10 μ g totales de CTB o PBS. 7 días después fueron re-inoculados con la misma cantidad de CTB o el vehículo y transcurridos 7 días más se obtuvo el tejido de interés y se purificaron las células. A) y B) Plots representativos para cada tratamiento A) Gates de Pre-DCs (FLT3+, SIRP- α +) B) Gates de monocitos inflamatorios considerados precursores de InfDCs (CD11b+, Ly6C int o alto) C) y D) Gráficos de los números absolutos de ambos fenotipos de precursores para cada uno de los tratamientos. $n=3$, datos agrupados de 1 experimento independiente. Media \pm SEM (* $P>0.05$).

LA CTB NO IMPACTA EN EL RECLUTAMIENTO DE PRECURSORES DE DCs EN GANGLIO LINFÁTICO DRENANTE.

Debido a que en ganglio linfático drenante también se observó un incremento en los números de DCs lo siguiente que se evaluó fue si en este órgano también se inducía el reclutamiento de precursores de DCs derivado de la estimulación con CTB en piel. (Figura 6).

En contraste con lo observado en piel, se observa que la proporción de pre-DCs no incrementa en ningún tratamiento (Figura 7A) lo cual es similar al analizar los pre-InfDCs, además de que ambas poblaciones no se definen fácilmente (Figura 7B)

Al realizar la cuantificación de las células se observa una tendencia a aumentar los números de pre-DCs en los tratamientos con CTB (Figura 7C), no así en cuanto a los números de pre-InfDCs (Figura 7D).

En general estos resultados permiten concluir que el incremento de DCs en LN derivado de la estimulación con CTB en piel no esta asociado a un incremento en el reclutamiento de precursores como sucede en piel, si no, que este fenómeno se asocia a la migración de las DCs de piel a LN.

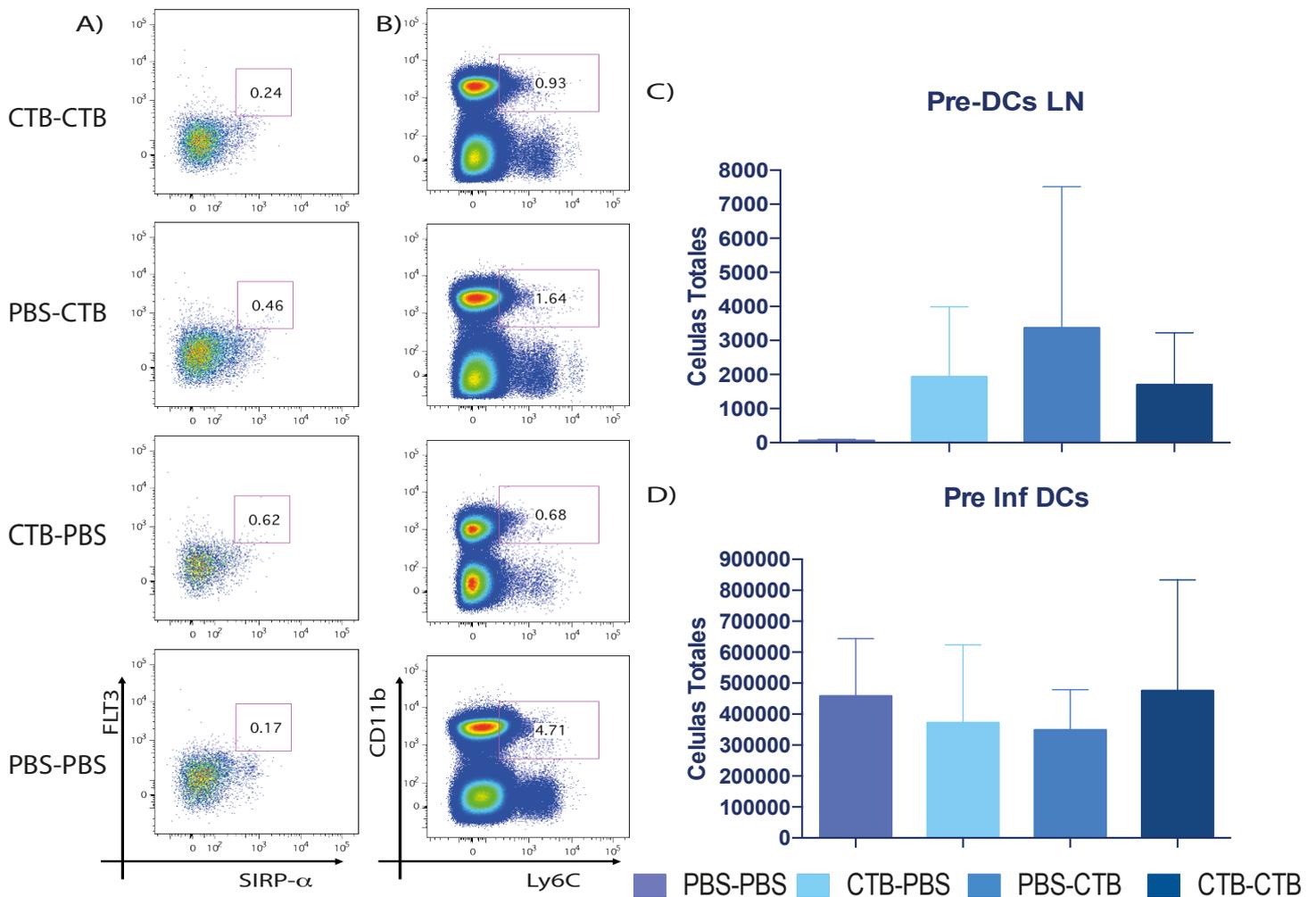


Figura 7. La CTB no induce el reclutamiento de precursores en ganglio linfático drenante. Ratones C57BL6 fueron inoculados vía i.d en la oreja con 10 µg totales de CTB o PBS. 7 días después fueron re-inoculados con la misma cantidad de CTB o el vehículo y transcurridos 7 días mas se obtuvo el tejido de interés y se purificaron las células. A) y B) Plots representativos para cada tratamiento A) Gates de Pre-DCs (FLT3+, SIRP-α+) B) Gates de monocitos inflamatorios considerados precursores de InfDCs (CD11b+, Ly6C int o alto) C) y D) Gráficos de los números absolutos de ambos fenotipos de precursores para cada uno de los tratamientos. n=3, datos agrupados de 1 experimento independiente. Media ± SEM.

LA INOCULACIÓN DE CTB INDUCE LA EXPRESIÓN DE LDH EN DCS DE LA PIEL.

Un punto central en la descripción del entrenamiento inmune innato es la transición metabólica que sufren las células entrenadas hacia la glicolisis aerobia^{112,122}. Por esta razón se decidió evaluar la expresión de Lactato Deshidrogenasa (LDH) *in situ* en las DCs con fenotipo entrenado para así determinar si existe esta transición metabólica.

Se encontró que la estimulación con CTB en todos los tratamientos es suficiente para inducir la expresión de LDH en DCs CD11b+ (Figura 8) y las InfDCs (Figura 9). Lo que correlaciona con que una estimulación con CTB es suficiente para inducir un fenotipo de entrenamiento en las DCs de piel (Figura Y). Además, se observó que la doble estimulación con CTB incrementa de manera importante la expresión de LDH en las DCs CD11b+ (figura 8) y las InfDCs (Figura 9).

Interesantemente se observó durante el periodo de descanso en el entrenamiento prolongado, disminuye la expresión de LDH en el tejido, lo cual sugiere que las células con características de entrenamiento inmune innato en periodo de reposo disminuyen la actividad glucolítica.

Así mismo se observa que los tejidos estimulados con CTB bajo el esquema de entrenamiento clásico y con doble estimulación incrementan el infiltrado celular principalmente en el estrato dermal lo que se ve reflejado en un incremento en el grosor del tejido respecto a el grupo control (Figura 8 y 9).

Sumado a lo anterior en la Figura 9 se aprecia que en el estado de reposo (descanso) derivado del entrenamiento prolongado con CTB, hay células en el tejido localizadas en el estrato epidermal que expresan solamente LDH.

En conjunto estos resultados indican que la estimulación con CTB induce una transición metabólica en dos poblaciones de DCs en piel. Los resultados también demuestran que el estado metabólico de entrenamiento es transitorio y se recupera y potencia con una segunda estimulación *in vivo*

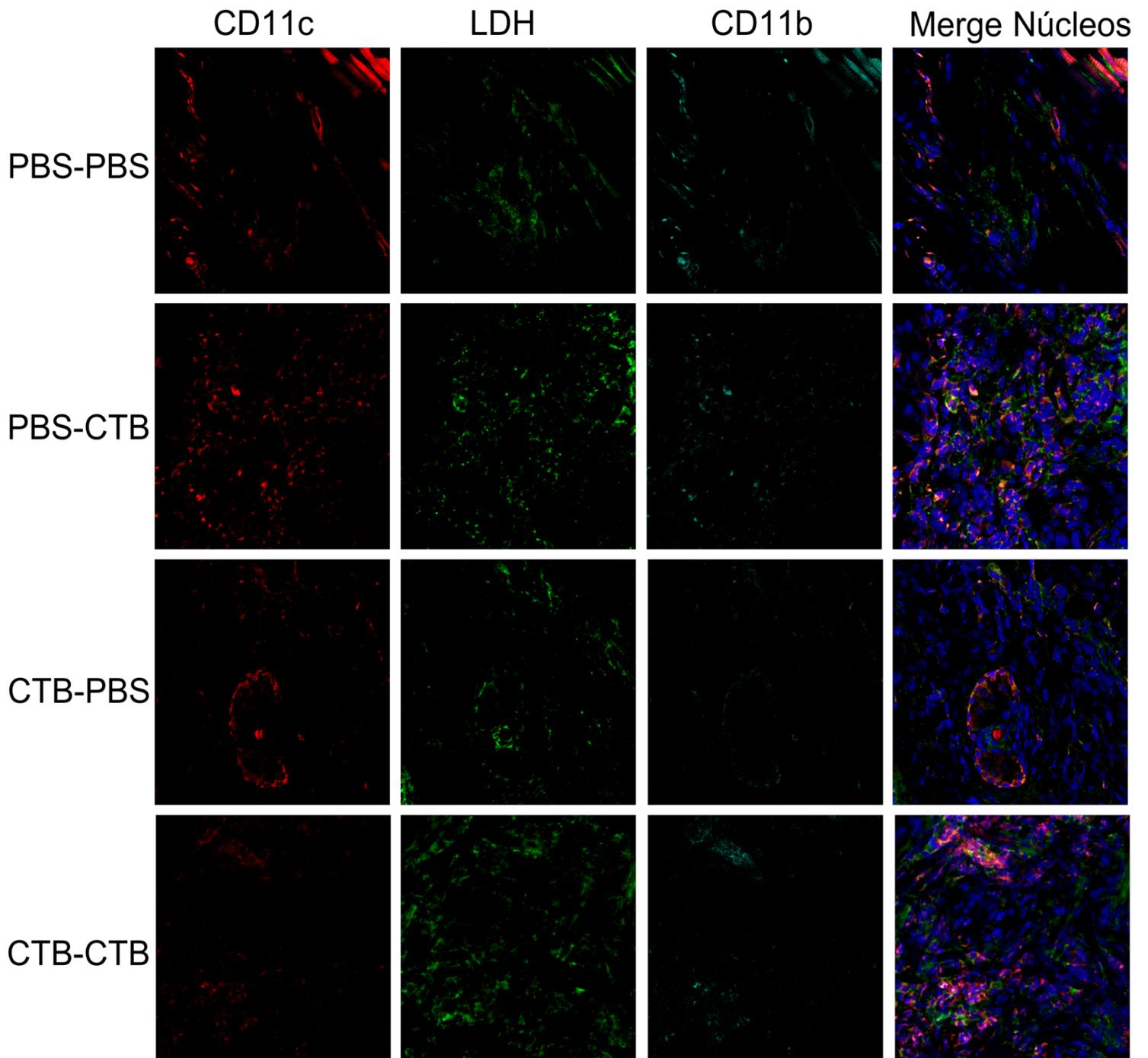


Figura 8. La estimulación con CTB y la re-estimulación *in vivo* induce la expresión de LDH en DCs CD11b+ de la piel. Ratones C57BL6 fueron inoculados *vía i.d.* en la oreja con 10 μ g totales de CTB o el PBS, 7 días después fueron re- inoculados con la misma cantidad de CTB o PBS, transcurridos 7 días mas se obtuvo el tejido para su inclusión en Tissue Tek® y su posterior corte con un grosor de 5 μ m. Imágenes de microscopia de flourescencia representativas de cada tratamiento. De izquierda a derecha. En rojo se muestra la expresión de CD11c, en verde la expresión de LDH y en Cyan la expresión de CD11b, en la ultima columna se muestra el Merge de los canales con los núcleos teñidos con Hoechst (Azul)

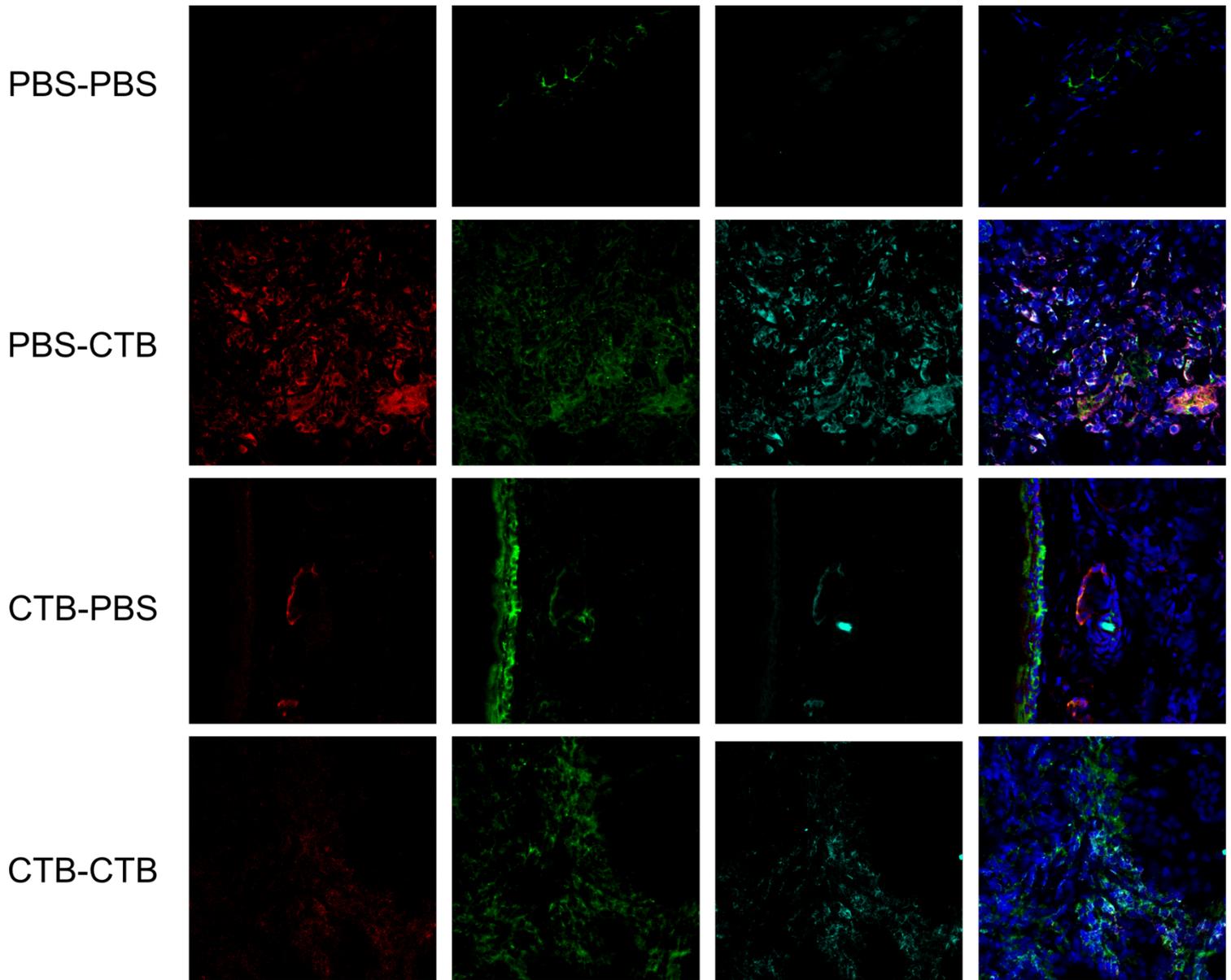


Figura 9. La estimulación con CTB y la re-estimulación con CTB *in vivo* induce la expresión de LDH en DCs inf de la piel. Ratones C57BL6 fueron inoculados *vía i.d.* en la oreja con 10 μ g totales de CTB o PBS, 7 días después fueron re inoculados con la misma cantidad de CTB o PBS, transcurridos 7 días mas se obtuvo el tejido para su inclusión en Tissue Tek® y su posterior corte con un grosor de 5 μ m. Imágenes de microscopia de flourescencia representativas de cada tratamiento. De izquierda a derecha. En rojo se muestra la expresión de CD11c, en verde la expresión de LDH y en Cyan la expresión de Ly6C, en la ultima columna se muestra el Merge de los canales con los núcleos teñidos con Hoechst (Azul).

LA INOCULACIÓN DE CTB INDUCE LA EXPRESION DE LDH EN DCS DE GANGLIO LINFATICO DRENANTE.

Una vez que se observó la transición metabólica inducida por la CTB en piel se quiso determinar si este fenómeno sucedía en las DCs migratorias presentes en ganglio linfático drenante.

En cuanto a las DCs CD11b+ en la Figura 10 se observa que, en el entrenamiento prolongado y la re-estimulación con CTB se incrementa la expresión de LDH en LN que co-localiza con las marcas asociadas a DCs CD11b+ (CD11c, CD11b). También es evidente que en el esquema de entrenamiento clásico con CTB, se induce un incremento en la expresión de LDH, sin embargo, esta expresión no co-localiza con la marca asociada a las DCs CD11b+.

Así mismo se aprecia que la distribución de las DCs CD11b+ en ganglio entre los tratamientos es distinta. En el entrenamiento clásico con la CTB, las DCs CD11b+ se localizan en áreas circundantes al ganglio sugiriendo que se trata de células que están ingresando al LN por linfa aferente. En contraste se aprecia que tanto en el esquema de entrenamiento prolongado, así como la doble estimulación con CTB genera que las DCs CD11b+ ingresen a zonas más internas del LN.

En condiciones basales (control negativo) se pueden observar DCs CD11b+ distribuidas en todo el ganglio linfático, sin embargo, difieren respecto a los tratamientos en abundancia y en la expresión de LDH.

En contraste con lo anterior en la Figura 11 es evidente que la abundancia de las InfDCs en ganglio linfático es menor respecto a las DCs CD11b+ y que en condiciones basales el marcador Ly6C no co-localiza con el marcador clásico de DCs CD11c. De igual manera se aprecia que solo bajo la doble estimulación con CTB se induce la migración de las InfDCs.

En resumen, los resultados indican que la transición metabólica asociada al entrenamiento de las DCs en piel se mantiene durante la migración a LN. Así mismo las micrografías señalan que entre los 2 fenotipos migratorios estudiados existen diferencias en cuanto a localización y abundancia. Particularmente se observa que las DCs CD11b+ migran en

cualquier estimulación con CTB, mientras que las InfDCs solo aparecen en LN cuando se re-estimulo con CTB

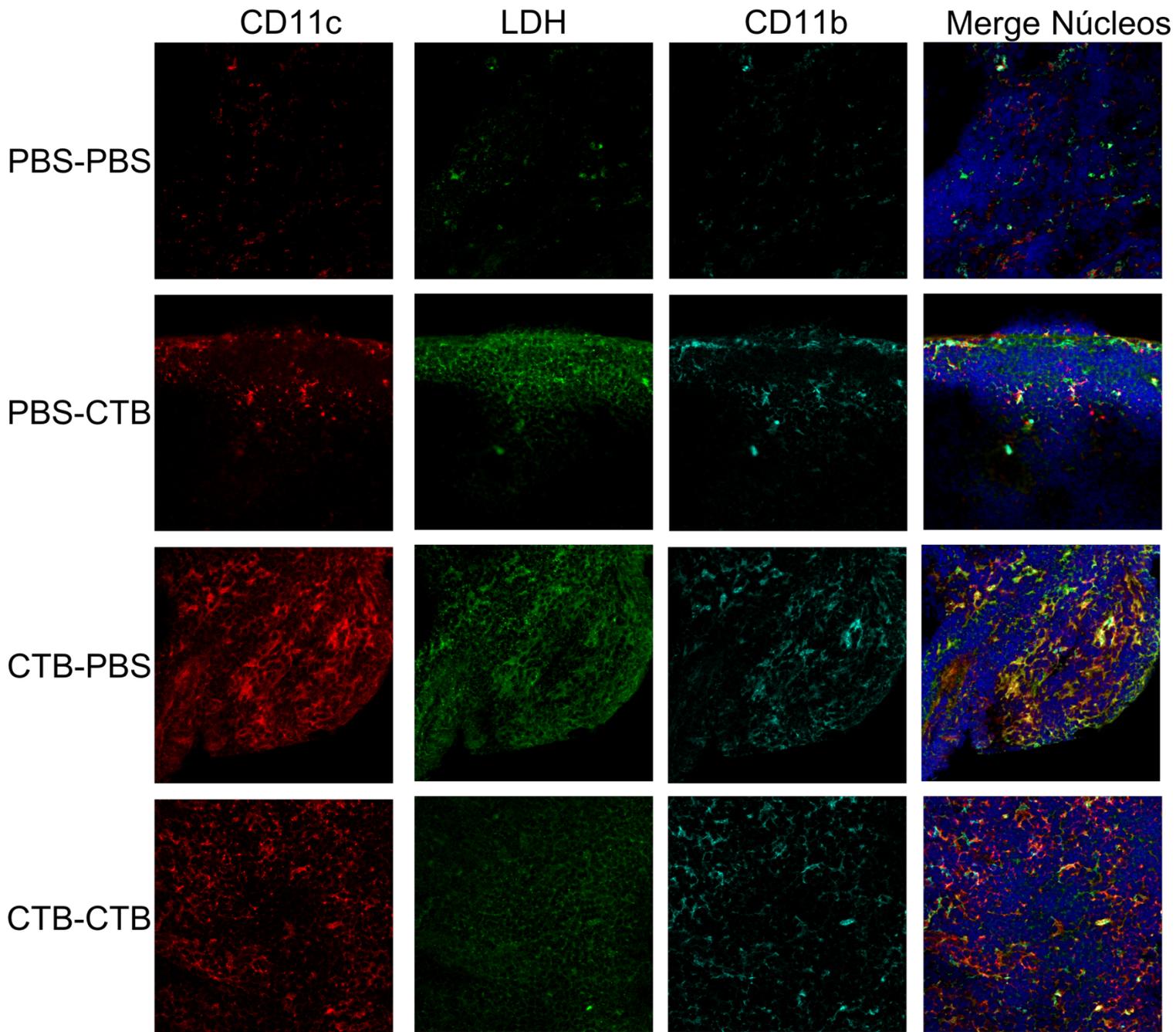


Figura 10. La estimulación al día 1 con CTB y la re-estimulación *in vivo* induce la expresión de LDH en DCs CD11b+ en ganglio linfático drenante. Ratones C57BL6 fueron inoculados vía i.d en la oreja con 10 µg totales de CTB o PBS, 7 días después fueron re inoculados con la misma cantidad de CTB o PBS, transcurridos 7 días mas se obtuvo el tejido para su inclusión en Tissue Tek® y su posterior corte con un grosor de 5µm. Imágenes de microscopia de flourescencia representativas de cada tratamiento. De izquierda a derecha. En rojo se muestra la expresión de CD11c, en verde la expresión de LDH y en Cyan la expresión de CD11b, en la ultima columna se muestra el Merge de los canales con los núcleos teñidos con Hoechst (Azul).

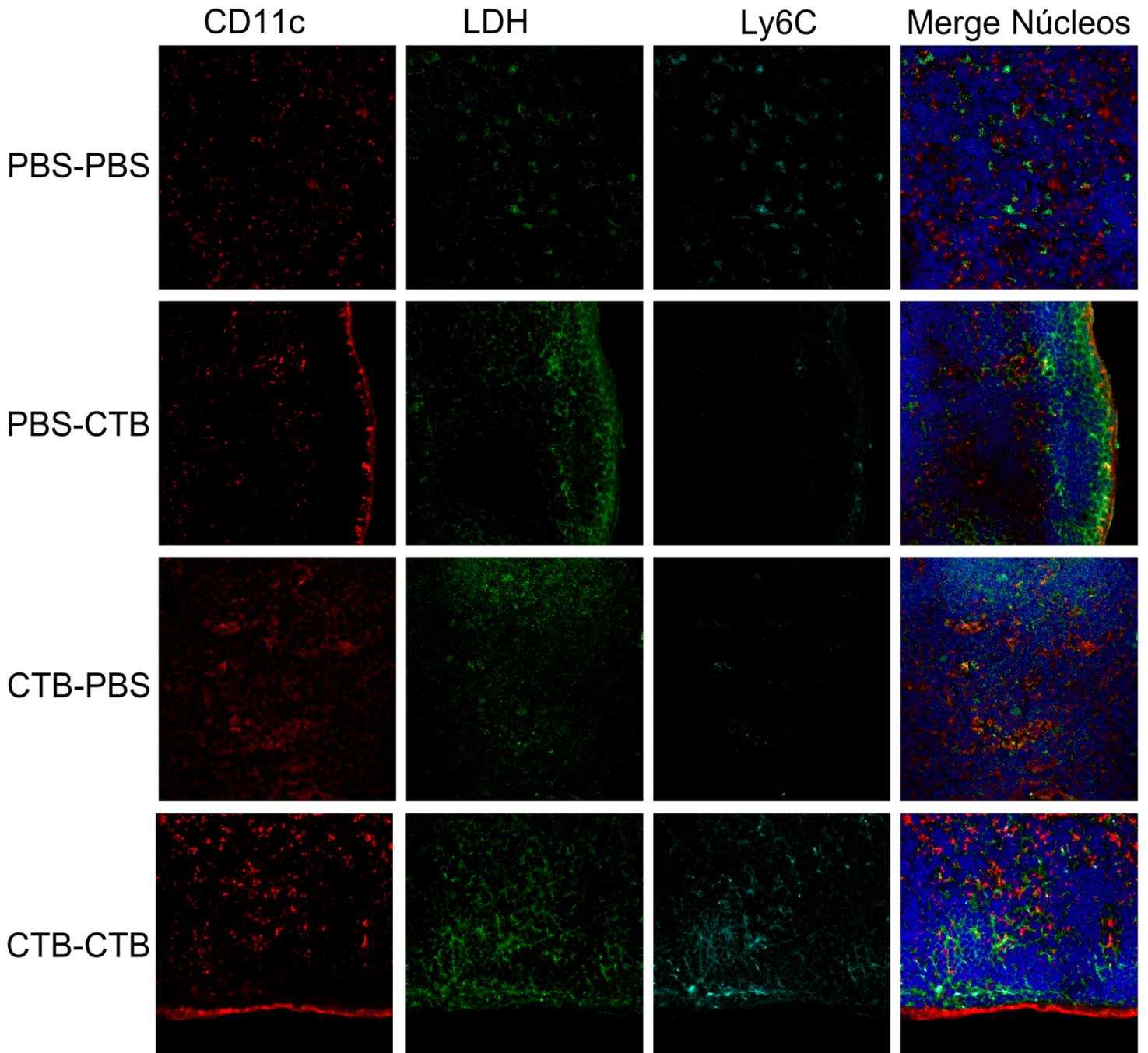


Figura 11. La estimulación al día 1 con CTB y la re-estimulación *in vivo* induce la expresión de LDH en DCs CD11b+ en ganglio linfático drenante. Ratones C57BL6 fueron inoculados vía i.d en la oreja con 10 μ g totales de CTB o PBS, 7 días después fueron re inoculados con la misma cantidad de CTB o PBS, transcurridos 7 días mas se obtuvo el tejido para su inclusión en Tissue Tek® y su posterior corte con un grosor de 5 μ m. Imágenes de microscopía de flourescencia representativas de cada tratamiento. De izquierda a derecha. En rojo se

muestra la expresión de CD11c, en verde la expresión de LDH y en Cyan la expresión de CD11b, en la última columna se muestra el Merge de los canales con los núcleos teñidos con Hoechst (Azul).

LA ACTIVACIÓN DE LAS DCS ESTIMULADAS CON CTB *IN VIVO* ES PROLONGADA Y SOSTENIDA EN LA PIEL.

Una vez que se determinó que la CTB induce características de entrenamiento inmunológico en células dendríticas y que este fenotipo puede potenciarse con una segunda estimulación *in vivo*. Se evaluó si la inducción de este entrenamiento inmunológico en DCs también impactaba en sus características funcionales intrínsecas como la presentación antigénica. Para ello determinamos mediante citometría de flujo la expresión de CD86, la cual es una de las moléculas involucradas en este proceso inmune⁸. Se encontró que de manera análoga a lo descrito en la Figura 4, la estimulación con CTB incrementa la proporción de las DCs (Figura 12 A y B). Al evaluar la expresión de CD86 se encontró incremento en la intensidad media de fluorescencia en las DCs estimuladas con CTB. (Figura 12C)

También se observó que el entrenamiento clásico con CTB incrementa de manera significativa la expresión de CD86 en todos los subtipos de DCs analizados. (Figura 12D, E y F). Esta expresión es más evidente en las DCs CD11b+ y CD103, ya que en las InfDCs se observa que tanto en el entrenamiento clásico como la re-estimulación con CTB inducen niveles comparables de expresión de CD86. (Figura 12E) Interesantemente la doble estimulación con CTB no tuvo un efecto aditivo en expresión de esta molécula en ninguno de los subtipos de DCs estudiados.

Un hallazgo importante es el observado en el esquema de entrenamiento prolongado con CTB. En dicho grupo se observa que la expresión de CD86 se mantiene durante los 14 días del esquema (Figura 12D, E y F), lo cual indica que esta activación es prolongada en la piel y podría afectar la función de las DCs como APCs.

Es importante señalar que entre los subtipos de DCs se encontraron patrones de expresión diferenciales para CD86, siendo las InfDCs y las DCs CD11b+ las que expresan en mayor cantidad CD86 (Figura 12D y E). En contraste a lo observado para las DCs CD103+, las cuales tienen menor expresión de CD86. (Figura 12F)

En resumen, los datos muestran que una sola estimulación con CTB en piel es suficiente para que las DCs incrementen la expresión de CD86 y que esta expresión se mantiene durante 14 días posteriores a la estimulación, teniendo un pico máximo de expresión al día

7 después de la administración de CTB. Además, que la doble estimulación con CTB *in vivo* parece no potenciar la expresión de CD86.

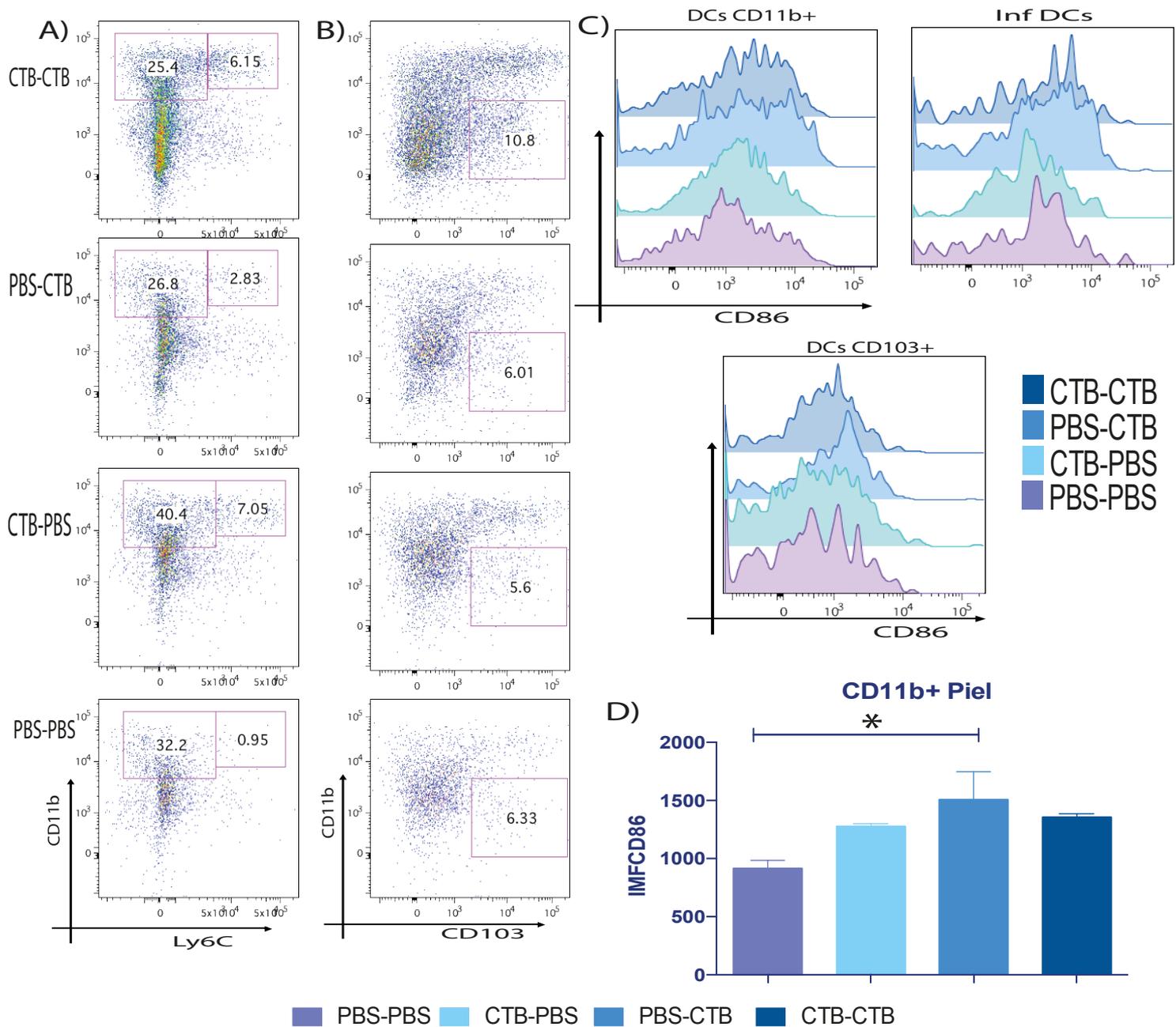


Figura 12. La activación de las DCs estimuladas con CTB *in vivo* es prolongada y sostenida en la Piel.

Ratones C57BL6 fueron inoculados con 10 µg de CTB o PBS y 7 días después fueron re inoculados con la misma cantidad de CTB o PBS, 7 días posteriores se obtuvo el tejido de interés y se purificaron las células totales. A) y B) Plots representativos de cada población de DCs para cada tratamiento. A) Gates de DCs CD11b+ (CD11b+, Ly6c-) e InfDCs (CD11b+, Ly6C+). B) Gates de DCs CD103+ (CD11b-, CD103+). C) Histogramas representativos de la IMF de CD86 de cada población de DCs para cada tratamiento. D), E) y F) Graficas de barras de la expresión de CD86 de cada población de DCs para cada tratamiento n= 6, datos agrupados de 2 experimentos independientes. Media ± SEM (*P>0.05).

LA ACTIVACIÓN CON CTB INDUCE LA EXPRESIÓN PROLONGADA DE CD86 EN DCS MIGRATORIAS DE GANGLIO LINFÁTICO DRENANTE.

Por ultimo se evaluó si lo observado en piel para la expresión de CD86 también sucedía en el ganglio linfático drenante, ya que en los experimentos previamente realizados se observó que la inducción de entrenamiento inmune innato impactaba en las DCs que están migrando a este órgano. De igual forma en el Anexo I se detalla la estrategia para la caracterización de las poblaciones de DCs en LN.

Se observó que contrastante a el grupo control, la estimulación con CTB solo incrementa la proporción de InfDCs (Figura 13A), no así las DCs CD11b+ y CD103+(Figura 13 A y B).

Por otro lado, como se observó en la Figura 12C, la estimulación con CTB incrementa la expresión de CD86 en las poblaciones de DCs analizadas (Figura 13C). Se observa que, a diferencia de la piel, los patrones de expresión de CD86 son distintos entre los tratamientos. Se encontró que el la expresión de CD86 es máxima bajo el esquema de entrenamiento prolongado en las DCs CD11b y las InfDCs (Figura 13D y E) en comparación con la piel, en donde la expresión máxima se encontró en el esquema de entrenamiento clásico, (Figura 12 D y E. Para el caso de las DCs CD103+, la expresión de CD86 se vio favorecida con la doble estimulación con CTB. (Figura 13F)

Respecto al nivel de expresión de CD86 entre los subtipos de DCs migratorias analizadas se puede apreciar que las cDCs CD11b+ son las que tiene una expresión mayoritaria (Figura 13 D) y que a diferencia de la piel la expresión de esta molécula en las InfDCs no es semejante si no menor (Figura 13E).

En conjunto los datos demuestran que la impronta generada en la piel con la estimulación con CTB impacta en las características fenotípicas de las DCs que están migrando a LN, debido a los patrones de expresión de CD86.

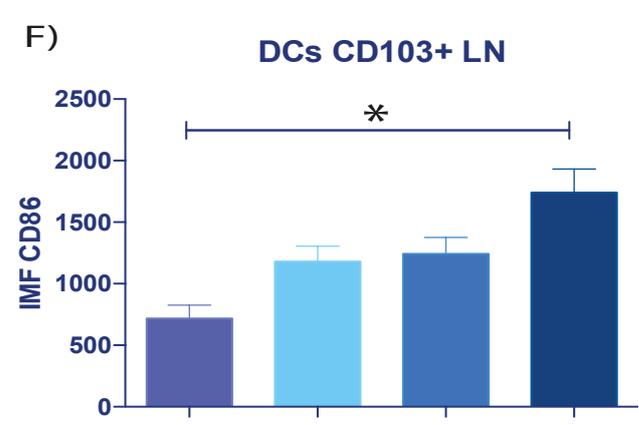
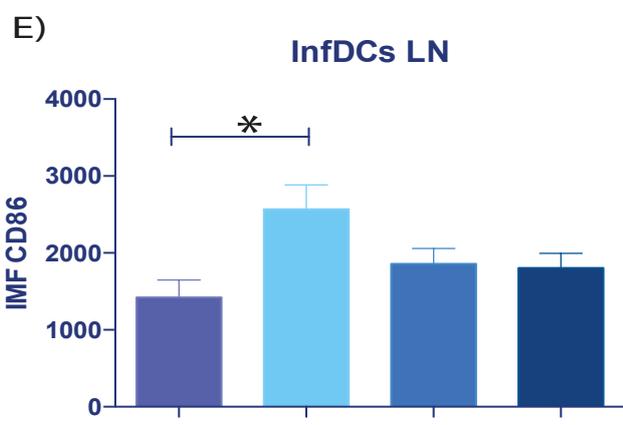
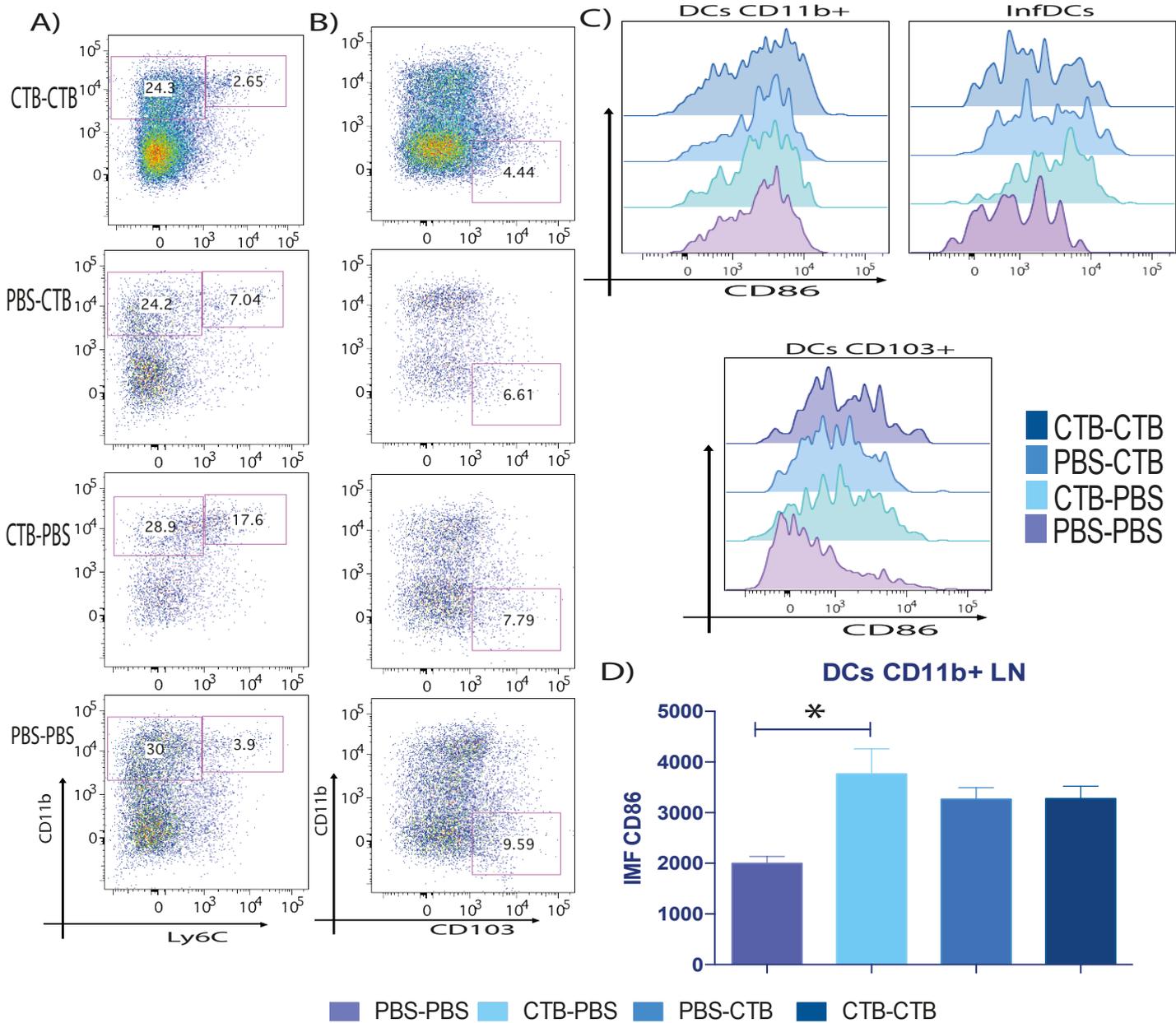


Figura 13. La activación con CTB induce la expresión prolongada de CD86 en DCs migratorias de ganglio linfático drenante. Ratones C57BL6 fueron inoculados con 10 µg de CTB o PBS y 7 días después fueron re inoculados con la misma cantidad de CTB o PBS, 7 días posteriores se obtuvo el tejido de interés y se purificaron las células totales. A) y B) Plots representativos de cada población de DCs para cada tratamiento. A) Gates de DCs CD11b+ (CD11b+, Ly6c-) e InfDCs (CD11b+, Ly6C+). B) Gates de DCs CD103+. (CD11b-, CD103+). C) Histogramas representativos de la IMF de CD86 de cada población de DCs para cada tratamiento. D), E) y F) Graficas de barras de la IMF de CD86 de cada población de DCs para cada tratamiento. n= 6, datos agrupados de 2 experimentos independientes. Media ± SEM (* P>0.05).

DISCUSION.

El entrenamiento inmune innato sin duda ha cambiado el paradigma sobre las poblaciones celulares con capacidad de generar de memoria inmunológica. Sin embargo, la mayoría de los ensayos que describen este mecanismo hacen uso de estimulaciones *in vitro* dejando la interrogante de la reproducibilidad de estos hallazgos en modelos mas complejos *in vivo*. Además, que este mecanismo no canónico no ha sido descrito utilizando adyuvantes. Lo anterior es relevante si se considera que los esquemas de vacunación basados en dosis de refuerzo hacen uso tanto de adyuvantes como de antígenos en las re-estimulaciones. De tal forma que es importante evaluar el papel individual que tienen los adyuvantes en una re estimulación *in vivo* y determinar si se inducen características de entrenamiento inmune innato que puedan impactar en la generación de una respuesta adaptativa eficiente.

En este sentido, los resultados de este trabajo demuestran que la CTB además de ser un adyuvante eficaz y seguro⁷⁸, induce un fenotipo con características de entrenamiento inmune innato en DCs. Esto determinado por un incremento en la expresión de TNF α en la piel, así como en los ganglios linfáticos drenantes de todos los grupos estimulados con CTB *in vivo*.

Interesantemente se encontró que la doble estimulación *in vivo* no tiene efecto aditivo en la expresión de esta citocina en la piel. Esto podría asociarse a la tercera estimulación que recibieron estas células con LPS *in vitro*, el cual se ha demostrado que puede generar inmunoparálisis en células innatas expuestas a estímulos crónicos con esta enterotóxina¹²³. Así mismo está falta en el efecto agonista en la expresión de la citocina pudiera estar asociada a mecanismos de regulación inmunológica tanto de las células estimuladas, así como componentes del microambiente, los cuales pudieran favorecer que se regule la expresión de TNF α por parte de las DCs piel.

Por otra parte, estas DCs entrenadas pudieran estar favoreciendo la sobre expresión de otras citocinas asociadas a el entrenamiento inmune innato; considerando lo anterior resulta relevante determinar si la doble estimulación *in vivo* impacta en la expresión de otras citocinas descritas en el entrenamiento inmune innato como IL-6 e IL-1 β . Además de citocinas pro-inflamatorias, también sería interesante explorar si la re estimulación con CTB modifica algunas moléculas asociadas a la polarización efectiva del linfocito T en la presentación de antígeno como IL-23 e IFN γ . Sin embargo, nuestros resultados brindan un primer acercamiento sobre la dinámica de la inducción del entrenamiento innato *in vivo* en donde mas componentes celulares entran en juego.

Los resultados indican que de los subtipos de DCs de piel estudiados, las cDCs CD11b+ tiene el fenotipo de entrenamiento inmune innato mas acentuado, ya que son las que tienen una mayor expresión de TNF α , en comparación con el control que no recibió CTB, pero fue estimulado con LPS. Estas DCs están asociadas principalmente a la activación de distintos fenotipos de linfocitos T CD4+³⁹, de esta manera el entrenamiento inducido por la CTB pudiera impactar de manera exclusiva en los linfocitos T cooperadores. Sin embargo, aun falta por determinar si este entrenamiento sobre las DCs CD11b+ se asocia a su alta abundancia en piel o a la expresión de diferencial de PRRs asociados a la activación de CTB entre los subtipos de DCs. ¹²⁴.

También encontramos que si bien la expresión de TNF α en las DCs CD103+ e InfDCs no es comparable con las DCs CD11b+, si es posible determinar que estos subtipos de DCs adquieren características de entrenamiento inmune innato con la estimulación con CTB. Este fenómeno es mas significativo en las DCs CD103+ que en las InfDCs cuando se compara con el grupo control estimulado con LPS. Estos datos contrastan con antecedentes directos del laboratorio los cuales indican que las DCs CD103+ no adquieren características de entrenamiento inmune innato. Se observó que bajo un esquema de inducción de entrenamiento con duración de 7 días y con una segunda estimulación de LPS *in vitro*, las DCs CD103+ no mostraron un incremento en la expresión de TNF α . Sin embargo, la evidencia de este trabajo indica que este subtipo de DCs si adquiere características de

entrenamiento *in vivo*, resaltando la importancia del microambiente en la inducción de entrenamiento inmune innato.

Por otro lado, es importante destacar que el tiempo en el esquema de entrenamiento parece no ser relevante en las subpoblaciones de DCs de piel, al menos para la expresión de TNF α ya que los resultados indican que así se trate de una estimulación al día 1, al día 7 o doble con CTB la expresión de esta citocina es muy similar.

En paralelo con el análisis en piel también se describió el impacto del entrenamiento inmune innato en el ganglio linfático drenante. Considerando que una de las principales funciones de las DCs es migrar a LN después de su activación y que la CTB es capaz de viajar por los nódulos linfáticos y activar a las DCs residentes de ganglio⁷⁹.

Los resultados obtenidos en ganglio linfático hacen evidente el papel de la doble estimulación *in vivo* con CTB en DCs entrenadas. Se observa un claro efecto en todos los subtipos de DCs estudiados en donde la doble estimulación *in vivo* incrementa de manera significativa la expresión de TNF α en comparación con la condición control estimulada con LPS. Esto demuestra por primera ocasión que una segunda estimulación *in vivo* en células entrenadas tiene un efecto aditivo en la expresión de TNF α .

Estos resultados son de vital importancia ya que amplían el panorama sobre el entrenamiento inmune innato y su repercusión en el sistema inmune, ya que no solo las DCs se están entrenando en la piel si no que migran a ganglio con fenotipo entrenado. Esto sugiere que la re estimulación con CTB podría generar un ambiente diferente durante la presentación de antígeno a los linfocitos T, lo cual podría impactar en la polarización de estas células, así como en la inducción de células efectoras y de memoria.

De igual forma resta determinar si este fenotipo de entrenamiento solo se induce en las DCs migratorias o si se puede observar en los fenotipos de DCs residentes de ganglio. Así mismo este estudio en la expresión de TNF α tanto en piel como en LN carece de marcadores asociados a células de Langerhans, las cuales se sabe tienen un origen ontogénico distinto y un ciclo de vida mas largo que las DCs dermales^{46,54}. De tal forma que futuras investigaciones sobre el entrenamiento inmune innato deben considerar a estas DCs y

determinar si también pueden entrenarse para enriquecer el estudio de este fenómeno en DCs.

Al igual que en nuestros antecedentes previos, observamos que la administración de CTB en piel involucra un incremento en los números de DCs en este tejido. Es importante mencionar que un incremento en los números de células totales también ha sido asociado a la inducción de entrenamiento inmune innato, por ejemplo en células NK, las cuales se sabe que retienen un potencial de proliferación², en comparación con otras células innatas como las DCs , por lo que este fenómeno podría estar asociado a otros mecanismos de entrenamiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que una sola estimulación con CTB incrementa los números totales de DCs en un esquema de entrenamiento clásico (7 días). Además, que la re-estimulación *in vivo* con CTB no tiene un efecto agonista en estos números, pero si en el mantenimiento de los subtipos estudiados de DCs. Interesantemente también se encontró que la estimulación bajo un esquema de entrenamiento prolongado mantiene los números de DCs por encima del grupo control. Lo anterior sugiere que las características de entrenamiento innato inducido en estas células, también impactan en un incremento en la vida media de las DCs, quizá por mecanismos de resistencia a apoptosis.

Los resultados también sugieren que el decremento en los números absolutos de DCs en piel transcurridos 14 días, así como en una segunda estimulación con CTB, se asocia directamente con el incremento en las DCs migratorias de LN. Esto sugiere que sumado a la activación tardía generada por la CTB también se genera una inducción de migración tardía en las DCs activadas. Así mismo el carácter sostenido de la activación tardía de la CTB impacta en la migración sostenida de las DCs lo cual se refleja en los números tan altos de DCs en LN 14 días después de la estimulación¹²⁰.

El fenómeno tan particular en la cinética de migración de las DCs estimuladas con CTB pudiera asociarse a la repercusión del entrenamiento inmune innato en la capacidad migratoria de estas células. Esto podría explicarse por la expresión de CCR7, el cual se sabe que es el receptor encargado de dirigir a las DCs a LN a través de su interacción con CCL21 y CCL19⁶⁶. De tal forma que las DCs entrenadas en piel pudieran sobre expresar este receptor y así mejorar su capacidad migratoria.

Uno de los aspectos clave del por qué el entrenamiento de las células innatas no es considerado un tipo de memoria inmunológica por diversos autores es su falta de capacidad para transmitir esta memoria a otras células al carecer de capacidad proliferativa¹²⁵. Esto a pesar que las células entrenadas adquirieron información epigenética y metabólica que las hace responder mejor ante un segundo estímulo. Sin embargo, la evidencia encontrada en individuos estimulados con BCG demuestra que el fenotipo de entrenamiento no es transitorio y de alguna manera impacta en la impronta genética de las células innatas. Esto sugiere que este entrenamiento inmune innato impacta en los precursores de estas células ya que son los precursores los que tienen mayor capacidad de proliferar y así perdurar en el tiempo⁹².

Evidencia reciente ha demostrado que bajo condiciones de infección sistémica el entrenamiento inmune innato impacta directamente en los precursores de monocitos en medula ósea, los cuales 28 días después del estímulo entrenador son capaces de diferenciarse a monocitos con fenotipo entrenado¹⁰⁸. En este contexto, en este trabajo se demostró que una administración de CTB como estímulo entrenador es capaz de reclutar precursores de DCs en la piel, tanto pre-DCs como monocitos precursores de InfDCs lo anterior con una sola estimulación del adyuvante. Por lo tanto, nuestros datos suman evidencia para afirmar que la inducción de entrenamiento impacta en el reclutamiento de los precursores de las células innatas.

Con esto se puede concluir que el incremento en los números absolutos de DCs bajo condiciones de entrenamiento se debe a un reclutamiento de precursores de DCs Clásicas e inflamatorias que se diferencian a DCs funcionales. Sin embargo, se desconoce si estos precursores reclutados bajo condiciones de entrenamiento tengan rondas de proliferación y una subsecuente diferenciación tal y como se ha reportado¹²⁶. Otra posibilidad es que estos precursores bajo condiciones de entrenamiento se diferencien directamente a DCs. Lo anterior pudiera tener repercusiones en el fenómeno de entrenamiento inmune innato en las DCs derivadas de estos pre-DCs reclutados en el contexto de entrenamiento.

De manera interesante se demostró que la doble estimulación con CTB *in vivo* incrementa significativa los pre-DCs reclutados a piel y no así los monocitos precursores de InfDCs. Esto es relevante ya que podría dar indicio sobre la capacidad diferencial en el reclutamiento de precursores de DCs condiciones de entrenamiento, lo cual pudiera estar asociado a la capacidad de estos precursores de adquirir características de entrenamiento *in vivo*.

La migración diferencial de precursores de DC a piel podría ser explicado por 2 mecanismos. En el primero estaría asociado a una mayor expresión de quimio atrayentes para pre-DCs como FLT3-L y no para monocitos. El segundo mecanismo podría estar asociado a un entrenamiento de los precursores de DCs que a su vez podrían incrementar la expresión de los receptores de Quimocinas como FLT3 y por lo tanto migren de manera mas eficiente a la piel. Aunque estos mecanismos podrían no ser mutuamente excluyentes, es evidente que la CTB tiene la capacidad de inducir características de entrenamiento en DCs además reclutar a sus precursores en piel.

Esta capacidad de reclutamiento de pre-DCs ha sido explorada por Idoyaga y colaboradores utilizando FLT3-L en conjunto con estímulos activadores de DCs en tumores de melanoma murino para eficientar el control antitumoral mediado por las DCs¹²⁷. Considerando esto, la CTB adquiere relevancia en modelos de inmunización para controlar el crecimiento tumoral, ya que es capaz de activar a las DCs y reclutar sus precursores. Además, que la capacidad hiper-inflamatoria de las células entrenadas con CTB podría revertir los fenómenos de inmunosupresión inducidos por las células tumorales.

Otra característica del entrenamiento inmune innato es la reprogramación metabólica que sufren las células después de entrenarse. Los datos de este trabajo indican que los subtipos de DCs CD11b+ e InfDCs, sufren una transición metabólica determinada por un incremento en la expresión de enzimas glucolíticas como LDH, la cual es una enzima clave de la glucólisis y que además se ha descrito se sobre expresa en células entrenadas⁹⁴.

Las micrografías demuestran que en la piel dicha transición metabólica es transitoria, ya que 14 días después de la estimulación con CTB, la expresión de LDH ya no es evidente en las DCs. De igual manera las micrografías revelan que la re-estimulación *in vivo* con CTB reestablece el fenotipo glucolítico. Esto sugiere fuertemente que, en el periodo de descanso del entrenamiento, existe un abatimiento glucolítico mediado por el control transcripcional de las enzimas involucradas como la LDH. De igual manera las imágenes sugieren que la doble

estimulación con CTB en piel incrementa tanto las DCs que expresan LDH, así como la intensidad de expresión de dicha enzima.

Es interesante que en LN a diferencia de la piel no se abate la expresión de LDH en las DCs, probablemente asociado a un flujo constante de DCs migratorias con fenotipo entrenado adquirido en piel. Donde esta migración de células entrenadas podría generar el reclutamiento y diferenciación de precursores, así como el mantenimiento del microambiente inflamatorio. De igual forma este fenómeno de mantenimiento del estado glucolítico podría estar asociado a la característica hipóxica del LN, lo que favorecería el fenotipo glucolítico de las células entrenadas mediante la estabilización de HIF1- α . Cabe mencionar que se ha descrito que las células entrenadas activan HIF1- α para inducir y sostener dicho estado metabólico¹¹⁴. Lo anterior adquiere relevancia si se considera que es en LN en donde las DCs ejercen su función en la inducción de la respuesta inmune adaptativa.

Este trabajo también demuestra la capacidad de las DCs entrenadas para mejorar una característica funcional intrínseca como lo es la expresión de moléculas de co-estimulación, específicamente CD86. Los resultados indican que en piel la expresión CD86 no incrementa cuando las DCs entrenadas con CTB son re-estimuladas *in vivo*. En contraste, la doble estimulación *in vivo* mantiene la expresión de CD86 en proporciones equiparables a la expresión temprana asociada a la activación del entrenamiento clásico. Cabe señalar que es en esta condición en donde se presenta el pico máximo en la expresión de dicha molécula de co-estimulación. Así mismo los datos demuestran que una sola estimulación en el entrenamiento prolongado con CTB es suficiente para que las DCs mantengan la expresión de CD86 por encima del control negativo. Esto sugiere fuertemente que la inducción de entrenamiento innato en DCs impacta en su función como APCs, lo que conlleva un papel importante en la diferenciación y funcionalidad de linfocitos T.

Es importante mencionar que la cinética de expresión de CD86 en células con un fenotipo entrenado es desconocida y los resultados sugieren que las DCs entrenadas y re-estimuladas *in vivo* con CTB no sobre expresan dicha molécula de co-estimulación al menos en la piel. De manera interesante se observa que bajo condiciones de activación al día 1 con CTB, solamente en las cDCs (CD11b+ y CD103+) se mantiene la expresión de CD86 por

encima de los niveles basales, lo que sugiere que este entrenamiento impacta exclusivamente en cDCs.

En contraste con lo anterior, es claro que la máxima expresión de CD86 en LN es a los 14 días post inoculación en DCs CD11b+ e InfDCs, siendo las DCs CD11b+ las que retienen la expresión de dicha molécula en niveles comparables a los demás tratamientos. En contraste en las DCs CD103+ se aprecia que la doble estimulación tiene un efecto agonista en la expresión de CD86.

En conjunto los datos acerca de la expresión de CD86 en DCs migratorias de ganglio linfático drenante sugieren fuertemente que el entrenamiento inmune innato inducido con una estimulación con CTB impacta de manera positiva y diferencial en la expresión de moléculas de co-estimulación en al menos 3 subtipos de DCs: las CD11b+, las CD103+ y las InfDC.

Considerando que CD86 es una de las moléculas que participa en la presentación antigénica, sería interesante determinar la expresión de CD40 bajo el entrenamiento generado por la CTB. Inclusive se podría evaluar la expresión de moléculas que regulan de manera negativa la presentación de antígeno como lo es PD-L1.

De igual manera estos resultados en la piel abren la posibilidad de evaluar si la inducción de entrenamiento inmune innato impacta en otras características asociadas con el procesamiento y presentación de antígeno. Los resultados demuestran que la impronta generada con la CTB como estímulo entrenador en DCs impacta directamente en su funcionalidad. Este impacto, de manera interesante es mas evidente en ganglio con una segunda estimulación *in vivo*.

Este trabajo documenta por primera ocasión la importancia de la re-estimulación con adyuvantes y su impacto en las células presentadoras de antígeno profesionales como las DCs las cuales son capaces de incrementar la expresión de TNF α y CD86 en el órgano donde cumplen su función de inductoras de la respuesta inmune adaptativa.

De igual manera los datos de este trabajo demuestran que la CTB como estímulo entrenador también impacta en el reclutamiento de precursores de DCs tanto pre-DCs como pre-InfDCs en el sitio de inoculación. Siendo los primeros los que incrementan de manera sustancial en un contexto de re-estimulación *in vivo* indicando que el entrenamiento tiene un impacto directo en dichos precursores. De tal forma que, si este entrenamiento repercute en la

impronta de los precursores reclutados al sitio de inoculación, existe la posibilidad que esta impronta perdure en cada ronda de proliferación que tenga el precursor entrenado, estableciendo un tipo de memoria inmunológica no canónica asociada a los precursores de las células innatas.

De manera general este trabajo amplía el panorama sobre el mecanismo de acción de los adyuvantes y su relación con la inducción de una respuesta inmune eficaz. Señalando que estas moléculas también podrían inducir características de entrenamiento inmune innato en un contexto fisiológico. En donde el impacto de estas características en las células tanto del componente innato como del adaptativo podría ser clave en el desarrollo de estrategias de inmunización eficientes y duraderas.

CONCLUSIONES.

En conjunto los resultados de este trabajo permiten concluir que la CTB induce características de entrenamiento inmune innato en los 3 subtipos de células dendríticas evaluadas en piel de ratón. Esto determinado por un incremento en la expresión de $TNF\alpha$ que a su vez se asocia con una transición metabólica hacia la vía glucolítica en estas DCs.

Nuestros datos también demuestran que este entrenamiento impacta en el reclutamiento de DCs tanto en la piel, así como en el ganglio linfático drenante, en donde se pueden encontrar DCs migratorias con fenotipo entrenado. Adicionalmente, encontramos un incremento de DCs en piel, el cual está asociado a un incremento en el reclutamiento de precursores de DCs clásicas y de monocitos inflamatorios.

Finalmente, los resultados también permiten concluir que el entrenamiento inmune innato impacta de manera positiva en la expresión de moléculas de co-estimulación tanto en la piel y ganglio linfático drenante lo cual podría tener un efecto importante en la activación de linfocitos T "Naive" por parte de las DCs (Figura 14).

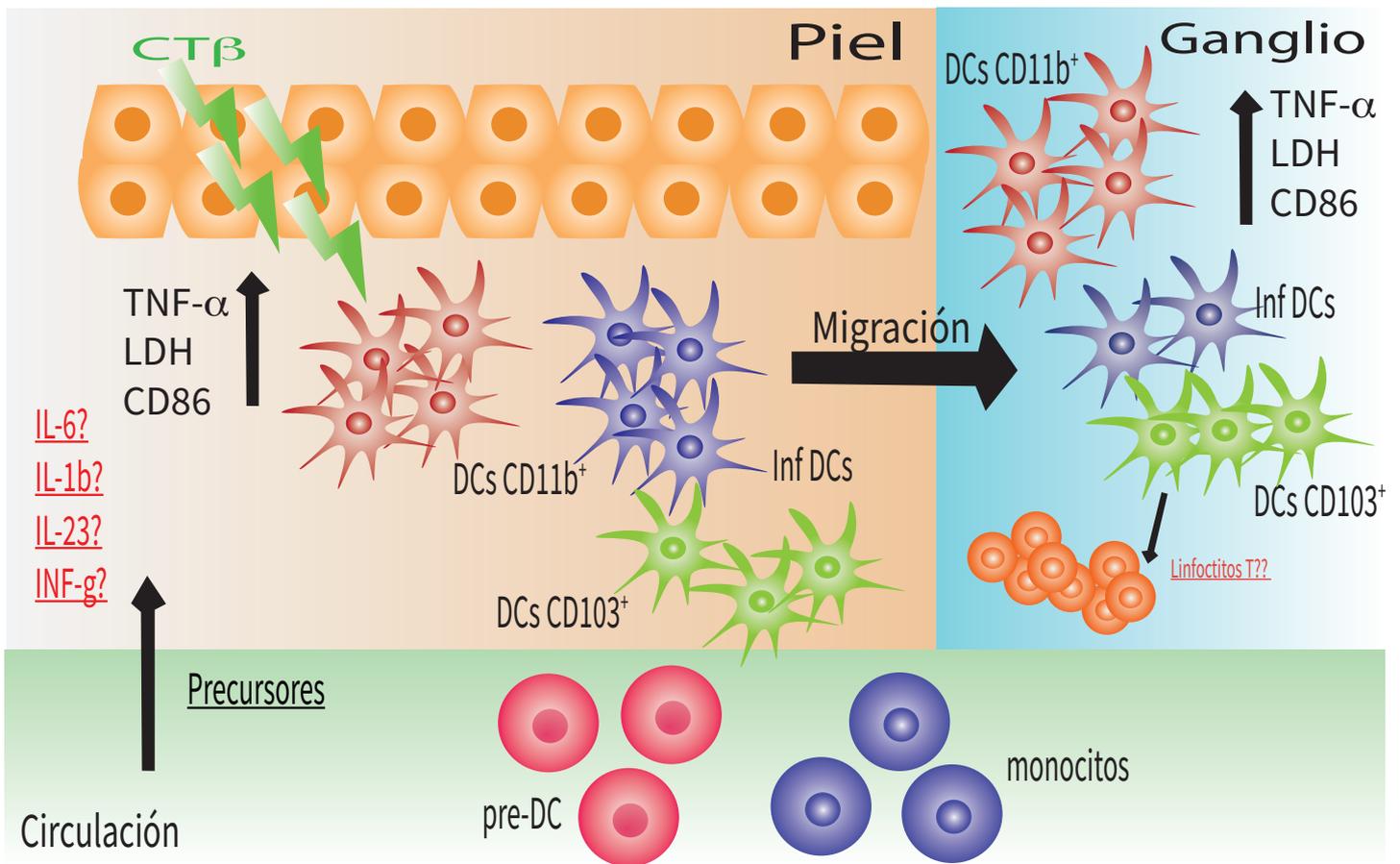


Figura 14. Modelo propuesto para la inducción de entrenamiento innato en DCs de la piel mediado por la CTB. La inoculación intradérmica con CTB induce características de entrenamiento inmune innato en DCs CD11b⁺ y CD103⁺ así como InfDCs. Dicho entrenamiento se evidencia con una segunda estimulación mediante un incremento en la expresión de moléculas efectoras como TNF- α y CD86. Así mismo la CTB como estímulo entrenador induce una transición metabólica en las DCs hacia la glucólisis aerobia, determinada por la expresión de LDH. En este ambiente de entrenamiento inmune innato inducido por la CTB, también se induce el reclutamiento de pre-DCs los cuales ante una segunda estimulación incrementan de manera significativa. Por último las características de entrenamiento inmune innato inducidas por la CTB en el sitio de inoculación, son también evidentes en las DCs migratorias en los nódulos linfáticos drenantes de dicho sitio.

PERSPECTIVAS.

Si bien este trabajo aporta elementos importantes para afirmar que las DCs pueden adquirir un fenotipo de entrenamiento inmune innato, también da pauta para determinar si este fenotipo impacta en la expresión de otras citocinas asociadas clásicamente a este fenómeno como IL-6 e IL-1 β , así como citocinas asociadas a la diferenciación de linfocitos T como IL-23 e INF- γ .

De igual manera, es importante realizar un estudio metabólico mas amplio en las DCs entrenadas, así como un estudio epigenético para determinar si en efecto este fenotipo de entrenamiento está determinado por una impronta epigenética adquirida con el estímulo entrenador. Así mismo resulta importante determinar si lo observado con estímulos análogos se reproduce con estímulos heterólogos.

ANEXO I

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE POBLACIONES DE DCs Y SUS PRECURSORES.

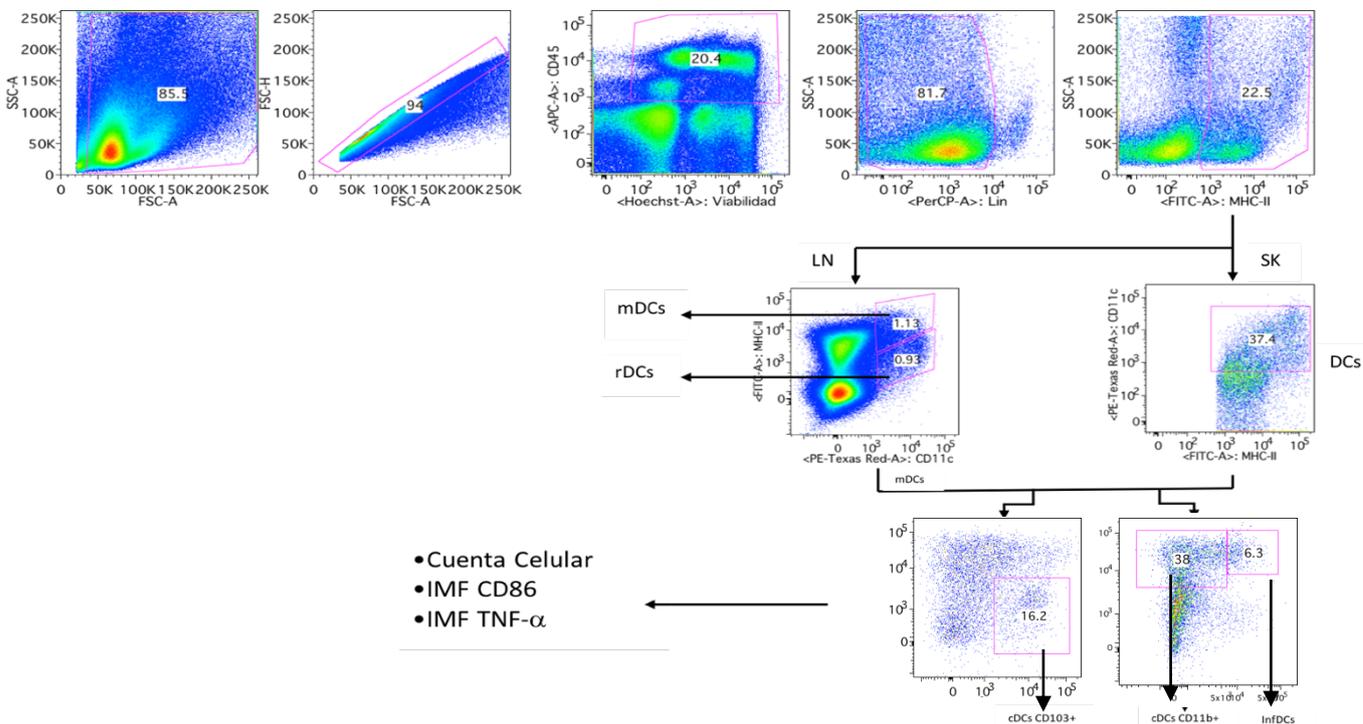


Figura 15. Estrategia de análisis para la caracterización de DCs en piel y ganglio linfático.

Se eliminaron las partículas pequeñas (debris) utilizando los parámetros de complejidad (SSC-A) y tamaño (FSC-A), seguido de la población de células en función de SSC-A y FSC-A, se consideraron eventos sencillos basados en los parámetros de altura (FSC-H) y área (FSC-A). Posteriormente se seleccionaron las células CD45+ Vivas (marcadas con Hoechst), seguido de la población linaje negativa (CD3, CD19, CD49b y TER119), de esta se obtuvieron las células MHC-II+ y las células MHC-II+CD11c+ denominadas DCs, a partir de esta población en función de la expresión de CD11b, CD103 y Ly6C se obtuvieron 3 poblaciones distintas: DCs CD11b+ (CD11b+, Ly6C-), DCs CD103+ (CD103+, CD11b-) e InfDCs (Ly6C+, CD11b+). En ganglio linfático se siguió la misma estrategia a excepción de la población de DCs en donde en función de la expresión de MHC-II se delimitaron dos poblaciones de DCs migratorias mDCs (CD11c alto, MHC-II alto) y residentes rDCs (CD11c alto y MHC-II intermedio).

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE POBLACIONES DE PRECURSORES DE DCs.

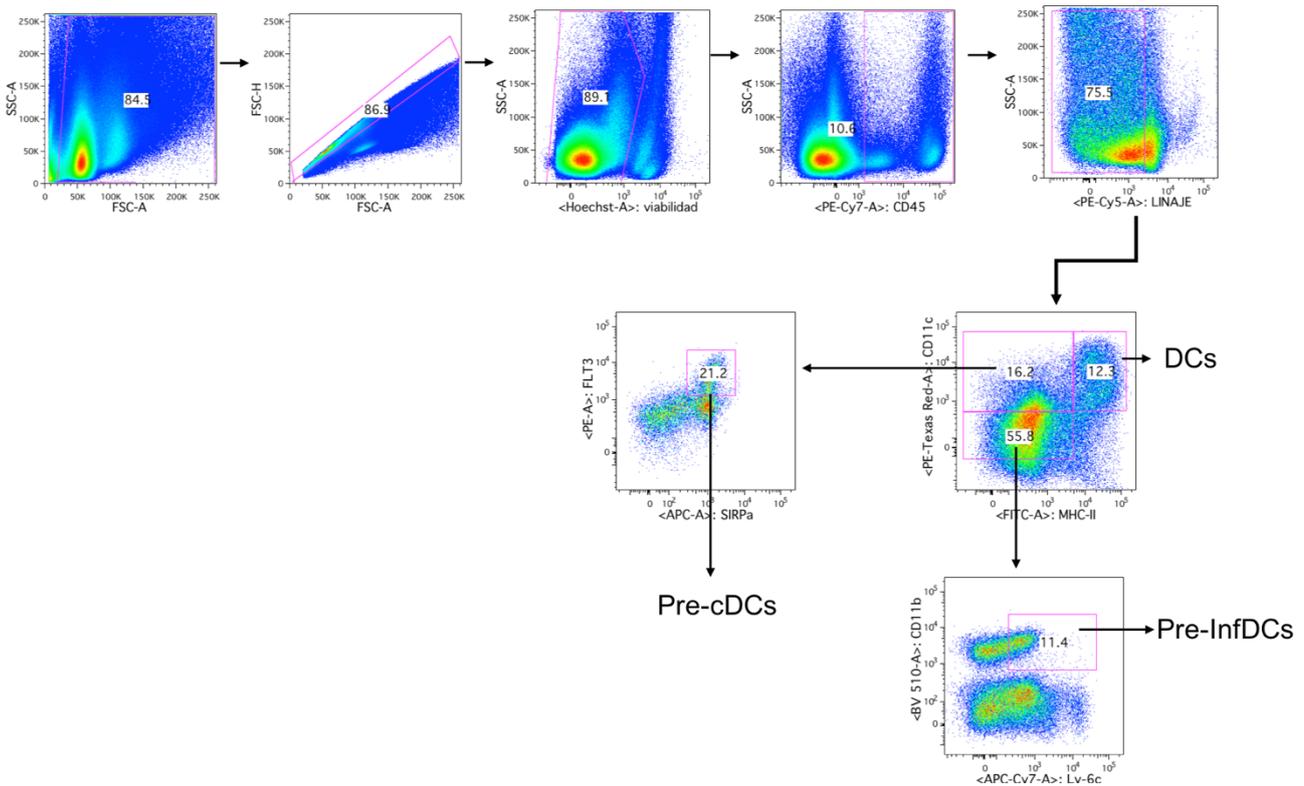


Figura 16. Estrategia de análisis para la caracterización de Pre-DCs en piel y ganglio linfático.

En piel y ganglio se eliminaron las partículas pequeñas (debris) utilizando los parámetros de complejidad (SSC-A) y tamaño (FSC-A), seguido de la población de células en función de SSC-A y FSC-A, se consideraron eventos sencillos basados en los parámetros de altura (FSC-H) y área (FSC-A). Posteriormente se seleccionaron las células CD45+ Vivas (marcadas con Hoechst), seguido de la población linaje negativa (CD3, CD19, CD49b y TER119). A partir de esta población se seleccionaron las células CD11c+ MHC-II- seguidas de la población positiva para FLT3 y SIRP α a la que se denominó Pre-DCs. De las células doble negativas para MHC-II y CD11c se delimito la población con expresión de intermedia a alta de Ly6C y positiva para CD11b, considerada precursora de InfDCs.

REFERENCIAS.

1. Pelka, K. & De Nardo, D. Emerging Concepts in Innate Immunity. in *Innate Immune Activation* (eds. De Nardo, D. & De Nardo, C. M.) vol. 1714 1–18 (Springer New York, 2018).
2. Sun, J. C., Lopez-Verges, S., Kim, C. C., DeRisi, J. L. & Lanier, L. L. NK Cells and Immune “Memory”. *J. Immunol.* **186**, 1891–1897 (2011).
3. van de Vosse, E., van Dissel, J. T. & Ottenhoff, T. H. Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 688–698 (2009).
4. Palm, N. W. & Medzhitov, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 221–233 (2009).
5. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
6. Malissen, B. & Bongrand, P. Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 539–561 (2015).
7. Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K. & Rizzi, M. B cell biology: an overview. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **14**, 434 (2014).
8. Joffre, O., Nolte, M. A., Spörri, R. & Sousa, C. R. e. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* **227**, 234–247 (2009).
9. Nakayama, T. An inflammatory response is essential for the development of adaptive immunity-immunogenicity and immunotoxicity. *Vaccine* **34**, 5815–5818 (2016).
10. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142–1162 (1973).
11. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
12. Williams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. 1–8 (2014) doi:10.1038/nri3712.
13. Walter, T. Dendritic cells : Multiple subtypes , multiple origins , multiple functions. 161–165 (2000).
14. del Rio, M.-L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.-I. & Förster, R. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol. Rev.* **234**, 268–281 (2010).
15. Askew, D. & Clifford, V. Antigen processing and CD 24 expression determine antigen presentation by splenic CD 4 + and CD 8 + dendritic cells. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02711.x.
16. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
17. Bonacina, F. *et al.* Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. *Nat. Commun.* **9**, 3083 (2018).
18. Mondanelli, G. *et al.* A Relay Pathway between Arginine and Tryptophan Metabolism Confers Immunosuppressive Properties on Dendritic Cells. *Immunity* **46**, 233–244 (2017).
19. Pühr, S., Lee, J., Zvezdova, E., Zhou, Y. J. & Liu, K. Dendritic cell development—History, advances, and open questions. *Semin. Immunol.* (2016) doi:10.1016/j.smim.2016.03.012.
20. Tibor, K., Peter, M. M., M, D. M. & Garry, N. High - dimensional phenotypic map of human dendritic cell subsets among individuals and tissues.
21. Shortman, K. & Liu, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151–161 (2002).

22. Liu, K. & Nussenzweig, M. C. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* **234**, 45–54 (2010).
23. Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259–262 (2001).
24. Anandasabapathy, N. *et al.* Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *J. Exp. Med.* **211**, 1875–1891 (2014).
25. Kazi, J. U. & Rönnstrand, L. The role of SRC family kinases in FLT3 signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **107**, 32–37 (2019).
26. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
27. Pakalniškytė, D. & Schraml, B. U. Tissue-Specific Diversity and Functions of Conventional Dendritic Cells. *Adv. Immunol.* **134**, 89–135 (2017).
28. Alcántara-Hernández, M. *et al.* High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* **47**, 1037–1050.e6 (2017).
29. Vroman, H., Hendriks, R. W. & Kool, M. Dendritic cell subsets in asthma: Impaired Tolerance or exaggerated inflammation? *Front. Immunol.* **8**, 1–11 (2017).
30. Williams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 571–578 (2014).
31. Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* **34**, 440–445 (2013).
32. Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Myeloid dendritic cells: DEVELOPMENT, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology* **220**, 833–844 (2015).
33. Roe, M. M. *et al.* Differential regulation of CD103 (α E integrin) expression in human dendritic cells by retinoic acid and Toll-like receptor ligands. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 1169–1180 (2017).
34. Chandra, J., Kuo, P. T. Y., Hahn, A. M., Belz, G. T. & Frazer, I. H. Batf3 selectively determines acquisition of CD8 + dendritic cell phenotype and function. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 215–223 (2017).
35. Mayer, C. T. *et al.* Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103⁺ dendritic cells from mouse bone marrow. *Blood* **124**, 3081–3091 (2014).
36. Schlitzer, A. *et al.* IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b⁺ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* **38**, 970–983 (2013).
37. Salmon, H. *et al.* Expansion and Activation of CD103⁺ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* **44**, 924–938 (2016).
38. Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19–30 (2007).
39. Ginhoux, F. & Schlitzer, A. CD11b⁺ DCs rediscovered: implications for vaccination. *Expert Rev. Vaccines* **13**, 445–447 (2014).
40. León, B., López-Bravo, M. & Ardavin, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity* **26**, 519–531 (2007).
41. Malissen, B., Tamoutounour, S. & Henri, S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 417–428 (2014).
42. Rubio, M. T. *et al.* Maturation of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) in the presence of prostaglandin E2 optimizes CD4 and CD8 T cell-mediated responses to protein antigens:

- Role of PGE2 in chemokine and cytokine expression by MoDCs. *Int. Immunol.* **17**, 1561–1572 (2005).
43. Osterholzer, J. J. *et al.* Accumulation of CD11b + Lung Dendritic Cells in Response to Fungal Infection Results from the CCR2-Mediated Recruitment and Differentiation of Ly-6C high Monocytes. *J. Immunol.* **183**, 8044–8053 (2009).
 44. Goudot, C. *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* **47**, 582–596.e6 (2017).
 45. Matejuk, A. Skin Immunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **66**, 45–54 (2018).
 46. Kaplan, D. H. Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells. *Nat. Immunol.* **18**, 1068–1075 (2017).
 47. Yao, C. *et al.* Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 1387–1397.e7 (2015).
 48. Fehres, C. M. *et al.* Langerin-mediated internalization of a modified peptide routes antigens to early endosomes and enhances cross-presentation by human Langerhans cells. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 360–370 (2017).
 49. Kim, T.-G., Kim, S. H. & Lee, M.-G. The Origin of Skin Dendritic Cell Network and Its Role in Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2017).
 50. Harpur, C. M. *et al.* Classical Type 1 Dendritic Cells Dominate Priming of Th1 Responses to Herpes Simplex Virus Type 1 Skin Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **202**, 653–663 (2019).
 51. Henri, S. *et al.* CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **207**, 189–206 (2010).
 52. Wang, R. *et al.* Flt3 inhibition alleviates chronic kidney disease by suppressing CD103+ dendritic cell-mediated T cell activation. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **34**, 1853–1863 (2019).
 53. Pigni, M., Ashok, D., Stevanin, M. & Acha-Orbea, H. Establishment and Characterization of a Functionally Competent Type 2 Conventional Dendritic Cell Line. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 54. Deckers, J., Hammad, H. & Hoste, E. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Front. Immunol.* **9**, 93 (2018).
 55. Wylie, B. *et al.* CD8 + XCR1 neg dendritic cells express high levels of toll-like receptor 5 and a unique complement of endocytic receptors. *Front. Immunol.* **10**, 1–16 (2019).
 56. deLuca, L. S. *et al.* LTβR signaling in dendritic cells induces a type I IFN response that is required for optimal clonal expansion of CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2046–2051 (2011).
 57. Askew, D. & Harding, C. V. Antigen processing and CD24 expression determine antigen presentation by splenic CD4 + and CD8 + dendritic cells. *Immunology* **123**, 447–455 (2008).
 58. Shiokawa, A., Kotaki, R., Takano, T., Nakajima-Adachi, H. & Hachimura, S. Mesenteric lymph node CD11b- CD103+ PD-L1High dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology* **152**, 52–64 (2017).
 59. Bouteau, A. *et al.* DC Subsets Regulate Humoral Immune Responses by Supporting the Differentiation of Distinct Tfh Cells. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
 60. Schlitzer, A. *et al.* IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity* **38**, 970–983 (2013).
 61. Ben Jmaa, M. *et al.* Involvement of the IL23/Th17 Pathway in the Pathogenesis of Tunisian Pemphigus Foliaceus. *Mediators Inflamm.* **2018**, 8206983 (2018).
 62. Maruoka, S., Inaba, M. & Ogata, N. Activation of Dendritic Cells in Dry Eye Mouse Model. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **59**, 3269 (2018).
 63. Malissen, B. & Bongrand, P. Early T Cell Activation: Integrating Biochemical, Structural, and Biophysical Cues. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 539–561 (2015).
 64. Worbs, T., Hammerschmidt, S. I. & Förster, R. Dendritic cell migration in health and disease.

- Nat. Rev. Immunol.* **17**, 30–48 (2017).
65. Russo, E. *et al.* Intralymphatic CCL21 Promotes Tissue Egress of Dendritic Cells through Afferent Lymphatic Vessels. *Cell Rep.* **14**, 1723–1734 (2016).
 66. Yan, Y. *et al.* CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
 67. Bonacina, F. *et al.* Myeloid apolipoprotein E controls dendritic cell antigen presentation and T cell activation. *Nat. Commun.* **9**, 3083 (2018).
 68. Pearce, E. J. & Everts, B. Dendritic cell metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 18–29 (2015).
 69. Nobs, S. P. *et al.* PI3-Kinase- γ Has a Distinct and Essential Role in Lung-Specific Dendritic Cell Development. *Immunity* **43**, 674–689 (2015).
 70. Kelly, B. & O'Neill, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* **25**, 771–784 (2015).
 71. de Lima Thomaz, L. *et al.* The impact of metabolic reprogramming on dendritic cell function. *Int. Immunopharmacol.* **63**, 84–93 (2018).
 72. Mogilenko, D. A. *et al.* Metabolic and Innate Immune Cues Merge into a Specific Inflammatory Response via the UPR. *Cell* **177**, 1201-1216.e19 (2019).
 73. Chakhtoura, M. *et al.* Ethyl Pyruvate Modulates Murine Dendritic Cell Activation and Survival Through Their Immunometabolism. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
 74. Wu, Y. *et al.* Lactate induces osteoblast differentiation by stabilization of HIF1 α . *Mol. Cell. Endocrinol.* **452**, 84–92 (2017).
 75. Mills, E. & O'Neill, L. A. J. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* **24**, 313–320 (2014).
 76. Mills, E. L. *et al.* Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* **167**, 457-470.e13 (2016).
 77. Benn, C. S., Netea, M. G., Selin, L. K. & Aaby, P. A small jab – a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol.* **34**, 431–439 (2013).
 78. Chiricozzi, E., Mauri, L., Ciampa, M. G., Prinetti, A. & Sonnino, S. On the use of cholera toxin. *Glycoconj. J.* **35**, 161–163 (2018).
 79. Basu, I. & Mukhopadhyay, C. Insights into Binding of Cholera Toxin to GM1 Containing Membrane. *Langmuir* **30**, 15244–15252 (2014).
 80. Sánchez, J. & Holmgren, J. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1347–1360 (2008).
 81. Baldauf, K., Royal, J., Hamorsky, K. & Matoba, N. Cholera Toxin B: One Subunit with Many Pharmaceutical Applications. *Toxins* **7**, 974–996 (2015).
 82. Clemens, J., Shin, S., Sur, D., Nair, G. B. & Holmgren, J. New-generation vaccines against cholera. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 701–710 (2011).
 83. Olivera, N. *et al.* Immunization with the Recombinant Cholera Toxin B Fused to Fimbria 2 Protein Protects against *Bordetella pertussis* Infection. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–11 (2014).
 84. Kim, T.-G. *et al.* Immunogenicity of a Cholera Toxin B Subunit Porphyromonas gingivalis Fimbrial Antigen Fusion Protein Expressed in E. coli. *Mol. Biotechnol.* **41**, 157–164 (2009).
 85. Royal, J. & Matoba, N. Therapeutic Potential of Cholera Toxin B Subunit for the Treatment of Inflammatory Diseases of the Mucosa. *Toxins* **9**, 379 (2017).
 86. Phongsisay, V., Iizasa, E., Hara, H. & Yoshida, H. Evidence for TLR4 and Fc γ -CARD9 activation by cholera toxin B subunit and its direct bindings to TREM2 and LMIR5 receptors. *Mol. Immunol.* **66**, 463–471 (2015).
 87. Netea, M. G. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 881–884 (2013).
 88. Gourbal, B. *et al.* Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunol. Rev.* **283**, 21–40 (2018).

89. Domínguez-Andrés, J., Joosten, L. A. & Netea, M. G. Induction of innate immune memory: the role of cellular metabolism. *Curr. Opin. Immunol.* **56**, 10–16 (2019).
90. Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* **352**, aaf1098–aaf1098 (2016).
91. Netea, M. G., Quintin, J. & van der Meer, J. W. M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe* **9**, 355–361 (2011).
92. Arts, R. J. W. *et al.* BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe* **23**, 89-100.e5 (2018).
93. Arts, R. J. W. *et al.* Long-term in vitro and in vivo effects of γ -irradiated BCG on innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 995–1001 (2015).
94. Arts, R. J. W. *et al.* Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep.* **17**, 2562–2571 (2016).
95. Dominguez-Andres, J. & Netea, M. G. Long-term reprogramming of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 329–338 (2019).
96. Wei, H., Nash, W. T., Makrigiannis, A. P. & Brown, M. G. Impaired NK-cell education diminishes resistance to murine CMV infection. *Eur. J. Immunol.* **44**, 3273–3282 (2014).
97. Netea, M. G. & van Crevel, R. BCG-induced protection: Effects on innate immune memory. *Semin. Immunol.* **26**, 512–517 (2014).
98. van der Meer, J. W. M., Joosten, L. A. B., Riksen, N. & Netea, M. G. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Mol. Immunol.* **68**, 40–44 (2015).
99. Dos Santos, J. C. *et al.* β -Glucan-Induced Trained Immunity Protects against *Leishmania braziliensis* Infection: a Crucial Role for IL-32. *Cell Rep.* **28**, 2659-2672.e6 (2019).
100. Garcia-Valtanen, P., Guzman-Genuino, R. M., Williams, D. L., Hayball, J. D. & Diener, K. R. Evaluation of trained immunity by β -1, 3 (d)-glucan on murine monocytes in vitro and duration of response in vivo. *Immunol. Cell Biol.* **95**, 601–610 (2017).
101. Quintin, J. *et al.* *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* **12**, 223–232 (2012).
102. Thompson, A. *et al.* The protective effect of inflammatory monocytes during systemic *C. albicans* infection is dependent on collaboration between C-type lectin-like receptors. *PLoS Pathog.* **15**, e1007850 (2019).
103. Mourits, V. P. *et al.* The role of Toll-like receptor 10 in modulation of trained immunity. *Immunology* (2019) doi:10.1111/imm.13145.
104. Rusek, P., Wala, M., Druszczyńska, M. & Fol, M. Infectious Agents as Stimuli of Trained Innate Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
105. Götz, A. *et al.* Atypical activation of dendritic cells by *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E10568–E10577 (2017).
106. He, Y., Jackman, N. A., Thorn, T. L., Vought, V. E. & Hewett, S. J. Interleukin-1 β protects astrocytes against oxidant-induced injury via an NF- κ B-Dependent upregulation of glutathione synthesis: IL-1 β Increases GSH and Protects Astrocytes. *Glia* **63**, 1568–1580 (2015).
107. Xia, Y. & Zhai, Q. IL-1 β enhances the antibacterial activity of astrocytes by activation of NF- κ B: IL-1 β Enhances the Antibacterial Activity. *Glia* **58**, 244–252 (2010).
108. Mitroulis, I. *et al.* Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell* **172**, 147-161.e12 (2018).
109. Christ, A. *et al.* Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell* **172**, 162-175.e14 (2018).
110. Saeed, S. *et al.* Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* **345**, 1251086–1251086 (2014).
111. Arts, R. J. W. *et al.* Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic

- and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab.* **24**, 807–819 (2016).
112. Arts, R. J. W., Joosten, L. A. B. & Netea, M. G. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin. Immunol.* **28**, 425–430 (2016).
 113. Bekkering, S. *et al.* Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell* **172**, 135-146.e9 (2018).
 114. Cheng, S.-C. *et al.* mTOR- and HIF-1 -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* **345**, 1250684–1250684 (2014).
 115. van der Heijden, C. D. C. C. *et al.* Epigenetics and Trained Immunity. *Antioxid. Redox Signal.* **29**, 1023–1040 (2018).
 116. Laukka, T. *et al.* Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. *J. Biol. Chem.* **291**, 4256–4265 (2016).
 117. Adam, J., Yang, M., Soga, T. & Pollard, P. J. Rare insights into cancer biology. *Oncogene* **33**, 2547–2556 (2014).
 118. Lim, P. S., Li, J., Holloway, A. F. & Rao, S. Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system. *Immunology* **139**, 285–293 (2013).
 119. Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Di Croce, L. & Cavalli, G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* **171**, 34–57 (2017).
 120. Antonio-Herrera, L. *et al.* The Nontoxic Cholera B Subunit Is a Potent Adjuvant for Intradermal DC-Targeted Vaccination. *Front. Immunol.* **9**, 2212 (2018).
 121. Bordon, Y. Innate memory training. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 713–713 (2014).
 122. Samir, P., Malireddi, R. K. S. & Kanneganti, T.-D. Food for Training—Western Diet and Inflammatory Memory. *Cell Metab.* **27**, 481–482 (2018).
 123. Ge, X.-Y. *et al.* TLR4-dependent internalization of CX3CR1 aggravates sepsis-induced immunoparalysis. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 5696–5705 (2016).
 124. Shortman, K. Dendritic cells: Multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 161–165 (2000).
 125. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
 126. Liu, K. *et al.* In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science* 1170540 (2009) doi:10.1126/science.1170540.
 127. Salmon, H. *et al.* Expansion and Activation of CD103 + Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* **44**, 924–938 (2016).

