

Modulación por el oxígeno del metabolismo Warburg y de los niveles de adenosina en el microentorno tumoral

Mariano Sánchez Crespo. Instituto de Biología y Genética Molecular, CSIC-Universidad de Valladolid.

El estudio se inició con la idea de analizar las características del metabolismo energético en las células del sistema inmune y el propósito más específico de caracterizar el papel de la glicólisis y de la fosforilación oxidativa en las células dendríticas humanas derivadas de monocitos (DC), puesto que estas células infiltran los tumores y están sometidas a una interacción intensa con el microentorno tumoral, de tal manera que modifican su capacidad de destruir las células neoplásicas para contribuir a favorecer el crecimiento tumoral. Como se ha descrito gráficamente, las células del sistema inmune pasarían a considerar a las células tumorales como "células clientes" a las que facilitan su crecimiento e invasión de los tejidos (1). Dado que la mayor parte de los estudios se han realizado en ratones, la primera prioridad debe ser la caracterización del comportamiento de las células humanas con el fin de definir en que forma se pueden transferir estos resultados a la clínica. En este sentido, las células murinas presentan un bloqueo intenso de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) tras la estimulación por patógenos que se ha relacionado con dos rutas metabólicas independientes: i) La inhibición por el NO de la cadena de transporte de electrones (2,3) y ii) la elevada producción de itaconato (metilen-succinato) (4), que inhibe la succinato dehidrogenasa y, por lo tanto, conduce a la disminución de los niveles de fumarato y a la consiguiente reducción de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) (5,6). De esta forma, el itaconato constituye un claro nexo entre las dos discontinuidades del ciclo de Krebs en los macrófagos murinos, la existente a nivel de la isocitrato-dehidrogenasa acoplada a la producción de itaconato y de acetil-CoA en el citoplasma a partir del citrato, y el freno a la producción de fumarato por la salida del succinato de las mitocondrias al citoplasma. La ruta del itaconato es poco activa en el humano, dado que la producción en macrófagos humanos es dos órdenes de magnitud inferior a la producción murina (4) y la producción de NO por la Isoforma inducible de la NO sintasa es irrelevante en el humano.

El hecho de que los metabolitos puedan comportarse como reguladores de la respuesta inmune de forma independiente de la producción de energía plantea la necesidad de valorar su efecto en dos contextos diferentes: metabolitos endógenos de las células y metabolitos exógenos aportados por el metabolismo general del organismo, la microbiota o microentornos tumorales e inflamatorios.

La labor realizada se desglosa como sigue:

Efecto de la estimulación en entornos normóxico e hiperóxico sobre la diferenciación funcional de las células dendríticas y la producción de citocinas- La incubación de las células en una atmósfera con una concentración de O₂ del 40% y del 5% de N₂, en lugar de la concentración atmosférica de O₂ del 21%, modificó el patrón de expresión de varios marcadores de diferenciación de maduración dendrítica cuya relación con la capacidad de presentación de antígenos y la migración a los nódulos linfáticos es bien conocida, siendo más claro el efecto sobre las células estimuladas con 10 µg/ml de lipopolisacárido bacteriano (LPS) que cuando se mantuvieron en atmósfera hiperóxica en ausencia del estímulo pro-inflamatorio. La expresión de CD14 se encontró en un número reducido de células, ya que no superó el 10% de positividad y se produjo un aumento significativo en presencia de LPS. La expresión de CD40 disminuyó significativamente con la hiperoxia, mientras que la

expresión de CD86 mostró una tendencia a aumentar en las mismas condiciones, aunque no alcanzó significación estadística. La expresión de CCR7, que determina la capacidad migratoria de las células, no se modificó significativamente, lo que sugiere que la hiperoxia no modifica la respuesta de estas células al estímulo migratorio a los nódulos linfáticos (Fig. 1).

La producción de citocinas mostró cambios significativos entre la normoxia y la hiperoxia. Estos cambios fueron especialmente intensos en lo que se refiere a los genes *IL12A* (codifica la cadena p35 de IL-12 p70) e *IL23A* (codifica la cadena p19 de IL-23). La consecuencia de este patrón de expresión génica es la polarización del patrón de las citocinas heterodiméricas de la familia IL-12: IL-12 p70 e IL-23. Estos cambios se detectaron tan pronto como 4 horas después del inicio de la hiperoxia. Por el contrario, los efectos de la hiperoxia sobre las citocinas IL-1 β e IL-10 sólo se observaron tras 24 horas de incubación (Fig. 2).

Estos datos plantean cuestiones relevantes en cuanto al mecanismo de regulación transcripcional de estas citocinas. Excepto en el caso de la IL-10, regulada por el factor de transcripción CREB, las citocinas estudiadas se regulan mediante la colaboración de las proteínas de la familia NF- κ B con otros factores. En el caso de la IL-1 β (codificada por el gen *IL1B*) los factores implicados son HIF1 y como se ha propuesto recientemente CREB (7). Asimismo, la interacción con la piruvato quinasa 2 (PKM2) nuclear juega un papel relevante, como se ha mencionado anteriormente. Los experimentos de expresión de la proteína HIF1 α , que se muestran más abajo serían compatibles con la participación de este factor a partir de las 4 horas, que es cuando se detecta su inducción por los estímulos proinflamatorios en ausencia de hipoxia (Fig. 3A).

Puesto que los experimentos dedicados al estudio del perfil bioenergético se realizan en un medio de composición definida que incluye medio RPMI 1640 conteniendo D-glucosa 11,1 mM, L-glutamina 4 mM, piruvato 1 mM y suero bovino fetal (FBS) al 2%, en lugar de la concentración usual de FBS al 10%, se realizaron experimentos para comparar si la distinta concentración de FBS afecta al comportamiento celular. La insistencia en precisar este aspecto se explica por la presencia en el FBS de altas concentraciones de moléculas con alto valor energético como acetato, lactato y piruvato. Como se muestra en la Fig. 4, la disminución de la concentración de FBS sólo mostró cambios sobre la inducción del mRNA de *IL12A*.

Análisis del perfil bioenergético de las células dendríticas humanas:

Consumo de O₂ y acidificación extracelular- El análisis bioenergético se realizó utilizando el equipo Seahorse Bioscience XF24 Extracellular Flux analyzer. Las CD se estimularon con LPS o zymosan y se adhirieron inmediatamente o tras 4 horas de incubación a placas Seahorse revestidas de poli-ornitina. La tasa de acidificación extracelular (ECAR) y la OCR se analizaron de acuerdo con el protocolo XF Cell Mito Stress Test kit en medio XF (medio RPMI 1640 no tamponado, con glucosa 11,1 mM, 4 mM L-glutamina y 1 mM piruvato sódico), en condiciones basales y en respuesta a 1 μ M oligomicina (bloquea el canal de protones en la fracción F₀ de la ATP sintasa), 1,5 μ M FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona, desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria) y 100 nM rotenona (inhibe el complejo I de la cadena respiratoria) más 1 μ M antimycina A (inhibidor del complejo III).

La estimulación de las CD con LPS produjo un aumento de la ECAR dependiente de la concentración, que se pudo detectar inmediatamente tras la adición del estímulo en el XF Mito Stress Test (Fig. 5A). La medida de la OCR mostró valores estables en el caso del LPS (Fig. 5B) y una tendencia a incrementarse en el caso del zymosan que, sin embargo, no alcanzó significación estadística (Fig. 5C). Los valores de la ECAR fueron bastante más elevados en respuesta al zymosan y mostraron un patrón más

reproducibles (Fig. 5C). Estos resultados son compatibles con un aumento neto de la glicolisis tras la adición de zymosan que se mantiene durante un tiempo prolongado a juzgar por la caída neta de la razón OCR/ECAR (Fig. 5B y C, paneles inferiores).

Posibles mecanismos asociados con la reprogramación metabólica- Uno de los mecanismos usualmente asociados con el aumento de la glicolisis en presencia de normoxia, habitualmente denominado efecto Warburg o glicolisis aeróbica, es la activación de la actividad de HIF1 por la estabilización de su subunidad HIF1 α . Esto explica la inducción de la expresión de enzimas glicolíticas, que a su vez en macrófagos depende de la formación de un complejo con la PKM2 (8), que se transloca al núcleo y regula la expresión de varios enzimas proglucolíticos (9). Debe resaltarse que la PKM2 posee funciones adicionales al actuar como una proteína quinasa que fosforila STAT3 en la Y705 (10) y la histona H3 (11). Ello explica un *feedback* positivo entre HIF y STAT3, puesto que P-Y705-STAT3 activa la transcripción de HIF1 α (12,13). En un estudio previo hemos observado que el LPS y el zymosan son activadores robustos de la fosforilación de Y705-STAT3 mediante la inducción de mediadores secundarios (14). En concordancia con estos datos, la presencia de P-Y705-STAT3 en los extractos nucleares mostró un patrón temporal compatible con su implicación en la expresión de HIF1 α (Fig. 3A). Una muestra del incremento de la actividad transcripcional fue la inducción de fosforilación y acetilación de la histona H3 (Fig. 3B). La translocación nuclear de HIF1 α se confirmó en estudios de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal (Fig. 3C). La intensa expresión de PKM2 en las CD se confirmó por *Western blot* (Fig. 3D) e inmunofluorescencia, que mostró la presencia de la enzima en los núcleos y en las zonas de citoplasma que rodean a las partículas de zymosan fagocitadas (Fig. 3E), así como por el análisis de su mRNA por RT-PCR. El análisis con pares de *primers* seleccionados para generar productos distinguibles por su número de pares de bases (bp), mostró tras la digestión con StuI productos de 149 y 34 bp en la PKM2, mientras que la digestión del amplicon de la PKM1 fue negativa (Fig. 3F). Tomados colectivamente, estos datos muestran la presencia de P-Y705-STAT3 y la inducción de HIF1 α en los núcleos de las CD estimuladas con zymosan y LPS, así como la alta expresión de la proteína PKM2. Sin embargo, el patrón temporal de la translocación nuclear de HIF1 α no es paralelo a la precocidad de los cambios en la OCR y la ECAR, lo que sugiere que mecanismos adicionales sean los responsables de la rápida reprogramación bioenergética de las CD, por ejemplo, la asociación de la hexoquinasa II con los canales aniónicos dependientes de voltaje que se expresan en la parte exterior de la membrana mitocondrial (15). Estos resultados nos sugirieron la conveniencia de realizar experimentos con 2-desoxiglucosa (2-DG), un inhibidor de la hexoquinasa. La adición de 2-DG indujo una disminución de la producción de lactato en respuesta a LPS y zymosan menor que la inducida por la depleción de glucosa (Fig. 6A). Sin embargo, modificó de forma notable la expresión del mRNA de varias citocinas (Fig. 6B), especialmente la expresión de *IL23A* e *IL12B*. Curiosamente, la expresión de *IL10* e *IL1B* se inhibió por la 2-DG sólo en el caso de la estimulación por LPS, lo que indicaría la existencia de mecanismos de activación transcripcional específicos de cada estímulo. Cuando se midió la expresión de la proteína IL-23, se observó un gran aumento de la producción en respuesta a LPS, sin que fuese significativa la diferencia observada en respuesta al zymosan (Fig. 6C). Estos datos sugieren que la alta producción de IL-23 inducida por el zymosan hace difícil el aumento de la producción y, por otra parte, la reducida expresión de la cadena p40 limita la formación del dímero p19/p40, que es la IL-23. Dado que los resultados obtenidos en ausencia de glucosa fueron muy distintos de los obtenidos en presencia de 2-DG y esto era un hallazgo inesperado, se realizaron nuevos experimentos con el propósito de analizar el mecanismo por el que la 2-DG producía este efecto. Teniendo en cuenta que los

monosacáridos se utilizan no sólo como fuente de energía, sino que se emplean como precursores de las cadenas de glicanos en forma de O- y N-glicosilaciones y la ausencia de N-glicosilaciones produce stress de retículo endoplasmático y la respuesta de proteínas mal plegadas, se realizaron experimentos para tratar de determinar si la 2-DG, que es también el producto de la pérdida del grupo OH en posición 2 de la manosa, afectaba al metabolismo de la manosa y a su incorporación al oligosacárido unido a dolichol G1c3-Man9-G1cNAc2, que interviene en los pasos iniciales de la N-glicosilación (16). Esta reacción requiere como pasos previos la formación de GDP-manosa a partir de GTP y manosa-6-fosfato por las enzimas fosfomanomutasa y manosa-1-fosfato guanililtransferasa. Sobre estas bases y dado que la concentración de manosa en el medio interno es muy inferior a la concentración de glucosa, es fácil comprender como la 2-DG ejerza un efecto muy intenso sobre la disponibilidad de manosa para las reacciones de N-glicosilación. A la vista de la intensidad de los cambios funcionales inducidos por la 2-DG y con el fin de determinar si el efecto observado sobre la producción de citocinas podría explicarse por una acción sobre la captación de partículas fagocitarias o la generación de mediadores autocrinos derivados del ácido araquidónico, se analizó mediante citometría de flujo la captación de partículas de zymosan marcadas con el fluoróforo Alexa 488® mediante inmunofluorescencia de citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 7B, el tratamiento con 2-DG no modificó de forma significativa la captación de las partículas. Este resultado concuerda con los resultados de Michl et al., (17,18), quienes demostraron que la 2-DG, a diferencia de lo que ocurre en la fagocitosis opsónica mediada por los receptores para la porción Fc de la molécula de IgG o por los receptores de moléculas generadas por la activación del sistema del complemento, no afecta la fagocitosis no-opsónica y que ese efecto podía disociarse del efecto inhibitorio de la 2-DG sobre la generación de ATP. Aunque no lograron demostrar el mecanismo íntimo que explicaría el proceso, propusieron que podría explicarse por la deficiente glicosilación de los receptores FcγR y la integrina α_Mβ₂, también denominada CR3 por ser el receptor de la porción C3b resultante de la opsonización de partículas por factores del complemento. Estos receptores están ampliamente glicosilados, mientras que una única glicosilación en una de las isoformas de los receptores implicados en el reconocimiento de los componentes del zymosan no influye en su funcionalidad. A la vista de estos resultados y puesto que se ha descrito que la 2-DG reduce la N-glicosilación y la actividad enzimática de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (19), una enzima clave del metabolismo de las prostaglandinas que contiene cuatro asparraginas, tres de las cuales se localizan en el centro activo y son necesarias para su plegamiento correcto y la actividad catalítica (20), comprobamos que en nuestro sistema el tratamiento con 2-DG induce deglicosilación de COX-2, analizada mediante inmunodetección, puesto que se observó el aumento de migración electroforética de la enzima deglicosilada, al observarse una banda de masa molecular aparente de 66-70 kDa, en comparación con la masa de 72-74 kDa de la proteína expresada en condiciones normales (Fig. 3D). En lo que se refiere a la liberación de ácido araquidónico, la 2-DG no modificó significativamente su liberación ni la producción de 12-HETE, aunque sí disminuyó la liberación de leucotrieno B₄ y no se detectó producción de PGE₂ en estas condiciones (Fig. 7C).

Caracterización de los mecanismos de acción del lactato, el succinato y la anaplerosis de la L-glutamina.

Efecto del lactato sobre la función de las CD El lactato ha alcanzado la consideración de una molécula central en la señalización bioquímica dada su producción por los fagocitos y su presencia a altas concentraciones en el entorno tumoral, donde puede

llegar a niveles de hasta 30 mM. El efecto del lactato puede ejercerse a través de sensores intracelulares o mediante interacción con receptores de membrana acoplados a proteínas G (21,22). Con el fin de descifrar el posible mecanismo de acción, se determinó la expresión de los receptores de lactato *HCAR1/GPR81* y *OR51E2*, el ortólogo humano de *Olf78*, que actúa como un sensor de hipoxia en el circuito respiratorio a través de la interacción con el lactato (23). La expresión del mRNA de *HCAR1* se detectó a muy bajo nivel en CD y el mRNA de *OR51E2* fue casi indetectable tras 40 ciclos de PCR en tiempo real (Fig. 8A). *SLC2A1* (el gen que codifica el transportador de glucosa 1) mostró un alto nivel de expresión de su mRNA y se incrementó tras la estimulación con zymosan y LPS. El mRNA de *HIF1A* se expresó con un alto nivel en células en reposo y mostró tendencia a incrementarse tras la estimulación. A diferencia de *SLC2A1* e *HIF1A*, la expresión del mRNA de *HCAR1* y *OR51E2* se redujo tras la estimulación y también cuando se suplementó el medio con lactato 15 mM, una concentración que se emplea usualmente como referencia en los estudios (24-28). La expresión de HIF1 α inducida por el zymosan se incrementó en presencia de lactato (Fig. 8B), incluso en presencia de 2-DG, lo que indicaría la potencia del efecto del lactato, puesto que la 2-DG posee un fuerte efecto inhibitorio de la estabilización de HIF1 α (Fig. 8C) y bloquea la expresión de pro-IL-1 β (Fig. 3D). Sin embargo, la adición aislada de lactato (Fig. 8B) o succinato (Fig. 8C) no influyó en la inducción de HIF1 α . La estimulación de las CD en presencia de lactato sódico 15 mM o de ácido láctico 15 mM no modificó la expresión del mRNA de *IL1B*. Por el contrario, la expresión del mRNA de *IL10* e *IL23A* mostró una tendencia al aumento, especialmente en respuesta al zymosan en presencia de ácido láctico. El mRNA de *CXCL8*, una citocina regulada por varios factores de transcripción, por ejemplo, NF- κ B, C/EBP β y CREB, disminuyó de forma manifiesta (Fig. 8D). Estos resultados confirman la participación del sistema lactato/HIF1 en la expresión de pro-IL-1 β y desvelan un papel prominente del lactato y del ácido láctico sobre la expresión del mRNA de *IL10* e *IL23A* inducida por el zymosan.

Efecto del succinato- Dado que el succinato comparte con el lactato la capacidad de estabilizar HIF1 α y puede también actuar a través del receptor *SUCNR1/GPR91*, se midió el mRNA de *SUCNR1*. A diferencia de los receptores de lactato, las CD mostraron una alta expresión del mRNA de *SUCNR1*. De forma similar a lo referido acerca de la inhibición de la expresión de *SUCNR1* tras la estimulación con LPS (29), el zymosan produjo una intensa *down-regulation* del mRNA, que no se observó tras el tratamiento con lactato (Fig. 9A). La proteína de GPR91 se detectó por *Western blot* y mostró una tendencia a la disminución tras la estimulación (Fig. 9B). El estudio por citometría de flujo mostró la expresión de GPR91 en un número significativo de CD (Fig. 9C), cuya caracterización como tales se confirmó por la alta expresión de marcadores de diferenciación como CD11c, CD40 y CD86 (Fig. 7A). La presencia de GPR91 en algunas de las células fagocitarias se confirmó por microscopía confocal (Fig. 9D). Dado que el número de CD que expresan GPR91, es $\sim 10\%$, y por lo tanto menor que el número de CD que expresan los marcadores de diferenciación, frente a $\sim 94\%$ CD que expresan CD11c, no podemos descartar que esto sea debido al bajo rango dinámico del anticuerpo disponible. El succinato indujo la elevación de los niveles de Ca²⁺ intracelular cuando se empleó a concentraciones similares a las utilizadas para analizar su efecto sobre la expresión de citocinas (29). Un efecto similar se indujo por el fumarato, mientras que el lactato sólo mostró algún efecto a concentraciones próximas a 15 mM (Fig. 10A). Curiosamente, la estimulación de las CD con zymosan durante una hora mostró una completa inhibición de la respuesta. Por el contrario, la respuesta al ATP, supuestamente ejercida a través del receptor purinérgico P2Y11 (30) no sufrió modificación, lo que sugiere que la falta de respuesta al succinato y al fumarato puede

explicarse por la desensibilización selectiva del receptor GPR91 (Fig. 10B and C). Dado que el zymosan produce una movilización rápida del ácido araquidónico a través de la activación dependiente de Ca^{2+} de la fosfolipasa A_2 citosólica, que es un mecanismo implicado en la transactivación de *IL23A* (31), se realizaron experimentos para analizar si el succinato a través de GPR91 podría potenciar la respuesta. Como se muestra en las Fig. 10D-E, el succinato indujo una liberación muy escasa de araquidonato y solo aumentó ligeramente el efecto del LPS, mientras que el efecto del zymosan no se modificó. Dado que la activación del GPR91 se ejerce preferentemente a través de proteínas G_{oi} (32-34), que interfieren con la elevación de AMP cíclico producido por otros agonistas, pero puesto que también activan la vía MAP/ERK y elevan los niveles intracelulares de Ca^{2+} , puede interpretarse que el succinato ejerza distintos efectos sobre la expresión de las distintas citocinas. Los experimentos mostraron, en general, efectos inhibitorios sobre los niveles de mRNA de *TNFA*, *IL1B*, *IL23A* e *IL10*, alcanzándose significaciones estadísticas para concentraciones superiores a 0.2 mM (Fig. 11).

Efecto de la L-glutamina- Se estudió el efecto de la depleción de L-glutamina dada su participación en el ciclo de Krebs y en la biosíntesis de hexosaminas, puesto que el grupo amino de la glutamina es transferido a la fructosa-6-P para producir glucosamina por la enzima glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa 1 (GFPT1). Dada la relevancia de los hallazgos referentes a las N-glicosilaciones, se abordó el efecto de la L-glutamina sobre la inducción de citocinas y la inducción de stress de retículo endoplasmático y respuesta de proteínas mal plegadas, dado que recientemente se ha descrito que la glutaminólisis contribuye a restaurar la homeostasis metabólica al aumentar la expresión de GFPT1 a través de un mecanismo dependiente de XBP1 y α -cetoglutarato (35). La depleción de L-glutamina indujo un aumento significativo de la producción de lactato en CD en reposo tras 24 horas de incubación (Fig. 12A). Sin embargo, los niveles de lactato en CD estimuladas con zymosan, oligomycina o LPS no se influyeron por la ausencia de L-glutamina. La expresión del mRNA de *IL10* e *IL23A* mRNA mostró una tendencia a la reducción en ausencia de L-glutamina, pero estos cambios sólo alcanzaron significación estadística para la expresión del mRNA de *IL23A* (Fig. 12B).

La estimulación de las CD en ausencia de L-glutamina no indujo *splicing* de XBP1, si bien los resultados sugirieron que la L-glutamina puede moderar el *splicing* inducido en presencia de 2-DG (Fig. 12C, última calle). Cuando se trató de analizar si la incubación de las CD en atmósfera de O_2 al 40% mostraba algún efecto sobre el *splicing* de XBP1, no se observó diferencia con respecto a lo observado durante la normoxia (datos no mostrados).

Estudio de los factores de transcripción operativos en el microentorno tumoral- El estudio global de la activación de factores de transcripción en el microentorno generado por la hiperoxia y la presencia de patrones moleculares derivados de patógenos ha mostrado la activación de STAT3 (Fig. 3A) y HIF1 (Fig. 3A, 3C y 8B), a juzgar por la presencia en los extractos nucleares de STAT3 fosforilado en la tirosina 705 y la inducción de la proteína HIF1 α y su translocación al núcleo. La interferencia con la activación de NF- κ B puede deducirse por la amplitud de los cambios inducidos por la hiperoxia sobre genes dependientes de la transcripción κ B-dependiente. Un resultado inesperado ha sido la activación de XBP1 por la combinación de 2-DG y la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos. Estos resultados pueden interpretarse como resultado de dos procesos complementarios: i) el incremento de la glicólisis, que disminuye la disponibilidad de glucosa para la formación de N-acetil-glucosamina (36) y ii) la inhibición de la incorporación de

manosa en el oligosacárido Glc3-Man9-GlcNAc2 unido a dolichol. Ambos procesos conducen a la aparición de stress de retículo endoplasmático por bloqueo de la N-glicosilación de proteínas y la inducción de la reacción de proteínas mal plegadas.

Dado que la trans-activación de *IL23A* inducida por el zymosan depende al menos de las proteínas NF- κ B y ATF2 (31), se estudió la unión de P-T71-ATF2 al promotor de *IL23A*. Esta unión fue parcialmente inhibida en presencia de 2-DG, lo que sugeriría que otros factores de transcripción deberían activarse en estas condiciones (Fig. 13A). Ante estos resultados se consideró la implicación de la forma con *splicing* de la proteína XBP1 (sXBP1), a la vista de: i) el robusto *splicing* de XBP1 y el efecto de los inhibidores de la endorribonucleasa IRE1 α , ii) la presencia de tres X-boxes en el promotor de *IL23A* identificados usando la base de datos TRANSFAC (31), y iii) el papel de XBP1 en la regulación de numerosos *targets* que contienen una amplia variedad de motivos de secuencia. La proteína sXBP1 se detectó en los extractos nucleares de las CD, pero su expresión no mostró cambios significativos tras varios tratamientos ni en presencia de MKC8866 (Fig. 13B). La 2-DG incrementó la unión de sXBP1 a los tres sitios estudiados, lo que sugiere la implicación de este factor de transcripción en el incremento de la expresión del mRNA de *IL23A* (Fig. 13C) y que además de la expresión de la proteína debe ser necesaria la inducción de modificaciones post-translacionales o la formación de un enhanceosoma con otros factores. Dado que sXBP1 juega también un papel central en el control de la vía biosintética de las hexosaminas al regular la expresión de GFPT1 (35), se estudió la expresión de *GFPT1* y la unión de sXBP1 al X-box situado 147 bp antes del inicio de transcripción. Las CD en reposo contenían un alto nivel de expresión del mRNA de *GFPT1* mRNA, el cual se incrementó significativamente cuando las CD se estimularon con zymosan o con LPS en presencia de 2-DG (Fig. 13E). Asimismo, la unión de sXBP1 al X-box de *GFPT1* mostró un aumento paralelo en estas condiciones (Fig. 13F). Estos resultados confirman la presencia de cantidades detectables de la proteína sXBP1 en las CD en reposo en ausencia de una evidencia clara de *splicing* del mRNA de XBP1 y sugieren que además de la expresión de la proteína, son necesarias modificaciones post-translacionales o la interacción con otros factores para que ejerza su actividad transcripcional.

En lo que se refiera al papel de C/EBP β , la trans-activación de *IL23A* por LPS se ha asociado con un conjunto de factores, donde se incluyen NF- κ B, CREB y C/EBP β . De acuerdo con el concepto de que la inhibición de las rutas IRE1 α y PERK mostraba especificidad de estímulo, la unión de C/EBP β a los tres sitios C/EBP del promotor de *IL23A* fue analizada. A diferencia del zymosan, la 2-DG aumentó de forma robusta la unión de C/EBP β a los sitios C/EBP (Fig. 13D), lo que sugeriría la asociación de este factor con el efecto sinérgico de la 2-DG sobre la expresión de *IL23A* inducida por el LPS. Estos resultados se han desarrollado en un estudio desarrollado paralelamente a éste, en el que se indica de forma expresa la ayuda recibida de la Fundación Domingo Martínez (37). Un esquema de las vías de señalización implicadas en el proceso de regulación transcripcional de *IL23A* se muestra en la Fig. 14.

Referencias

1. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat. Immunol.* 2016; 17; 9-17.
2. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, Cross JR, Jung E, Thompson CB, Jones RG, Pearce EJ. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 2010; 115:4742-4749.
3. Everts B, Amiel E, van der Windt GJ, Freitas TC, Chott R, Yarasheski KE, Pearce EL, Pearce EJ. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood* 2012; 120:1422-1431.
4. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, Binz T, Wegner A, Tallam A, Rausell A, Buttini M, Linster CL, Medina E, Balling R, Hiller K. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110:7820-7825.
5. Cordes T, Wallace M, Michelucci A, Divakaruni AS, Sapcariu SC, Sousa C, Koseki H, Cabrales P, Murphy AN, Hiller K, Metallo CM. Immuno-responsive gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels. *J Biol. Chem.* 2016; 291:14274-14284.
6. Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E, Cervantes-Barragan L, Ma X, Huang SC, Griss T, Weinheimer CJ, Khader S, Randolph GJ, Pearce EJ, Jones RG, Diwan A, Diamond MS, Artyomov MN. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab.* 2016; 24:158-166.
7. Zasłona Z, Pålsson-McDermott EM, Menon D, Haneklaus M, Flis E, Prendeville H, Corcoran SE, Peters-Golden M, O'Neill LA. The induction of pro-IL-1 β by lipopolysaccharide requires endogenous prostaglandin E₂ production. *J Immunol.* 2017. pii: 1602072. doi: 10.4049/jimmunol.1602072.
8. Pålsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MA, Sheedy FJ, Gleeson LE, van den Bosch MW, Quinn SR, Domingo-Fernandez R, Johnston DG, Jiang JK, Israelsen WJ, Keane J, Thomas C, Clish C, Vander Heiden M, Xavier RJ, O'Neill LA. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the Warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab.* 2015; 21:65-80.
9. Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011; 145:732-744.
10. Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol. Cell* 2012; 45:598-609.
11. Yang W, Xia Y, Hawke D, Li X, Liang J, Xing D, Aldape K, Hunter T, Alfred Yung WK, Lu Z. PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* 2012; 150:685-696.

12. Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM, Pan F. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011; 146:772-784.
13. Shehade H, Acolty V, Moser M, Oldenhove G. Cutting Edge: Hypoxia-inducible factor 1 negatively regulates Th1 function. *J. Immunol.* 2015; 195:1372-1376.
14. Rodríguez M, Marquez S, de la Rosa JV, Alonso S, Castrillo A, Sanchez Crespo M, Fernandez N. Fungal pattern receptors down-regulate the inflammatory response by a cross-inhibitory mechanism independent of IL-10 production. *Immunology* 2017; 150:184-198.
15. Everts B, Amiel E, Huang SC, Smith AM, Chang CH, Lam WY, Redman V, Freitas TC, Blagih J, van der Windt GJW, Artyomov MN, Jones RG, Pearce EL, Pearce EJ. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15:323-332.
16. Kurtoglu, M, Maher JC, Lampidis TJ. Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid. Redox Signal.* 2007; 9:1383–1390.
17. Michl J, Ohlbaum DJ, Silverstein SC. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. I. Description of the inhibitory effect. *J. Exp. Med.* 1976; 144:1465-1483.
18. Michl J, Ohlbaum DJ, Silverstein SC. 2-Deoxyglucose selectively inhibits Fc and complement receptor-mediated phagocytosis in mouse peritoneal macrophages II. Dissociation of the inhibitory effects of 2-deoxyglucose on phagocytosis and ATP generation. *J. Exp. Med.* 1976; 144:1484-1493.
19. Yu SM, Kim SJ. Endoplasmic reticulum stress (ER-stress) by 2-deoxy-D-glucose (2DG) reduces cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and N-glycosylation and induces a loss of COX-2 activity via a Src kinase-dependent pathway in rabbit articular chondrocytes. *Exp. Mol. Med.* 2010; 42:777-786.
20. Otto JC, DeWitt DL, Smith WL. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 18234-18242.
21. Liu C, Wu J, Zhu J, Kuei C, Yu J, Shelton J, Sutton SW, Li X, Yun SJ, Mirzadegan T, Mazur C, Kamme F, Lovenberg TW. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:2811–2822.
22. Ahmed K, Tunaru S, Tang C, Muller M, Gille A, Sassmann A, Hanson J, Offermanns S. An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metab.* 2010; 11:311–319.
23. Chang AJ, Ortega FE, Riegler J, Madison DV, Krasnow MA. Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate. *Nature* 2015; 527:240-244.

24. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014; 513:559-563.
25. Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, Inoue N. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 2008; 180:7175-7183.
26. Samuvel DJ, Sundararaj KP, Nareika A, Lopes-Virella MF, Huang Y. Lactate boosts TLR4 signaling and NF- κ B pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *J. Immunol.* 2009; 182:2476-2484.
27. Yabu M, Shime H, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, Akazawa T, Inoue N. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int. Immunol.* 2011; 23:29-41.
28. Peter K, Rehli M, Singer K, Renner-Sattler K, Kreutz M. Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 457:412-418.
29. Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, Schwärzler C, Junt T, Voshol H, Meingassner JG, Mao X, Werner G, Rot A, Carballido JM. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat. Immunol.* 2008; 9:1261-1269.
30. Chadet S, Ivanes F, Benoist L, Salmon-Gandonnière C, Guibon R, Velge-Roussel F, Babuty D, Baron C, Roger S, Angoulvant D. Hypoxia/reoxygenation inhibits P2Y11 receptor expression and its immunosuppressive activity in human dendritic cells. *J. Immunol.* 2015; 195:651-660.
31. Rodríguez M, Márquez S, Montero O, Alonso S, Frade JG, Crespo MS, Fernández N. Pharmacological inhibition of eicosanoids and platelet-activating factor signaling impairs zymosan-induced release of IL-23 by dendritic cells. *Biochem. Pharmacol.* 2016; 102:78-96.
32. He WH, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, Chen JL, Tian H, Ling L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 2004; 429:188-193.
33. Gilissen J, Geubelle P, Dupuis N, Laschet C, Pirotte B, Hanson J. Forskolin-free cAMP assay for Gi-coupled receptors. *Biochem. Pharmacol.* 2015; 98:381-391.
34. McCreath KJ, Espada S, Gálvez BG, Benito M, de Molina A, Sepúlveda P, Cervera AM. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes* 2015; 64:1154-1167.
35. Moloughney JG, Kim PK, Vega-Cotto NM, Wu CC, Zhang S, Adlam M, Lynch T, Chou PC, Rabinowitz JD, Werlen G, Jacinto E. mTORC2 Responds to glutamine

catabolite levels to modulate the hexosamine biosynthesis enzyme GFAT1. *Mol. Cell* 2016; 63:811-826.

36. Araujo L, Khim P, Mkhikian H, Mortales CL, Demetriou M. Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation. *eLife* 2017;6:e21330. doi: 10.7554/eLife.21330.

37. Márquez S, Fernández JJ, Terán-Cabanillas E, Herrero C, Alonso S, Azogil A, Montero O, Cubillos-Ruiz J, Fernández N, Sánchez Crespo M. Endoplasmic reticulum stress sensors IRE1 α and PERK drive IL-23 overexpression by dendritic cells. *Sometido a publicación.*

38. Liu J, Ibi D, Taniguchi K, Lee J, Herrema H, Akosman B, Mucka P, Salazar Hernandez MA, Uyar MF, Park SW, Karin M, Ozcan U. Inflammation improves glucose homeostasis through IKK β -XBP1s interaction. *Cell* 2016; 167:1052-1066.

39. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26:3071-3084.

40. Herrema, H., Zhou, Y., Zhang, D., Lee, J., Salazar Hernandez, M.A., Shulman, G.I., et al. XBP1s is an anti-lipogenic protein. *J. Biol. Chem.* 2016; 291:17394-17404.

41. Sha H, He Y, Chen H, Wang C, Zenno A, Shi H, Yang X, Zhang X, Qi L. The IRE1 α -XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab.* 2009; 9:556-564.

42. Guo L, Li, X, Tang Q-Q. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β . *J. Biol. Chem.* 2015; 290:755-761.

43. Chen C, Dudenhausen EE, Pan YX, Zhong C, Kilberg MS. Human CCAAT/enhancer-binding protein β gene expression is activated by endoplasmic reticulum stress through an unfolded protein response element downstream of the protein coding sequence. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:27948-27956.

44. Hayakawa K, Nakajima S, Hiramatsu N, Okamura M, Huang T, Saito Y, Tagawa Y, Tamai M, Takahashi S, Yao J, Kitamura M. ER stress depresses NF- κ B activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP β . *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21:73-81.

45. Plevy SE, Gemberling JH, Hsu S, Dorner AJ, Smale ST. Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17:4572-4588.

46. Bradley MN, Zhou L, Smale ST. C/EBP β regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23:4841-4858.

47. Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, Tang Q, Greenblatt M, Hatzia Apostolou M, Lim E, Tam WL, Ni M, Chen Y, Mai J, Shen H, Hu DZ, Adoro S, Hu B, Song M, Tan C, Landis

MD, Ferrari M, Shin SJ, Brown M, Chang JC, Liu XS, Glimcher LH. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* 2014; 508:103-107.

48. Subramanian M, Thorp E, Tabas, I. Identification of a non-growth factor role for GM-CSF in advanced atherosclerosis: promotion of macrophage apoptosis and plaque necrosis through IL-23 signaling. *Circ. Res.* 2015; 116:e13-24.

49. Tufanli O, Telkoparan Akillilar P, Acosta-Alvear D, Kocaturk B, Onat UI, Hamid S.M., Hamid SM, Çimen I, Walter P, Weber C, Erbay E. Targeting IRE1 with small molecules counteracts progression of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017; 114:E1395-E1404.

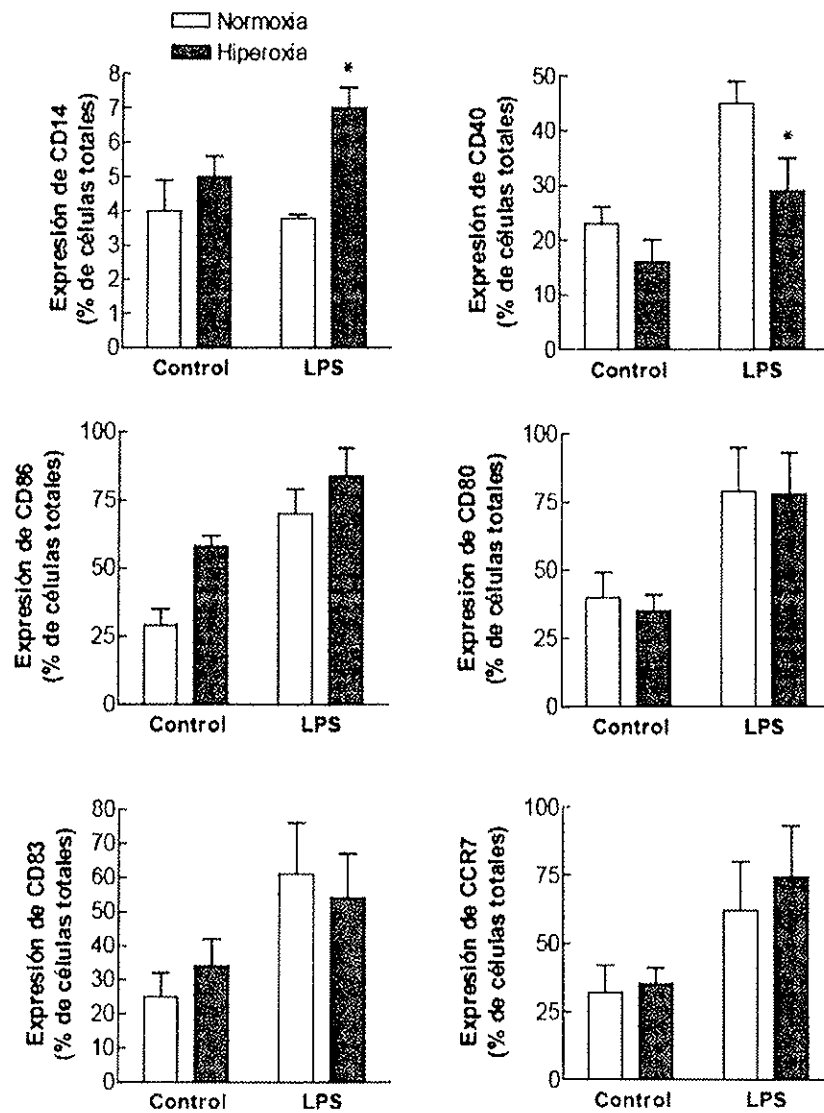


Figura 1: Efecto de la incubación durante 4 horas en condiciones de normoxia y en presencia de O_2 al 40% sobre la expresión de marcadores de diferenciación de las células dendríticas. Los resultados representan media \pm desviación standard de cinco experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$, *Wilcoxon rank sum test*.

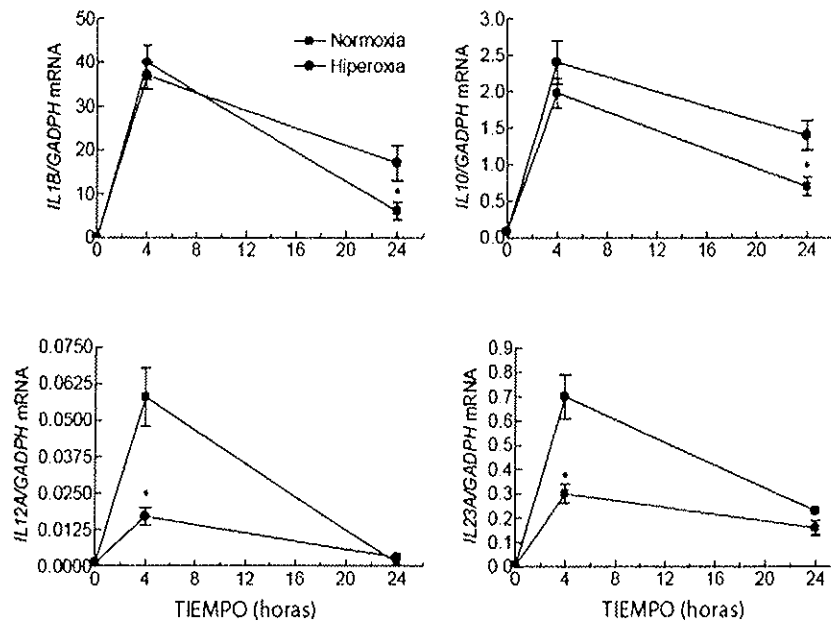


Figura 2: Efecto de la incubación en condiciones de normoxia y en presencia de O_2 al 40% sobre la expresión de citocinas por las células dendríticas. Los resultados representan media \pm desviación standard de cuatro experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$, *Wilcoxon rank sum test*.

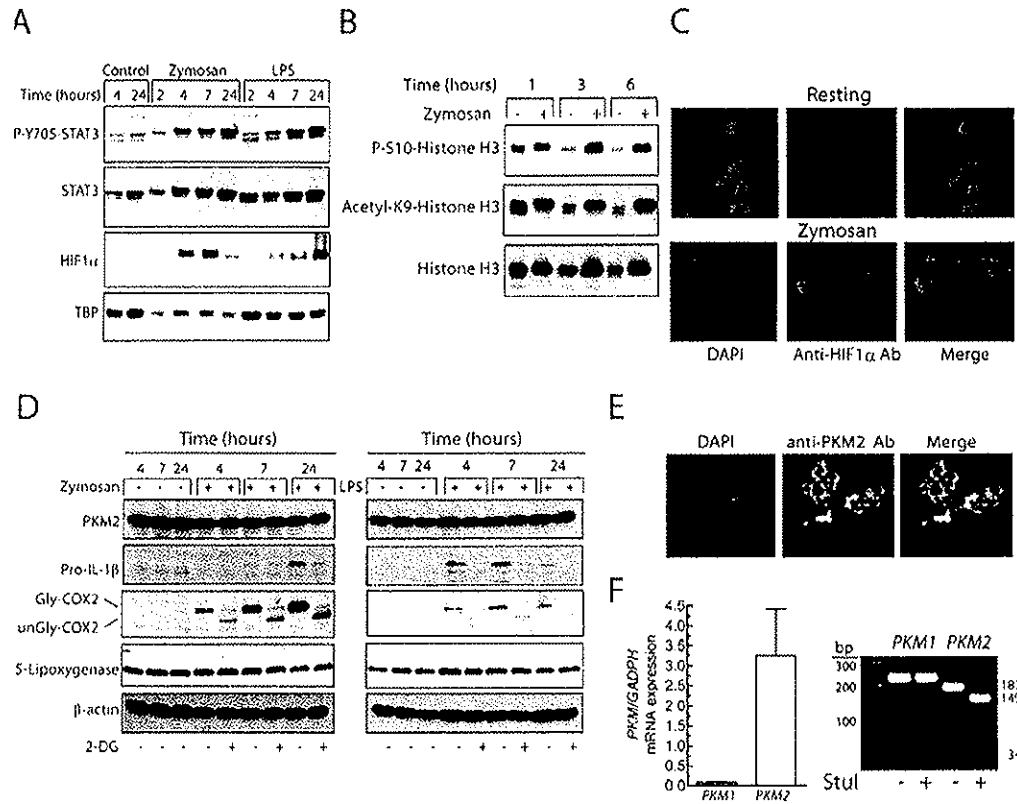


Figura 3: Efecto de la estimulación de las CD sobre la fosforilación de Y705-STAT3 y la expresión de la proteína HIF1 α . Las fracciones nucleares se utilizaron para el análisis de la fosforilación de STAT3, la expresión la proteína HIF1 α (A), la fosforilación de la S10-histona H3 y la acetilación de la K9-histona H3 (B). La translocación nuclear de HIF1 α se detectó mediante *laser-scanning* inmunofluorescencia confocal en presencia y ausencia de partículas de zymosan (C). La expresión de PKM2, Pro-IL-1 β , COX-2 y 5-lipoxygenasa se detectó mediante *Western blot* en CD estimuladas con zymosan y LPS a diferentes tiempos (D). La localización de la PKM2 en el citoplasma y el núcleo se estudió mediante *laser-scanning* inmunofluorescencia confocal en CD estimuladas con zymosan (E). La expresión predominante de PKM2 se confirmó en reacciones de RT-PCR en tiempo real y digestión selectiva por StuI del amplicon de PKM2 (F).

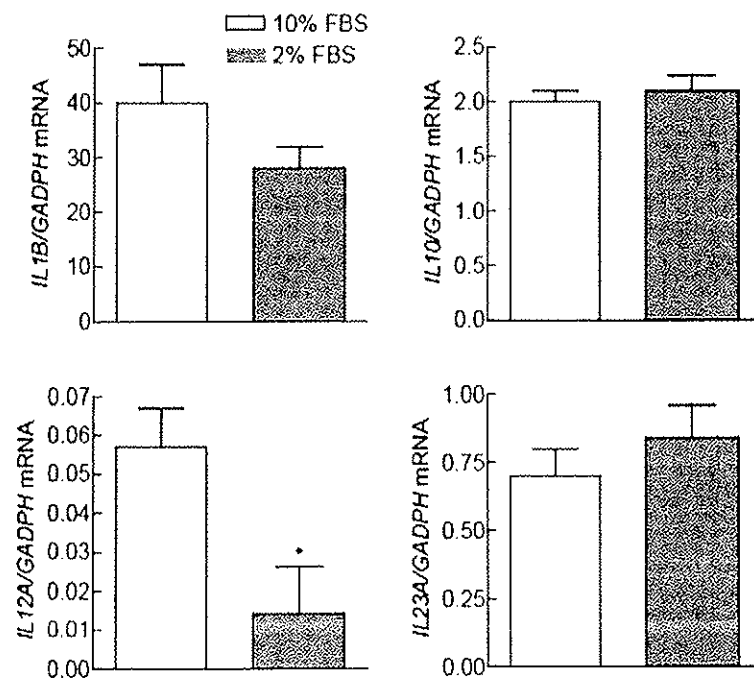


Figura 4: Efecto de la concentración de suero bovino fetal (FBS) sobre la inducción del mRNA de las citocinas. Los resultados representan media \pm desviación standard de cuatro experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$, *Wilcoxon rank sum test*.

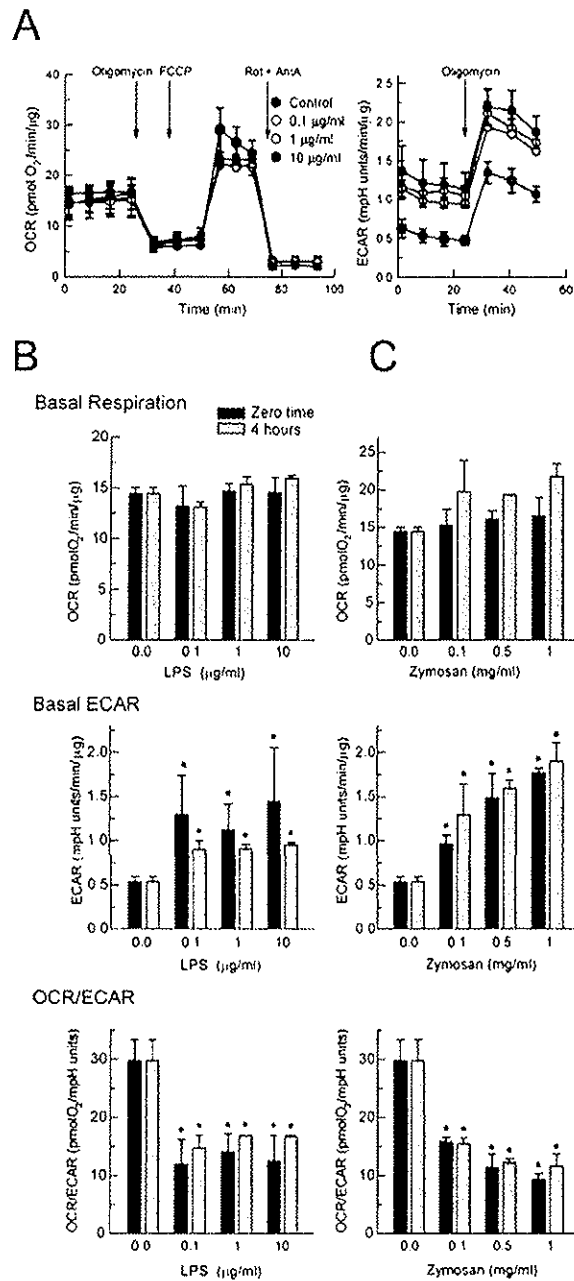


Figura 5: Efecto de LPS y zymosan sobre la bioenergética de las CD. Las CD se estimularon durante los tiempos indicados en medio XF Seahorse en presencia de las adiciones indicadas: LPS (A y B) o zymosan (C) y se adhirieron a las placas revestidas de poli-ornitina para el análisis de la OCR y la ECAR. Los registros temporales del XF Mito Stress Test se obtuvieron en presencia de diferentes concentraciones de LPS y se muestran en (A). Los resultados representan media \pm desviación standard de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ en comparación con las CD mantenidas en ausencia de estímulos.

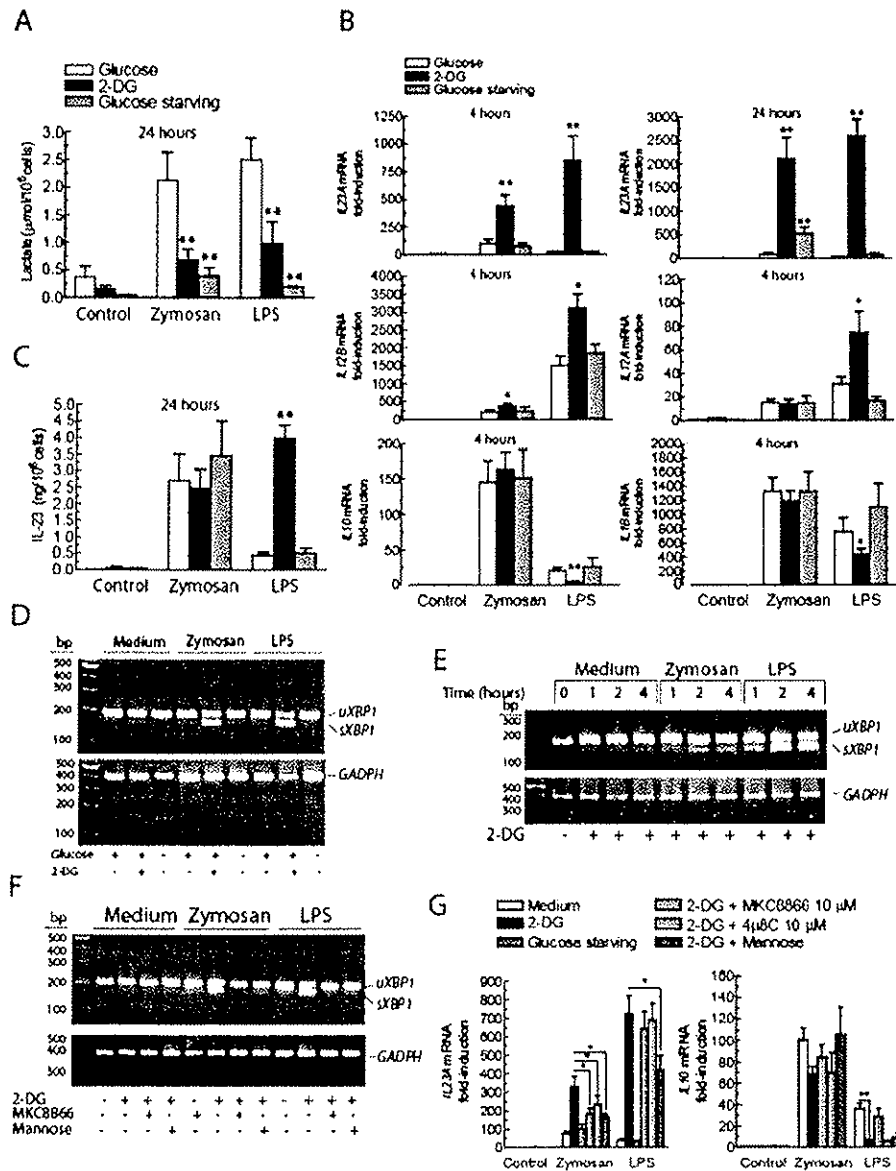


Figura 6: Efecto de la 2-DG sobre la producción de lactato, la fagocitosis y la expresión de citocinas. La producción de lactato por las CD en presencia y ausencia de glucosa 11.1 mM y con la adición 10 mM 2-DG se muestra en (A). El efecto de la 2-DG sobre la inducción de la expresión de varias citocinas se muestra en (B) y sobre la producción de la proteína IL-23 se muestra en (C). El efecto de distintos tratamientos sobre la rama IRE1 α /XBP1 de la respuesta de proteínas mal plegadas se muestra en (D-F). El efecto de los inhibidores de la actividad endorribonucleasa de IRE1 α sobre la inducción de *IL23A* se muestra en (G). *uXBP1* indica la forma sin *splicing*. *sXBP1* indica la forma con *splicing* producida por la eliminación de 26 pares de bases, lo que permite mayor movilidad electroforética.

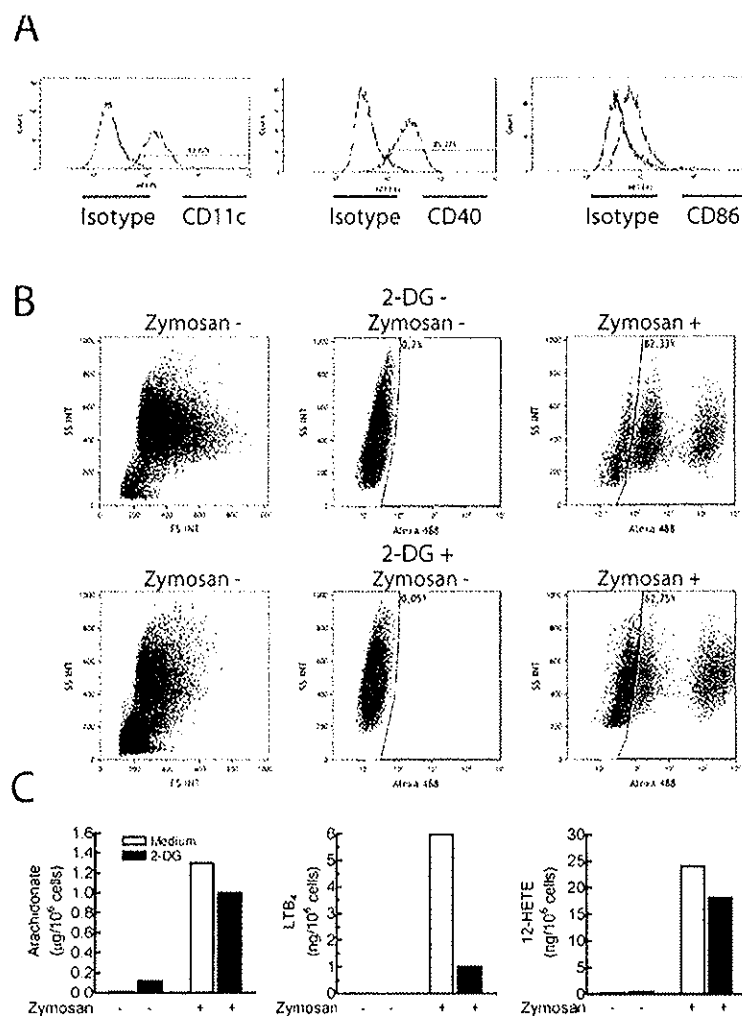


Figura 7: Expresión de marcadores de diferenciación por las CD y efecto de la 2-DG sobre la fagocitosis de zymosan y liberación de ácido araquidónico. Expresión de CD11c, CD40 y CD86 en las CD derivadas de monocitos (A). La fagocitosis de zymosan se midió por citometría de flujo utilizando partículas marcadas con Alexa Fluor® 488 a la concentración de una partícula por CD. Los *dot plots* representan *forward* (FS) y *side scatters* (SS), y fluorescencia verde de Alexa Fluor® 488 en ausencia y presencia de las partículas marcadas en las CD incubadas en presencia y ausencia of 10 mM 2-DG durante una hora y tras 10 min en presencia de zymosan (B). Liberación de ácido araquidónico en CD estimuladas con partículas de zymosan a la concentración de 1 mg/ml zymosan durante 1 hora en presencia y ausencia de 2-DG. La detección se realizó en los extractos de los sobrenadantes y muestra los eicosanoides más abundantes. La PGE₂ no se detectó en estas condiciones. LTB₄ indica leucotrieno B₄.

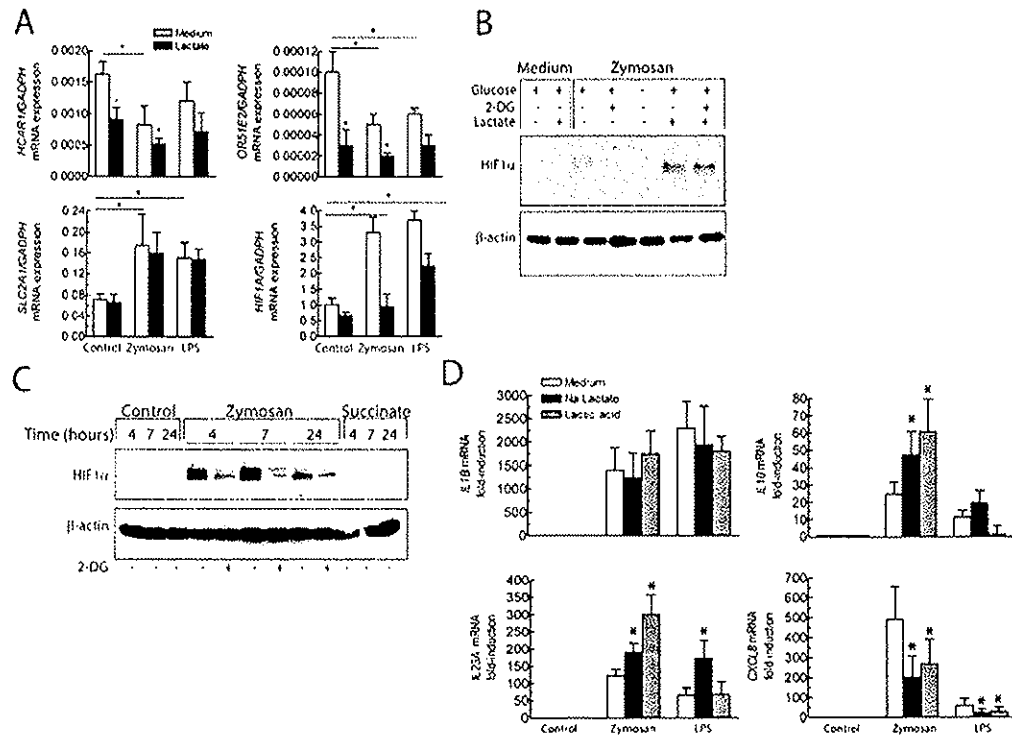


Figura 8: Expresión de los receptores de lactato, *SLC2A/GLUT1* y *HIF1α* en CD. La expresión del mRNA de *HCAR1*, *OR51E2*, *SLC2A* y *HIF1A* en células en reposo y estimuladas en presencia y ausencia de lactato se muestra en (A). La expresión de la proteína *HIF1α* en CD estimuladas durante diferentes tiempos con 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 1 mg/ml zymosan y 0.5 mM succinato sódico en presencia y ausencia de 2-DG se muestra en (B y C). El efecto del lactato sódico y del ácido láctico en la expresión del mRNA de varias citocinas se muestra en (D). Los resultados muestran media \pm desviación standard de 3 experimentos en (A) y (D). * $p < 0.05$.

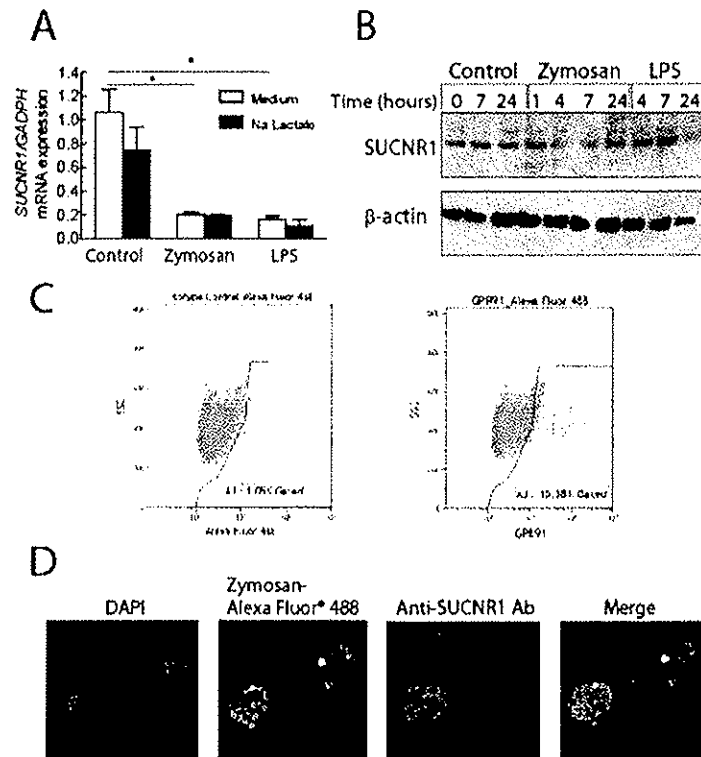


Figura 9: Expresión de *SUCNR1*/GPR91 en CD. La expresión del mRNA de *SUCNR1* se muestra en (A). La expresión de la proteína GPR91 en CD tratadas durante diferentes tiempos con zymosan y LPS se muestra en (B). La expresión de SUCNR1 en la superficie de CD en reposo se analizó por citometría de flujo mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpo control del mismo isotipo y anticuerpo anti-SUCNR1 (C). Las CD se adhirieron a cubreobjetos revestidos de polilisina durante 12 horas y posteriormente se estimularon durante una hora con partículas de zymosan marcadas con Alexa Fluor® 488 (verde) a la concentración de 6 partículas por CD. Al final de este tiempo, se añadieron anticuerpos anti-SUCNR1 y anticuerpo secundario marcado con rodamina (rojo). Las microfotografías se obtuvieron mediante microscopía de inmunofluorescencia confocal (D). Los datos en (A) representan media \pm desviación standard de 6 experimentos.

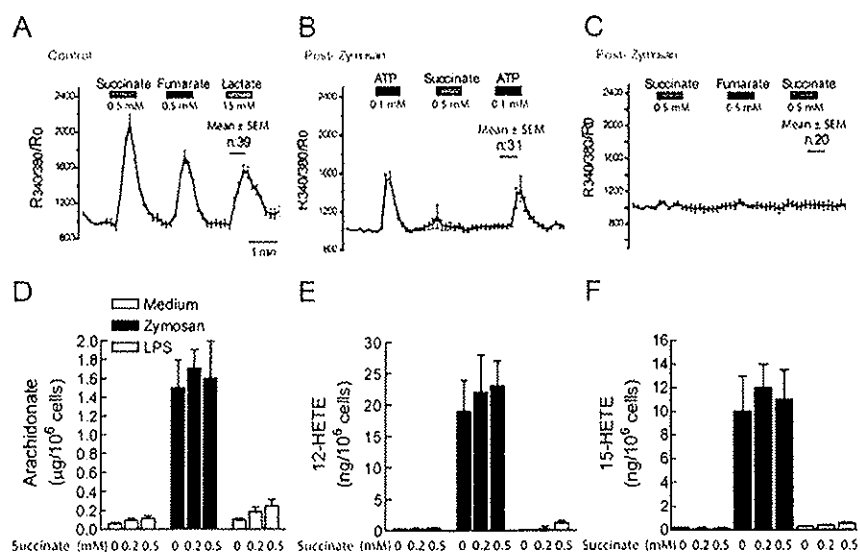


Figura 10: Efecto del succinato sobre la movilización de Ca^{2+} y la liberación de araquidonato. Las CD adheridas a placas de poli-ornitina se perfundieron con medio que contenía los distintos estímulos en condiciones de reposo y tras estimulación con 1 mg/ml de partículas de zymosan. Los números sobre los registros indican el número de CD calculadas *pixel por pixel* utilizando el software ImageJ para cuantificar el Ca^{2+} intracelular (A-C). La liberación de ácido araquidónico, 12-HETE y 15-HETE inducida por el zymosan y el LPS en presencia y ausencia de succinato en 3 experimentos independientes se muestra en (D-F).

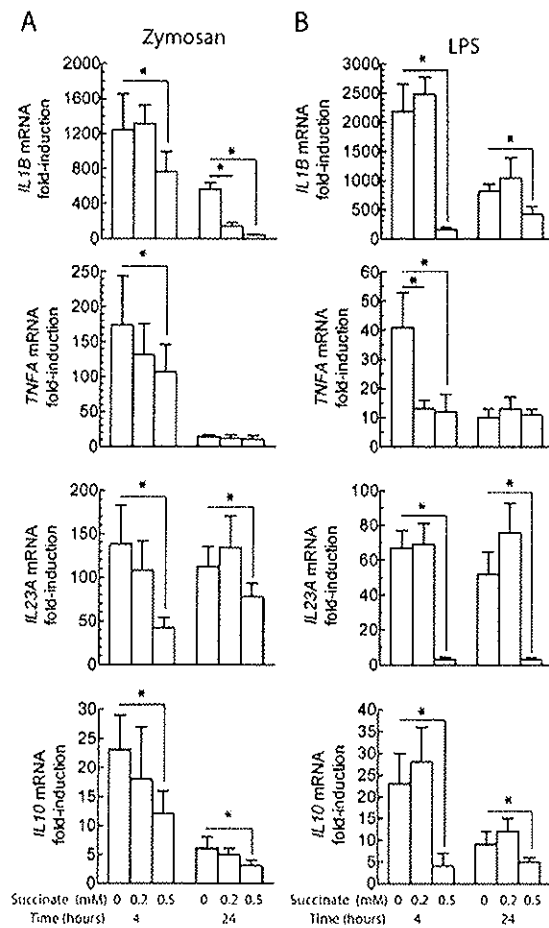


Figura 11: Efecto del succinato sódico sobre la expresión del mRNA de varias citocinas en CD estimuladas con zymosan (A) y LPS (B) durante 4 y 24 horas como se indica. Los resultados muestran media \pm desviación standard de 5 a 8 experimentos. * $p < 0.05$.

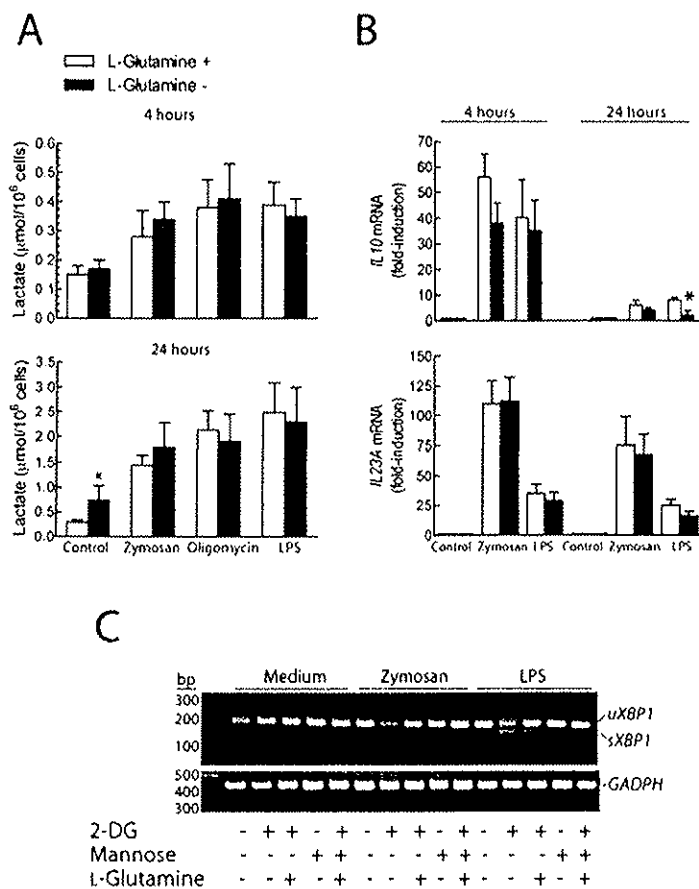


Figura 12: Efecto de la depleción de L-glutamina sobre la producción de citocinas. Las CD se mantuvieron durante los tiempos indicados en presencia y ausencia de L-glutamina 4 mM. Al final de estos periodos, los sobrenadantes se recogieron para la medida de lactato (A) y la expresión del mRNA de *IL10* e *IL23A* (B). La ausencia de inducción de la respuesta de mal plegamiento de proteínas definida por el *splicing* de *XBP1* se muestra en (C). Los resultados muestran media \pm desviación standard de 3 experimentos. * $p < 0.05$.

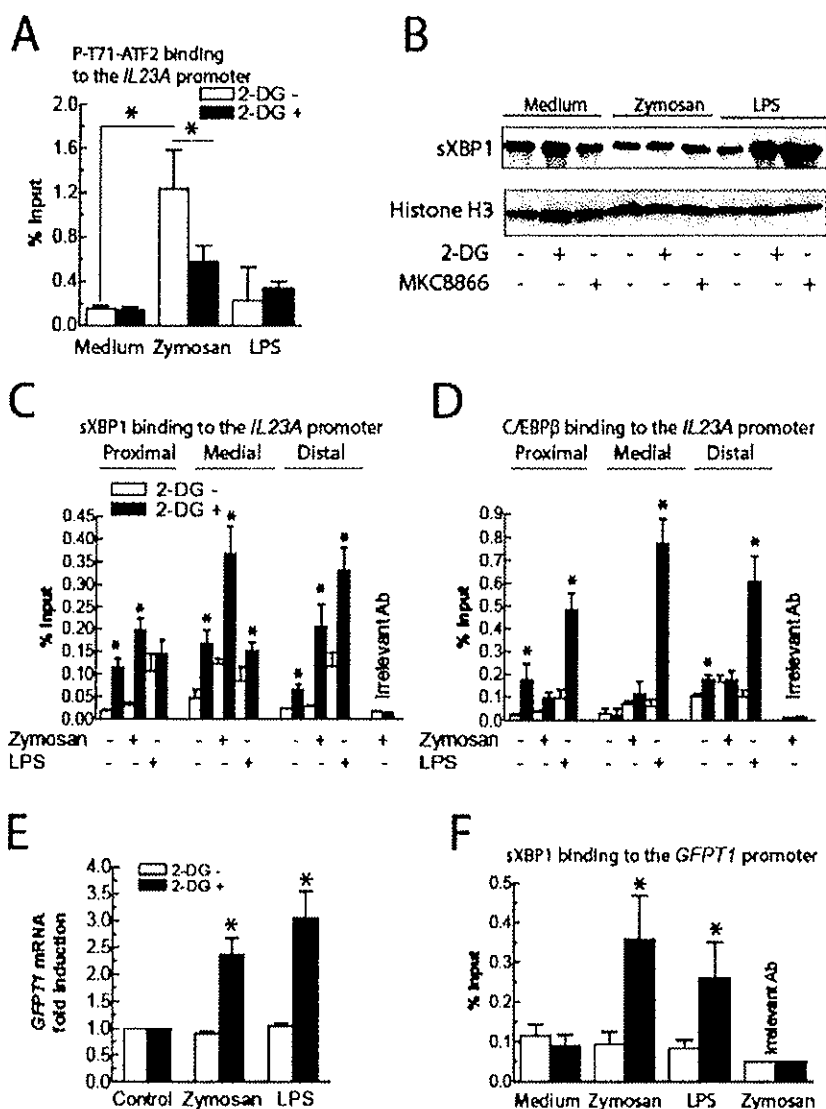


Figura 13. Factores de transcripción implicados en la expresión del mRNA de los genes *IL23A* y *GFPT1*. (A) Efecto de la 2-DG en la unión de P-T71-ATF2 a la secuencia consenso de ATF2 en el promotor de *IL23A*. (B) Expresión de la proteína XBP1 *spliced* (sXBP1) en las fracciones nucleares de las CD estimuladas con zymosan y LPS en presencia y ausencia de 2-DG y el inhibidor de la actividad endorribonucleasa de IRE1 α MKC8866. (C) Efecto de la 2-DG sobre la unión de sXBP1 a las X-Boxes del promotor de *IL23A* tras una hora de estimulación con zymosan y LPS. (D) Unión de C/EBP β a los sitios C/EBP del promotor de *IL23A*. (E) Efecto de la 2-DG sobre la expresión del mRNA de *GFPT1* en CD estimuladas durante 4 horas con zymosan y LPS. (F) Unión de sXBP1 al X-Box del promotor de *GFPT1* después de una hora de haberse añadido el estímulo. Los resultados muestran media \pm desviación standard de 3 a 5 experimentos. * $p < 0.05$.

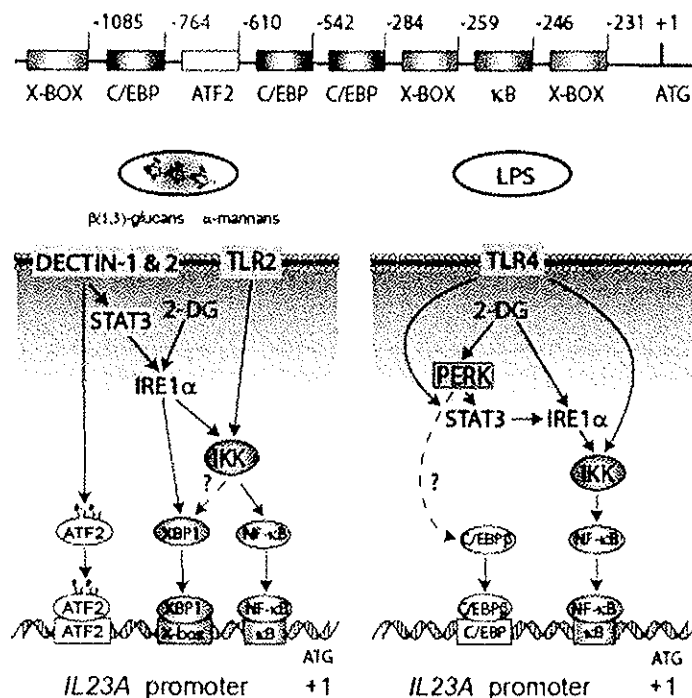


Figura 14. Diagrama explicativo de las rutas implicadas en la regulación transcripcional de la cadena p19 de IL-23 en condiciones de activación de la respuesta de proteínas mal plegadas. La estructura del promotor proximal de *IL23A* se muestra en la parte superior de la figura, destacándose los elementos reguladores donde se unen ATF2, XBP1, NF- κ B y C/EBP β . La formación de enhanceosomas que incluyen NF- κ B, XBP1 y C/EBP β parece muy probable y la combinación de los elementos implicados parece depender de la naturaleza del estímulo. La ruta de IRE1 α participa en todos los casos e influye al menos sobre la activación de NF- κ B y la actividad de XBP1 en el caso del zymosan. STAT3 se active por patrones fúngicos a través de mediadores secundarios no plenamente identificados, mientras que en el caso de LPS la activación depende de IFN β e IRF3, activados por los adaptadores TRIF/TRAM del sistema LPS/TLR4. C/EBP β y la ruta PERK son más relevantes en el caso del LPS. Las líneas discontinuas indican rutas no estudiadas en los experimentos actuales, pero cuya participación se justifica por otros estudios (14,37-49).

Tabla 1.
Primers para Q-PCR

<i>IL1B</i> SENSE	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'
<i>IL1B</i> REV	5'-GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA-3'
<i>IL10</i> SENSE	5'-GAGAACAGCTGCACC CAC TT-3'
<i>IL10</i> ANTISENSE	5'-GGCCTTGCTCTTGTT TTCAC-3'
<i>IL12A</i> SENSE	5'-GAGGCCTGTTTACCAATTGGA-3'
<i>IL12A</i> ANTISENSE	5'-TCAAGGGAGGATTTTTGTGG-3'
<i>IL12B</i> SENSE	5'-CATGGGCCTTCATGCTATTT-3'
<i>IL12B</i> ANTISENSE	5'-TTT GCATTG TCAGGTTTCCA-3'
<i>IL23A</i> SENSE	5'-CATGGGCCTTCATGCTATTT-3'
<i>IL23A</i> ANTISENSE	5'-TTT GCATTG TCAGGTTTCCA-3'
<i>TNFA</i> SENSE	5'-GTTGTAGCAAACCCCTCAAGC-3'
<i>TNFA</i> ANTISENSE	5'-TTGAAGAGGACCTGGGAGTA-3'
<i>IRF1</i> SENSE	5'-TAAGACAGCGCTTGGGGATGGA-3'
<i>IRF1</i> ANTISENSE	5'-ATACCGCCAGAATCCATGGGGA-3'
<i>GFPT1</i> SENSE	5'-AATGCTGGTCCTGAGATTGG-3'
<i>GFPT1</i> ANTISENSE	5'-TTGATTTTCAGTGCCCTTC-3'
<i>GAPDH</i> SENSE	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'
<i>GAPDH</i> ANTISENSE	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'

Primers para inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

<i>IL12A</i> Control SENSE	5'-GCGAACATTTTCGCTTTCATT-3'
<i>IL12A</i> Control REV	5'-ACTTTCCCGGACTCTGGT-3'
<i>IL23A</i> X2-Box-C/EBP SENSE	5'-CTCTAGCCACAGCAACCACA-3'
<i>IL23A</i> X2-Box-C/EBP REV	5'-GCCCGCCCTTTATACCAGCA-3'
<i>IL23A</i> X2-Box medial SENSE	5'-CTTAGCTGTTTCACTCGATGTT -3'
<i>IL23A</i> X2-Box medial REV	5'- CAGGAGTTCTGGGTAGTCG-3'
<i>IL23A</i> X2-Box distal SENSE	5'-TTCCATTGGTGTCCACCTTA -3'
<i>IL23A</i> X2-Box distal REV	5'- CTTTAGATTA AACATTTCCAGCA-3'
<i>IL23A</i> C/EBP β SENSE	5'-TTCCAGTTCCTCAAGTTC-3'
<i>IL23A</i> C/EBP β REV	5'-TTGATTCCTACCTGATGCC-3'
<i>IL23A</i> ATF2 SENSE	5'-CATTGCAAACAGCTCACCAT-3'
<i>IL23A</i> ATF2 REV	5'-ATTTCCCTCACTTCTCCTGC-3'
<i>GFPT1</i> X2-Box FWD	5'- GAGTTTCTCCCTCCCTCTC-3'
<i>GFPT1</i> X2-Box ANTISENSE	5'- GCTCCATTGAACCGCTCAC -3'