



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



Josep Carreras
LEUKAEMIA
Research Institute

**INMUNOMODULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS
DE MONOCITOS CD14+ *IN VITRO* CON EL MEDICAMENTO
ANTIVIRAL GANCICLOVIR**

Daniel Romero Calvo

**TRABAJO FINAL DE GRADO
DEL GRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

Tutor académico: Dr. Juan Bautista Fernández Larrea
Departamento de Bioquímica y Biotecnología
Universitat Rovira i Virgili, Tarragona

Supervisor científico: Dr. Esteban Ballestar Tarín
Grupo de Investigación Epigenética y enfermedades inmunitarias
Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras

Tarragona, Septiembre 2023

Yo, Daniel Romero Calvo, con DNI 48272127A, soy conocedor de la guía de prevención del plagio de la URV *Prevenió, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada en julio del 2017)

(<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 30 de agosto del 2023

(firma)

Agradecimientos:

1. El trabajo experimental presentado en este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras. Situado en el Josep Carreras Building, Carretera de Can Ruti, camí de les escoles, s/n, 08916 Badalona, Barcelona. Centro financiado principalmente por la Fundación Carreras y la Generalitat de Catalunya.
2. A su vez, el trabajo experimental fue realizado durante las prácticas externas del Grado de Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili. Estas fueron dirigidas por el Dr Esteban Ballestar Tarín, en el grupo de investigación Epigenética y enfermedades inmunitarias del IJC.

Índice

- Índice de figuras.....Página (5)
- Resumen del trabajo.....Página (6)
- Conceptos clave y abreviaciones.....Página (7)
- Introducción.....Páginas (8-14)
- Hipótesis y objetivos del trabajo.....Página (14)
- Metodología.....Páginas (15-23)
- Resultados experimentales y discusión.....Páginas (24-44)
- Conclusiones.....Páginas (45-46)
- Autoevaluación.....Páginas (46-47)
- Bibliografía y webgrafía.....Páginas (47-50)
- Anexos.....Página (50)

- **Índice de figuras**

- Figura 1: Desarrollo de los diferentes tipos de DCs según su entorno.....Página (9)
- Figura 2: Mecanismo de acción canónico del GCV.....Página (10)
- Figura 3: Esquema de la ruta cGAS-STING.....Página (12)
- Figura 4: Comparación de las estructuras químicas de GCV y cGAMP...Página (13)
- Figura 5: Fases antes y después de la centrifugación de la sangre.....Página (16)
- Figura 6: Esquema de los componentes esenciales del citómetro.....Página (20)
- Figura 7: Modelo de la Máquina Maxwell utilizada.....Página (21)
- Figura 8: Modelo de la Máquina Nanodrop utilizada.....Página (23)
- Figura 9: Selección de células individuales.Página (27)
- Figura 10: Población de células vivas seleccionada.....Página (28)
- Figura 11: Boxplots del FACS de muestras tratadas con GCV.....Página (30)
- Figura 12: Selección de células vivas por *Live and Dead Violin*.....Página (32)
- Figura 13: Boxplots del FACS de muestras con LPS y GCV.....Página (33)
- Figura 14: Boxplots del FACS de muestras con GCV y con y sin LPS....Página (37)
- Figura 15: Boxplots con las muestras separadas en con y sin LPS.....Página (38)
- Figura 16: Boxplots de los cambios en la expresión génica.....Página (42)
- Figura 17: Heatmap del cambio en la expresión de los genes por LPS...Página (44)

- Resumen del trabajo

Las células dendríticas (DCs) son las células del sistema inmune innato con la mayor influencia sobre la inflamación y sobre el sistema inmune adaptativo, siendo capaces de inducir tanto respuestas inmunes como de tolerancia en el organismo, en función de las señales bioquímicas que reciben del entorno. En estudios realizados *in vitro* con macrófagos de ratón, se observó cómo el antiviral Ganciclovir (GCV) presenta propiedades de agonista parcial de la ruta cGAS-STING. Una vía de señalización y activación de la respuesta inmune innata. En base a lo observado en estos estudios, este trabajo busca evaluar el grado en el que estas propiedades del GCV son observables también en DCs humanas, evaluando su influencia sobre la vía cGAS-STING de estas. Comprobando si su presencia es capaz de alterar la respuesta inflamatoria y la capacidad para activar linfocitos de las DCs. Para ello, se han aislado monocitos CD14+ de muestras de sangre periférica humana y se han diferenciado en DCs *in vitro* para estudiar cómo cambia su activación al añadir GCV al medio. Mediante la realización de análisis por citometría de flujo con fluoróforos (FACS); para detectar cambios en la abundancia de marcadores de superficie asociados a la presentación de antígenos. Y empleando la cuantificación por reacciones en cadena de la polimerasa de RNAm retrotranscrito (RT-qPCR); para observar cambios en la expresión de genes asociados a la inflamación. Gracias a estas técnicas se ha podido observar que, si el GCV está en presencia de lipopolisacárido (LPS) bacteriano, que es capaz de activar cGAS-STING, se potencian los efectos de la ruta. Aumentando la expresión de los genes TNF α y IL-10, lo que sugiere un aumento en la intensidad de la inflamación. E incrementando la abundancia de los marcadores de superficie CD80 y CD86, indicando una mayor capacidad para activar linfocitos. Estos hallazgos confirman la premisa de que GCV presenta capacidades inmunomoduladoras sobre las DCs humanas, sugiriendo un posible uso alternativo del medicamento como un inmunoestimulador.

- Conceptos clave y abreviaciones

Terminología base:

- Agonista parcial: Molécula capaz de unirse a un receptor y activarlo. Pero que genera un efecto inferior al provocado por la unión de agonistas completos.
- Inflamación: Mecanismo de defensa activado cuando un antígeno es detectado por el sistema inmune. Induciendo una serie de cambios estructurales y funcionales en las células que lo componen (activación celular), y cambios en el ambiente de la región afectada, que propicien la eliminación del antígeno y la reparación del tejido.
- Prodroga: Medicamento inactivo que ha de ser modificado químicamente por el organismo al que se le administra (metabolizado) para que se vuelva activo.
- Marcador de superficie: Proteínas que al estar localizadas en la capa externa de la membrana celular, pueden ser reconocidas por anticuerpos presentes en el medio.

Abreviaciones:

- STING: Estimulador de los genes Interferón,
- RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa de transcripción inversa (RT)
- DCs: Células dendríticas.
- GCV: Ganciclovir.
- FSC y SSC: Dispersión Frontal (*forward scattering* en inglés) y Dispersión Lateral (*side scattering* en inglés) de un haz de luz al incidir en un objeto, respectivamente.
- cGAMP: Guanosina monofosfato (GMP) - Adenosina monofosfato (AMP) cíclica.
- TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

- Introducción

De entre las diferentes poblaciones celulares que forman parte del sistema inmune de los seres humanos, las células dendríticas, o DCs, son aquellas con el rol más prominente en la presentación de antígenos. El proceso encargado de dar comienzo a la respuesta inmune adaptativa. Ya que aunque estas no sean las únicas poblaciones con capacidad para actuar como células presentadoras de antígenos, función que comparten con los macrófagos y con los linfocitos B, son las que presentan el mayor grado de especialización y eficiencia en dicha labor. Y, al formar parte del sistema inmune innato, juegan un papel vital en la sincronización de ambas respuestas. Siendo capaces de inducir tanto una respuesta inflamatoria como de tolerancia, o ausencia de respuesta inmune, para un antígeno determinado.(1)

Son capaces de provocar efectos tan opuestos gracias a lo heterogéneos que pueden llegar a ser sus patrones de expresión génica. Fenómeno que también es responsable de la diferenciación celular, mediante mecanismos como la metilación del ADN, la expresión de determinados factores de transcripción o las diferentes modificaciones de las histonas, por nombrar algunos. Para el caso de las DCs, se ha observado que estos mecanismos pueden ser regulados mediante señales transferidas por citoquinas y otras moléculas extracelulares presentes en el ambiente (2). Esta dependencia del entorno permite generar los diferentes tipos de DCs, con características y roles distintivos, en función de en qué parte del organismo se han diferenciado y madurado (3)(Figura 1).

De entre todas estas, las células dendríticas derivadas de monocitos son las más usadas en investigación. Ya que durante la inflamación, los monocitos que se diferencian en estas son reclutados desde la médula ósea hasta la región afectada. Pudiendo ser extraídos en grandes cantidades del torrente sanguíneo y posteriormente diferenciadas *in vitro* (4). Lo que permite estudiar los procesos de diferenciación y, en este caso, usarlas como modelo de células dendríticas humanas. Ya que son las que presentan el mayor grado de diversidad epigenética otorgada por el ambiente.

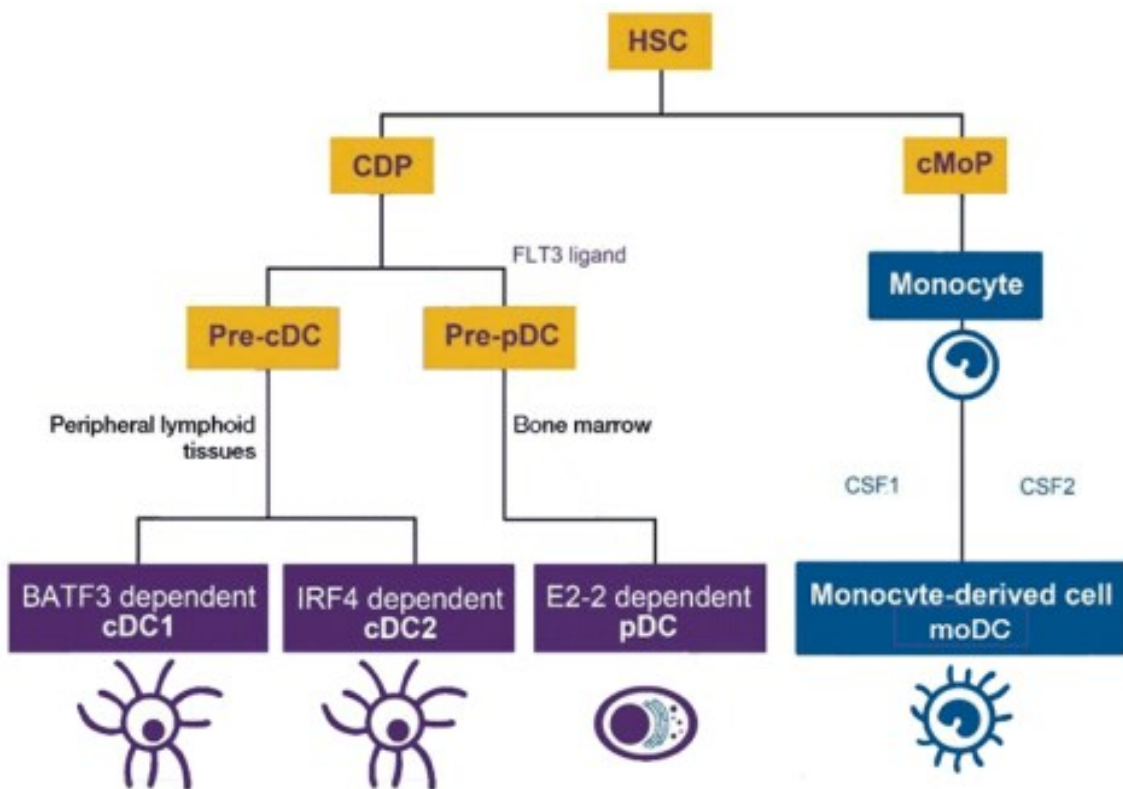


Figura 1: Desarrollo de los diferentes tipos de DCs según su entorno. Todas ellas parten de las células madres hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea. La mayoría se diferencian en células dendríticas progenitoras (CDPs), pasando a ser DCs convencionales (cDCs) si se diferencian en los tejidos linfoides, o DCs plasmáticas (pDCs) si se diferencian en la médula ósea. Las convencionales se dividen además en función de la citoquina que induce su maduración. Alternativamente, se pueden generar DCs a partir de monocitos para suplementar las funciones de las DCs convencionales. Imagen obtenida de la referencia (3).

El Ganciclovir (abreviado GCV), es una prodroga ampliamente utilizada como tratamiento antiviral contra infecciones del género citomegalovirus (CMV) en pacientes inmunodeficientes. Como serían las personas infectadas con VIH o que hayan recibido un trasplante. Químicamente, es un análogo de Aciclovir, el primer medicamento antiviral aprobado en personas (5).

Ganciclovir, ha de ser trifosforilado, normalmente por la timidina kinasa del virus presente en el citoplasma de las células infectadas, para poder actuar como inhibidor competitivo de las desoxiguanosina trifosfato, el precursor del nucleótido guanina (6)(Figura 2). Inhibiendo la síntesis de ADN de doble cadena vírica, el tipo de genoma que presenta citomegalovirus, al competir por su unión a la cadena de novo.

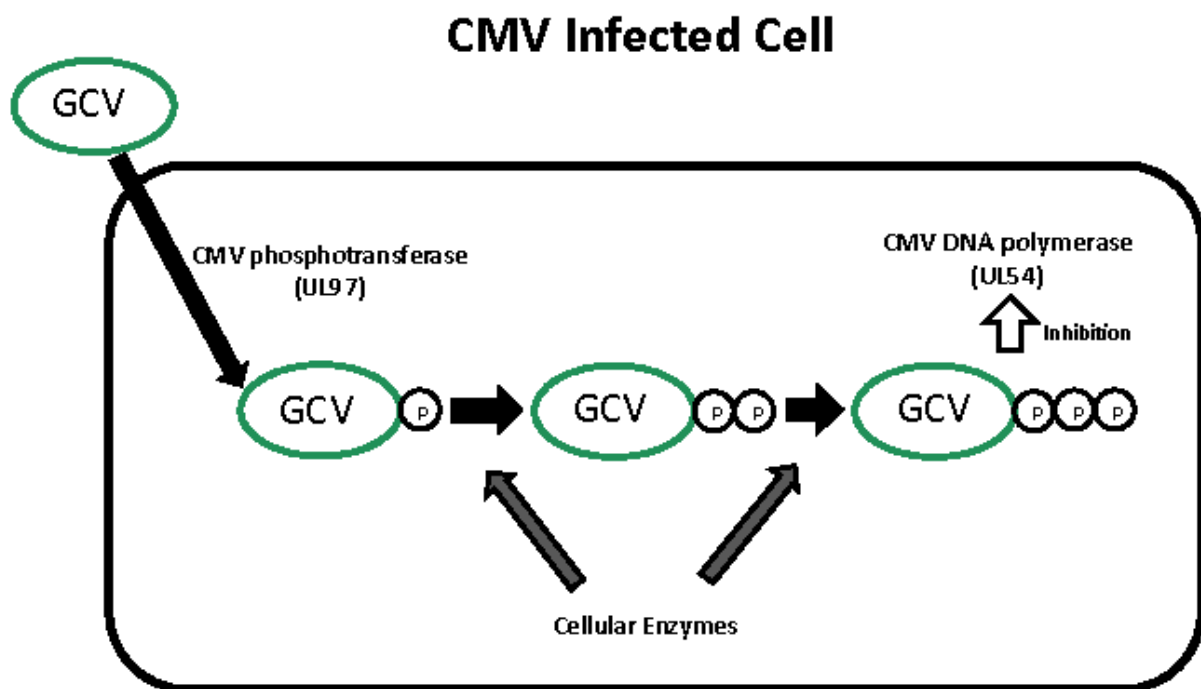


Figura 2: Mecanismo de acción canónico del GCV. Cómo actúa células infectadas por Citomegalovirus (CMV) para inhibir la DNA polimerasa vírica. Requiriendo de la timidina kinasa (enzima fosfotransferasa) vírica y otras enzimas nativas. Imagen correspondiente a la Figura 1 de la referencia (6).

No obstante, también se ha observado que dosis suficientemente elevadas de GCV son capaces de afectar también al genoma celular, especialmente a aquellas células con una alta tasa de replicación. Como son las poblaciones mieloides de la médula ósea, provocando mielotoxicidad (7).

Este inconveniente requiere de un ajuste de dosis periódica durante el tratamiento, ya que no se quiere que sea tan baja como para que no haga efecto, pero tampoco tan alta como para que dañe la médula ósea.

A pesar de que este sea su mecanismo de acción canónico, actualmente se estudian posibles interacciones alternativas que puedan derivar en nuevos usos. Específicamente, es llamativo su potencial uso como modulador de la respuesta inmune, debido a su peculiar influencia con la ruta cGAS-STING.

cGAS, o GMP-AMP cíclico sintasa, es una enzima capaz de detectar la presencia de ADN en el citosol. Sea este de origen bacteriano, vírico, mitocondrial o incluso nuclear, lo que suele ser señal de infección intracelular o tumorigénesis. En respuesta, cGAS cataliza la formación de cGAMP, o GMP-AMP cíclico.

cGAMP, por su parte, actúa como el activador de STING, el estimulador de genes interferón. La proteína transmembranal STING se encuentra en el retículo endoplasmático, y actúa como adaptador de señal entre ambos lados de la membrana. Mediante el reclutamiento y activación de la enzima TBK1, que fosforila y activa el factor de transcripción IRF3. Que promueve la síntesis de interferón tipo 1 (INF 1) y otras citoquinas (Figura 3). desencadenando una respuesta inmune inflamatoria (8).

Cabe aclarar, no obstante, que el ADN no es la única molécula capaz de activar esta ruta. Ya que también se ha observado que otras moléculas como LPS bacteriano o los dinucleótidos cíclicos también son capaces. Este último además lo hace independientemente de cGAS (9).

La familia de citoquinas INF 1 es responsable de regular varios procesos de la respuesta inmune innata de la inflamación. Tanto a nivel general, actuando como señales pirogénicas y analgésicas, a la vez que inhibiendo la síntesis de varios factores de crecimiento. Como a nivel de población, estimulando las respuestas antitumorales y antivirales de macrófagos y *natural killers*, a la vez que dirigen su quimiotaxis a las zonas afectadas (10).

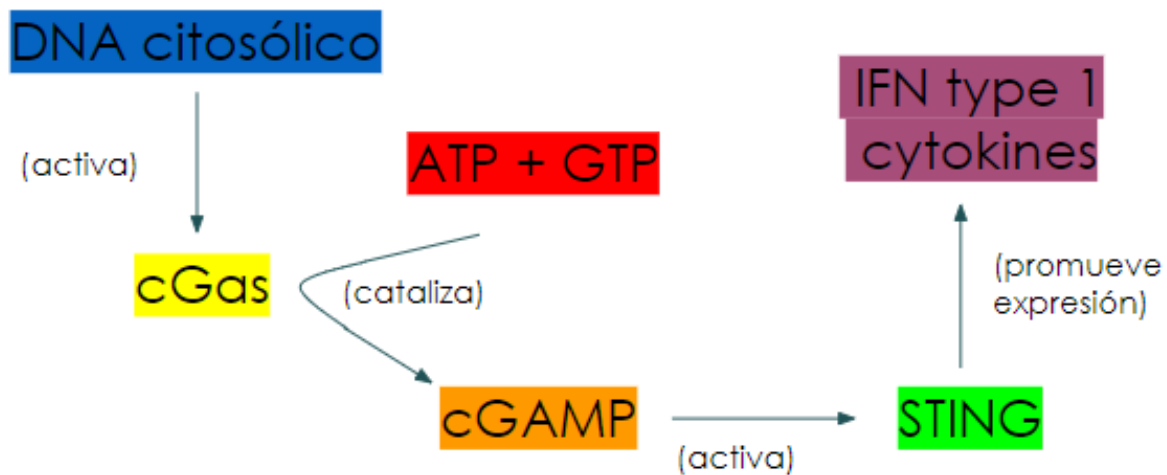


Figura 3: Esquema de la ruta cGAS-STING. Soporte visual de los componentes y etapas de la activación de la ruta. De creación propia, basada en la información disponible en la referencia 8 de este trabajo.

Aunque INF 1 es secretado por varias poblaciones celulares, las DCs son con diferencia las principales secretoras. Lo que las convierte en la principal población reguladora de INF 1, y sus efectos descritos. Además, INF 1 también actúa como estimulador autocrino de DCs. Incrementando la presentación de antígenos, así como la presencia de coestimuladores de linfocitos, como CD80 o CD86. Dando lugar a una activación de células T CD8+ más potente y robusta (11).

A pesar de su necesidad para generar una respuesta inmune eficaz, su desregulación y secreción excesiva pueden degenerar en enfermedades autoinmunes y reacciones inflamatorias excesivas, como el Lupus (12) o la Sepsis (13).

En un estudio reciente, la referencia (5) de la bibliografía, se comprobó como GCV es capaz de interferir con esta ruta. Usando un cultivo de macrófagos de ratón, se constató su capacidad de competir con cGAMP para unirse a STING. Observándose un comportamiento de agonista parcial, debido a que la señal de activación que este provoca es inferior que la de cGAMP.

Por lo que, respecto a los niveles de cGAMP, si la concentración de GCV es lo suficientemente baja, competirá con este y la señal resultante no será suficiente para desencadenar una respuesta inflamatoria, actuando como antagonista. Por el contrario, si su concentración es significativamente superior, la señal resultante total será mayor, desencadenando una respuesta pro inflamatoria, actuando como agonista (14).

La capacidad de poder funcionar como sustituto de cGAMP para activar STING, pero dando una señal menor, se cree que puede originarse en la remarcable similitud entre las estructuras químicas de ambos compuestos (15)(16)(Figura 4).

Este descubrimiento plantea la posibilidad de darle al GCV un uso alternativo para ayudar a regular la respuesta inmune: Aumentando su intensidad con dosis altas para ayudar al organismo a tratar infecciones víricas y tumores más eficazmente, y disminuyéndola con dosis bajas para reducir la severidad de reacciones autoinmunes o inflamaciones excesivas.

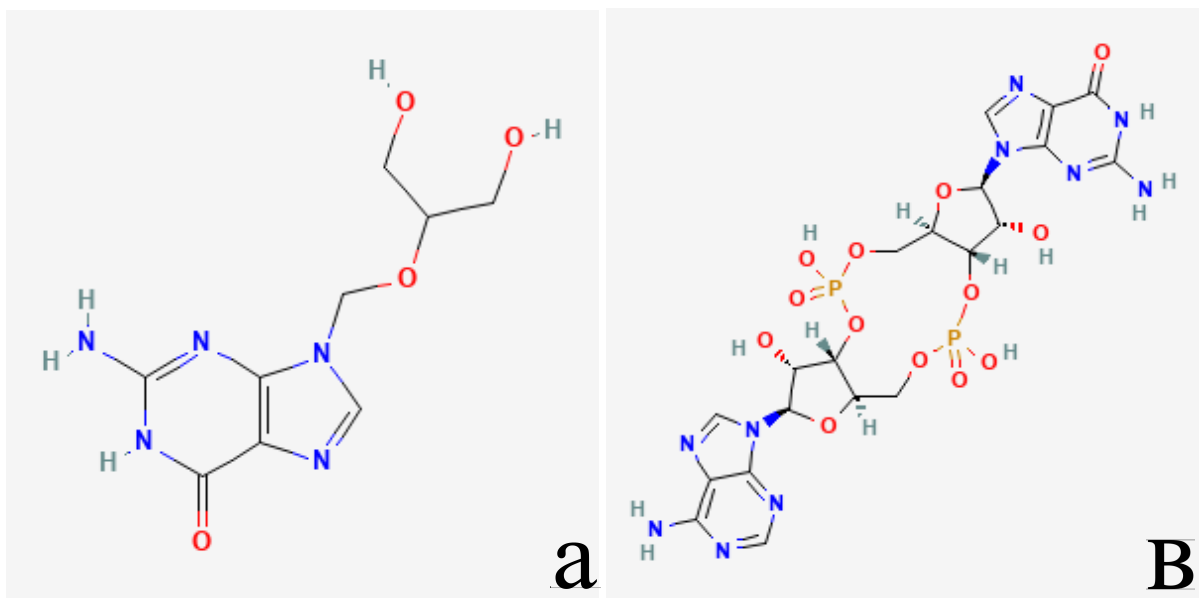


Figura 4: Comparación de las estructuras químicas de GCV y cGAMP. Pudiendo observar como parte de la estructura de cGAMP coincide con la del GCV.

Figura 4a: Estructura química del GCV. Extraída de la referencia (15)

Figura 4b: Estructura química del cGAMP. Extraída de la referencia (16)

Cabe resaltar, sin embargo, que este fenómeno podría no ser trasladable a seres humanos. Ya que a pesar de que los ratones poseen un sistema inmune muy similar al de las personas, la activación de cGAS-STING en DCs de cada especie difiere significativamente. Observándose, por ejemplo, una menor apoptosis inducida por STING, así como una mayor secreción de INF- λ , en DCs humanas respecto DCs de ratón (17). También está el hecho de que se haya observado en macrófagos, que poseen capacidades muy inferiores respecto DCs para influenciar en las concentraciones de INF 1.

- **Hipótesis y objetivos del trabajo**

Para poder usar GCV en seres humanos como un tratamiento que evite reacciones inmunes extremadamente altas o bajas, sus propiedades inmunomoduladoras deben estar presentes en las principales células reguladoras de INF tipo 1, las DCs.

Por lo que el presente estudio, se probará si el GCV actúa como agonista parcial de la ruta cGAS-STING de las DCs humanas.

Para lograrlo, los objetivos de este trabajo, en orden de importancia a obtener son:

- Testar si el Ganciclovir es capaz de alterar la activación de las DCs.
- Confirmar que las concentraciones de GCV altas potencian el fenotipo proinflamatorio de la activación de las DCs, mientras que las concentraciones bajas los disminuyen.
- Observar si el GCV aumenta la capacidad de las DCs para activar linfocitos.
- Descubrir la concentración, o el rango de concentraciones, a partir del cual GCV pasa de generar un efecto potenciador a uno atenuante de la respuesta inmune.

- **Metodología**

Las muestras de sangre fueron obtenidas de donantes anónimos por medio del Banco Catalán de Sangre y Tejidos, CBTB. Que consintieron tras haber recibido toda la información pertinente de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Mundial de Medicina (WMA) tanto de forma oral como escrita.

- Aislamiento de monocitos CD14+ de la sangre periférica:

Partiendo de una muestra sin suero (Buffy Coat), al estar muy concentrada sin este, se diluye con PBS en un tubo Falcon de 50 ml hasta obtener un volumen de 30 ml. Por otro lado, se prepara en otro Falcon de 50 ml 15 ml de solución aisladora de linfocitos (Ficoll-Paque). Sobre esta que se añaden, despacio y con cuidado para que los medios no se mezclen, los 30 ml de muestra diluida. Obteniendo un volumen final de 45 ml, con una relación 1:2 entre el Ficoll-Paque y la muestra. Esta se centrifuga durante 30 min a 600 g, a 23 °C, con una aceleración de 9 g y una deceleración de 1 g. Ya que si la deceleración es muy alta esta puede provocar la mezcla de las fases. Una vez separados los componentes de la sangre por gradiente de densidad, se aísla la capa que contiene las células mononucleares de la sangre periférica (18)(Figura 5).

A partir de ahí se pasa a un nuevo Falcon de 50 ml, y se mezcla con PBS hasta llegar a los 50 ml. Se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones, excepto que la deceleración se puede subir a 9 g, durante 5 minutos.

Se remueve el sobrenadante, y se resuspende el pellet en 600 µl de solución MACS buffer, pasándolo a un Eppendorf de 2 ml, y limpiando el falcon con otros 300 µl de MACS, que se pasan al mismo tubo. MACS debe mantenerse a 4 °C tanto como se pueda. Para aislar monocitos del resto de células mononucleares, se incuba la muestra durante 20 a 4 °C con 150 µl de microbeads unidas a anticuerpos para CD14. Se pasa la muestra por una columna metálica unida a un imán, y se lava 3 veces con 1 ml de MACS por lavado, de forma que aquellas células que expresan CD14 quedan en la columna. Luego, se cambia el tubo donde cae la solución que pasa por la columna por otro nuevo, se remueve la columna del imán, y se vuelve a lavar la columna con MACS. Pero solo 1 vez con 5 ml, y usando una jeringa para que circule con más fuerza. Aislando así monocitos CD14+ de la muestra.

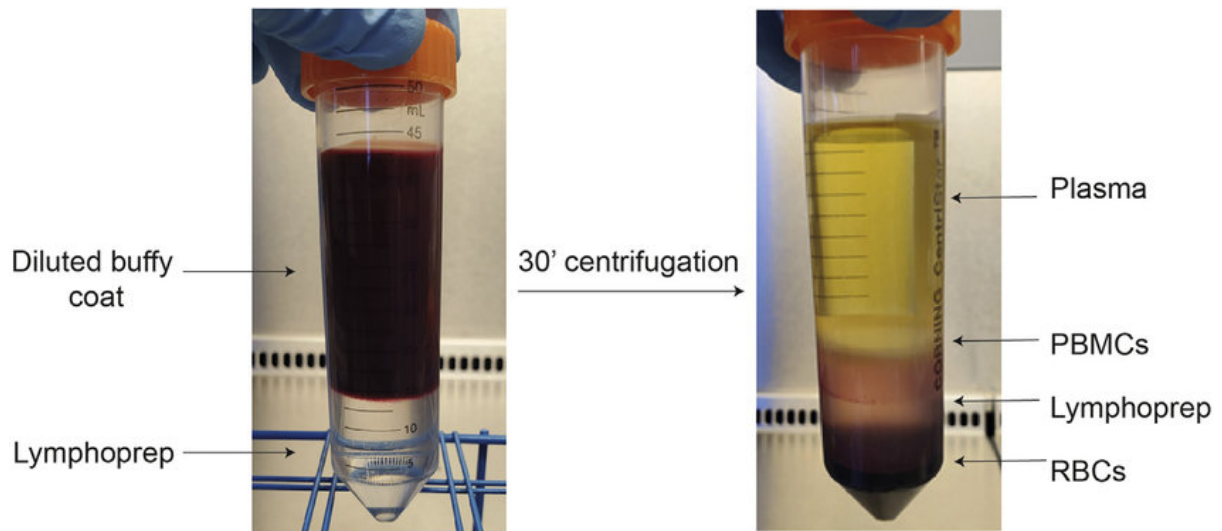


Figura 5: Fases antes y después de la centrifugación de la sangre. *Diluted buffy coat* es la muestra de sangre, *Lymphoprep* es el Ficoll-Paque, *RBCs* son los glóbulos rojos y *PBMCs* son las células mononucleares de la sangre periférica. Imagen extraída de la figura 1 de la referencia (18).

Por último, es necesario contar células en una cámara de Neubauer.

Diluyendo la muestra previamente en MACS, en relación 1:40, para obtener una densidad celular apropiada para contar en 10 μ l. La densidad celular de la muestra equivale a la media contada en los cuadrados multiplicada por 400.000 (40 por la dilución y 10.000 por la propia cámara).

- Sembrado de monocitos en placa de cultivo:

En base al número de células contadas, se calcula el volumen que sea necesario para contener la cantidad de células totales requeridas y se pone en un Eppendorf de 2 ml. Se centrifuga a 600 g en una minicentrífuga durante 5 min. Su radio es lo bastante pequeño como para que no sea necesario especificar aceleración o deceleración. Luego se remueve el sobrenadante y se resuspende, en un Falcon de volumen apropiado, el pellet en suficiente medio RPMI 1% PenStrep (un antibiótico bactericida) para poder sembrar cada pocillo con el número requerido de células.

Este medio carece de sérum y es metabólicamente estresante, lo que induce a que las células se adhieran a la superficie del pocillo. Entre 20 y 25 min de incubación es suficiente para que la mayoría de las células se adhieran. Luego se remueve el medio estresante, dejando las células en los pocillos, y se sustituye por el medio de cultivo. Este se prepara con el mismo RPMI 1 % PenStrep, más un 10 % de FBS, que aporta nutrientes, y las citoquinas adecuadas para la diferenciación. Siendo necesario GM-CSF, el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos. Que por sí solo induce la diferenciación de monocitos a macrófagos, pero que junto a IL-4 induce en su lugar a su diferenciación a células dendríticas. Requiriéndose 1 μ l por cada ml de medio de cada una. Se agrega suficiente medio de cultivo a cada pocillo para que la densidad celular sea de 1 millón por cada ml de medio, para que haya suficientes nutrientes y citoquinas para todas las células. Se requieren 5 días de incubación a 37 °C y con un 5 % de CO₂ en el aire para que se complete la diferenciación.

- Activación celular:

En el quinto día de incubación, una vez las células se han diferenciado en DCs, para inducir la respuesta inmune del cultivo estimulando la ruta cGAS-STING (ya que hay otras capaces de desencadenarla), se ha utilizado LPS bacteriano.

Por ser la molécula activadora más barata, estable y fácil de conseguir. En cada pocillo, se agrega 1 μ l de LPS por cada ml de medio, sin cambiarlo por uno nuevo. Para comprobar los efectos de GCV, es en esta etapa cuando también se añaden diferentes concentraciones de este. Para que se puedan dar todos los cambios fenotípicos asociados a la activación, la placa se deja dos días más en la incubadora.

Una vez transcurridos 7 días desde el inicio de la incubación, se recogen las células de los pocillos: Pasando una espátula de goma por toda la superficie con delicadeza para despegar las células sin romperlas, y se resuspende el medio varias veces con una pipeta para generar corrientes, con el mismo objetivo. Luego se transfiere el medio a Eppendorfs de 2 ml y se procede con las pruebas analíticas, trabajando en hielo para mantener las células a 4 °C, conservándose así mejor durante el procedimiento.

- FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Para esta prueba, se requiere un mínimo de 200.000 células por cada mix de anticuerpos. Aunque es recomendable partir de más, 300.000-400.000 células permite paliar la muerte celular resultante del tratamiento previo, así como reducir el tiempo de análisis de cada muestra, que fácilmente se acumula.

Antes de empezar el tratamiento, hay que separar un volumen pequeño (unos 100 µl es suficiente) del resto para usarlo luego como blanco con el que contrastar la absorbancia.

Primero se centrifuga el volumen necesario durante 5 min a 1000 g en una centrifuga fría a 4 °C. Se descarta el sobrenadante, o se guarda para otra prueba, y se resuspende el pellet en 200 µl de PBS + 2 µl de *Live and Dead Violin*. Un colorante incapaz de atravesar la membrana celular, de forma que solo tiñe las células muertas. Se incuba durante unos 20 minutos a temperatura ambiente, para facilitar la coloración, agregando 1 ml de MACS para diluir el colorante y detener la tinción. Este es el único paso que no se hace en hielo a 4 °C.

Se centrifuga bajo las mismas condiciones que antes, se descarta el sobrenadante, y se resuspende el pellet en 200 µl de MACS + 1 µl de Fc block.

Este último se encarga de reducir las uniones inespecíficas del Fc del anticuerpo a sus receptores, presentes en DCs , ayudando a obtener señales de fluorescencia con menos ruido de fondo. Se incuba al menos 5 minutos.

No es necesario centrifugar para quitar Fc block.

Directamente, se agrega a cada Eppendorf 200 µl del Mix de anticuerpos y se incuban durante 20-25 min a oscuras. Estos anticuerpos están unidos a los fluoróforos encargados de dar la señal de absorbancia. El mismo fluoróforo no puede estar unido a más de un anticuerpo en un mismo mix, ya que ambos darían la misma señal y no se podrían distinguir. Se agrega solo 1 de los mixes por Eppendorf, de forma que de cada pocillo se prepara 1 Eppendorf distinto por cada mix. Cada mix es una solución de MACS con un volumen de anticuerpos conjugados a fluoróforos determinado por el número de células, de forma que:

En Mix 1 hay 0,8 µl/Mcel de CD86 - APC + 0,2 µl /Mcel de CD1a - PE

En Mix 2 hay 1 µl/Mcel de CD209 - APC + 1 µl /Mcel de CD80 - PE

En Mix 3 hay 1 µl/Mcel de CD14 - APC + 1 µl /Mcel de HLA-DR - PE

APC y PE presentan absorbancia a diferentes longitudes de onda entre ellos, así como respecto al colorante *Live and Dead Violin*, por lo que las señales que cada uno da no se confunden. Cabe remarcar que son fotosensibles, por lo que es necesario mantenerlos a oscuras en la medida de lo posible.

Respecto a la elección de anticuerpos: CD86, CD80 y HLA-DR actúan como ligandos de receptores presentes en linfocitos T que inducen su activación. HLA-DR como parte de MHC tipo 2, y CD80 y CD86 como coestimuladores de la activación. Sirven para evaluar la potencia de la respuesta inmune que se está induciendo. Por otro lado, CD14 actúa como marcador de superficie específicos de monocitos, mientras que CD1a y CD209 lo son de dendríticas. Sirviendo para evaluar el grado de diferenciación.

Después de la incubación, se agrega 1 ml de MACS para diluir los anticuerpos y se centrifuga, con las mismas condiciones de antes. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet. En 300 µl de MACS, si el análisis se efectúa el mismo día, o en 300 µl de PBS 4% Paraformaldehído, si la muestra se ha de conservarse para otro día. Estos volúmenes son arbitrarios, cuanto mayor sea más fácil es resuspender y trabajar con las muestras, pero más tiempo se tarda en realizar las mediciones en el citómetro, al estar las células más diluidas.

Si se analiza otro día, las muestras se guardan a 4 °C a oscuras, para evitar la degradación de los fluoróforos unidos a las células. También hay que centrifugar los blancos (mismas condiciones), descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en la misma solución que las muestras.

Para pasar las muestras por el citómetro, hay que pasarlas a unos tubos específicos para la máquina. Antes de pasar cada tubo por el citómetro, es necesario agitarlos para separar los agregados celulares. En el programa que controla y guarda las mediciones, hay que especificar una ventana de tamaño y complejidad. El citómetro (19)(Figura 6) registra cuerpos presentes en el líquido que aspira como "eventos", y aquellos que se encuentren en la ventana delimitada como células individuales. Siendo lo demás restos celulares, conglomerados, o suciedad. Lo ideal es poder alcanzar 10.000 eventos de células individuales, vivas o muertas, pero si no hay suficientes en el tubo, 6.000 es el mínimo para poder fiarse de los resultados.

Es importante que, si durante el proceso se observa que el líquido se está acabando, se pare la aspiración, aunque aún no se hayan obtenido suficientes eventos, para evitar que se aspire aire y se formen burbujas dentro del citómetro.

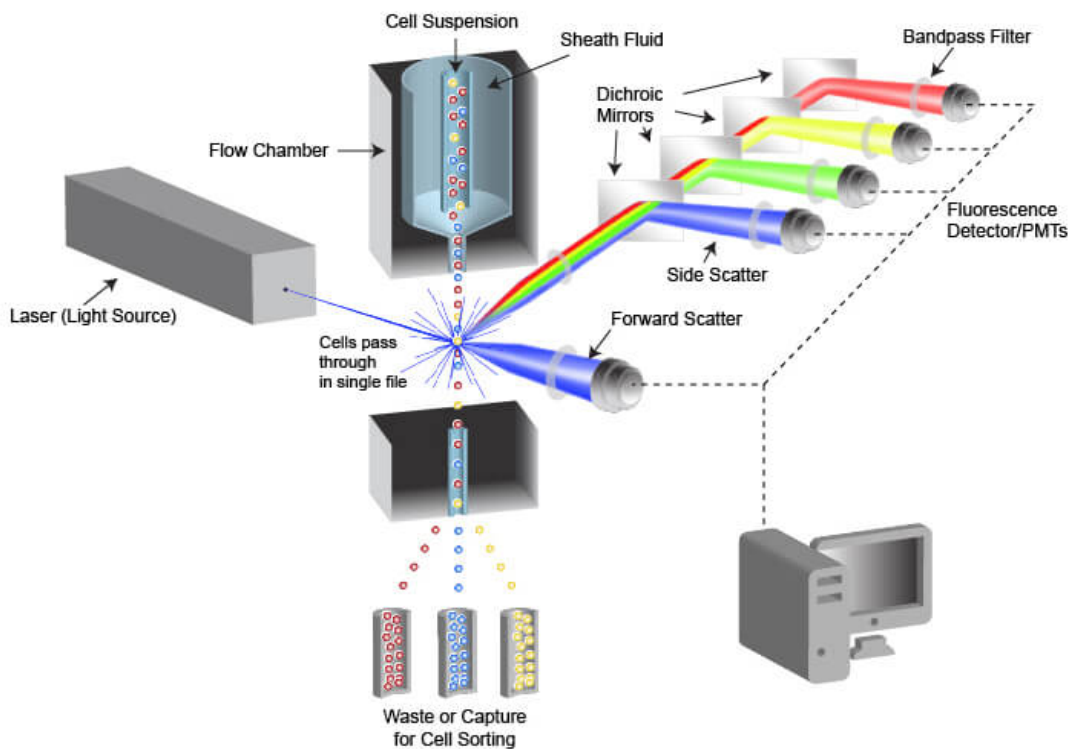


Figura 6: Esquema de los componentes esenciales del citómetro. La cámara de flujo separa las células a nivel individual, y estas se analizan pasándolas por un haz de luz. *Forward Scatter* mide su tamaño, mientras que *Side Scatter* mide su complejidad interna. También cuenta con lectores para medir la fluorescencia que emite la célula a diferentes frecuencias (19).

- RT-qPCR

Para esta prueba, se parte de 1 millón de células. Es necesario utilizar puntas con filtro, para evitar contaminaciones que dañen el RNA o ensuciar la pipeta con los compuestos usados.

Se centrifuga el volumen necesario para ello 5 min a 1000 g a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 200 µl de Solución Homogeneizadora. Esta, junto al resto de soluciones usadas, viene ya en el Maxwell Kit. En este estado las muestras se pueden guardar a -80 °C y continuar otro día.

Para proseguir, se agregan 200 µl de Lysis Buffer y se agita en un vortex 15 segundos mínimo, destruyendo la membrana celular. Seguidamente se prepara un cartucho por cada muestra, cada uno compuesto por 8 pocillos en línea. Hay que poner también Eppendorfs (de 1,5 o 2 ml, ambos sirven) colectores con 40 µl de agua libre de nucleasas, esta también viene en el kit.

Hay que poner toda la muestra en el primer pocillo, 5 µl de DNAsa 1 en el cuarto (contiene una solución amarilla, que contrasta con el colorante azul presente en la DNAsa) y las puntas de la máquina Maxwell (20)(Figura 7) en el octavo. Esta se encarga de purificar el RNA de las muestras y depositarlo en los Eppendorfs colectores. Hay que indicarle que ejecute el programa “*RSC simply RNA Tissue Kit*”, específico del kit usado. Dura 50 minutos.



Figura 7: Modelo de la Máquina Maxwell utilizada. Foto cargada con 5 cartuchos, 5 puntas y 5 tubos colectores. Obtenida de la referencia (20).

Al acabar hay que cuantificar el RNA obtenido usando un NanoDrop (21)(Figura 8). Usando una gota de 1 μ l de agua libre de nucleasas como blanco, y una gota de 1 μ l de cada muestra. Con esta concentración, se calcula el volumen para tener 250 ng de RNA, y se preparan alícuotas con ese volumen de muestra, enrasando hasta los 12 μ l con agua libre de nucleasa. De ser necesario, en esta etapa también se pueden guardar las muestras a - 80°C.

Para pasarlo a cDNA, se usa un *Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit*. Este contiene viales con los componentes necesarios. Primero se agrega a la muestra 1 μ l del vial 5, que contiene primers específicos para la unión de la cadena a las colas de poli A del RNA (concretamente, *Anchoredoligo(dT) 18 Primer*).

Seguidamente se hace un ciclo de PCR de: 65 °C durante 10 min, 4 °C indefinido. Este ciclo permite la unión de los *primers* al RNA mensajero. Luego se prepara un mix con los viales 1 (0,2 μ l), 2 (4 μ l), 3 (0,5 μ l) y 4 (2 μ l) para cada muestra. Donde el vial 1 contiene la transcriptasa reversa, 2 es el buffer para la reacción (con magnesio, tampones de Ph...), 3 es un inhibidor de RNAsas, y 4 es el mix de dinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP).

El volumen total del mix (6,7 μ l) es añadido a la muestra y se realiza un segundo ciclo de: 30 min a 55 °C, 5 min a 85 °C y 4 °C indefinidamente. Se agregan 180,3 μ l de agua libre de nucleasa para tener el cDNA a una concentración de 1,25 ng/ μ l. Este puede ser guardado a -20 °C, ya que es mucho más estable que el RNA. A partir de este, se hace la qPCR. Usando una placa de 384 pocillos, se agregan 5 μ l de SYBR Green a cada pocillo que se vaya a usar. Este, al intercalarse en una doble cadena de ADN durante su formación, aumenta su fluorescencia. Lo que se usa para medir la abundancia del cDNA amplificado.



Figura 8: Modelo de la Máquina Nanodrop utilizada. En la foto, la pipeta indica dónde va la gota a analizar de 1 μ l. Con una tapa imantada para que cierre bien. Imagen extraída de la referencia (21).

También hay que añadir los *primers*, tanto el Forward como el Reverse, de los genes estudiados. Usando los genes TNF α , IL-6 y NF- κ B como genes pro inflamatorios y IL-10 como gen antiinflamatorio. Además del gen RPL-38, ya que su expresión constante (Housekeeping) es necesaria como referencia para comparar la del resto de genes. Hay que añadir 1 μ l de un mix Forward + Reverse, siendo cada uno un 10 % del mix, y el otro 80 % agua libre de nucleasa. Se usa un pocillo diferente para cada gen por muestra. Se pueden echar a la vez que SYBR Green para agilizar el proceso. Luego por último se agregan 4 μ l de cada muestra, haciendo un triplicado técnico (cada combinación de *primers* y muestra está presente en la placa 3 veces). También hay que dejar un triplicado por cada gen sin muestra para usar de blanco, y confirmar que no haya contaminantes que distorsionen la absorbancia. Una vez preparada la placa, se usa la máquina Roche Light Cycler® 480 para obtener los CTs (*Cycle Threshold*) de los genes, el número de ciclos de PCR necesarios para superar una fluorescencia determinada. Este programa tarda 70 min en completarse y es inversamente proporcional a la expresión del gen (al número de copias de cDNA presentes para ser más exactos).

- **Resultados experimentales y discusión de estos**

Debido a limitaciones técnicas, para los tests usando GCV, su estudio se ha dividido en 4 experimentos. Cada uno con la intención de estudiar sus efectos en diferentes escenarios. Cada uno se realizó usando sets de muestras diferentes, por lo que aunque dos muestras se llamen igual, si se encuentran en experimentos diferentes, provienen de donantes distintos. Para todos ellos, se usó GCV de la misma solución madre de agua desionizada con un pH de 11, a una concentración 10 g/l. Para diluir esta concentración, o usar concentraciones de 0, se usó agua desionizada al mismo pH.

El primer experimento lanzado fue uno de prueba. Para obtener experiencia en las diferentes técnicas y procedimientos descritos en la metodología, así como para ver el tipo de respuesta que daban las células al tratamiento. Se usó una placa de 12 pocillos, lo que permitió usar 3 muestras de pacientes distintos, un triplicado biológico, y 4 concentraciones distintas de GCV para cada una. 0, 50, 100 y 200 μM . De cada muestra se obtuvieron:

Muestra A: $49,4 \cdot 10^6$ cel/ml

Muestra B: $21,8 \cdot 10^6$ cel/ml

Muestra C: $22,2 \cdot 10^6$ cel/ml

De cada una se cogió suficiente volumen para sembrar $1,2 \cdot 10^6$ cell en cada pocillo ($4,8 \cdot 10^6$ células en total por muestra). GCV se añadió el primer día de la incubación de los monocitos, junto a las citoquinas para su diferenciación en DCs. Al quinto día, se activaron las células de todos los pocillos con LPS bacteriano.

Al séptimo día se recogieron las muestras y se hizo una prueba FACS, usando los 3 mixes de anticuerpos. Lo que dió 37 tubos a analizar, incluyendo el blanco. El FACS se realizó el mismo día de la preparación, por lo que las células no se resuspendieron en PBS 4% Paraformaldehído, sino en 400 μl de MCAS.

Desafortunadamente, debido a un mal manejo de las muestras durante su preparación, fruto de la inexperiencia, la porción de la población que se perdió en el proceso fue demasiado alta. Lo que resultó en un número insuficiente de eventos de células vivas (menos de 6.000). Impidiendo la obtención de resultados analíticos.

Tampoco se comprobó su estado en el microscopio antes de empezar, por lo que no se pudo confirmar que el tratamiento no hubiera sido demasiado agresivo.

Se sugirió que agregar GCV tan temprano en la incubación podría ser otra causa de la alta muerte celular. Ya que los Monocitos presentan una mayor propensión a entrar en apoptosis frente a un determinado estímulo, comparado con Macrófagos o las DCs, por lo que las concentraciones de GCV utilizadas podrían haber resultado tóxicas. Si además se le suma la activación con LPS bacteriano, se podría haber dado una sobreestimulación de las células, lo que también podría haber provocado una alta muerte celular.

Aun así no todo fue en vano, ya que el primer experimento sirvió para mejorar el diseño de los siguientes. También permitió detectar los puntos más tediosos y complicados del proceso, lo que sirvió para buscar mejores maneras de proceder con ellos en el futuro.

El segundo experimento, a diferencia del primero, se diseñó con la intención de minimizar el estrés provocado por el tratamiento. Su objetivo, fue evaluar las capacidades del GCV para actuar como un agonista de la respuesta inmune, viendo si este es capaz de inducir la activación celular en ausencia de otros estímulos. Y de ser el caso, a partir de qué concentración. Como en el anterior experimento, se usó una placa de cultivo de 12 pocillos, pero sólo se usaron 2 muestras biológicas, lo que permitió un mayor rango de concentraciones. Reducir el número de réplicas biológicas disminuye la fiabilidad de los resultados, pero en este caso tan solo se quiere comprobar si se observa alguna diferencia. Las concentraciones de GCV usadas fueron 0, 25, 50, 75, 100 y 125 μM . De cada muestra usada se obtuvieron:

Muestra A: $35 \cdot 10^6$ cel/ml

Muestra B: $22,1 \cdot 10^6$ cel/ml

Se cogió de cada una el suficiente volumen como para poder sembrar $7,2 \cdot 10^6$ células en total ($1,2 \cdot 10^6$ células por pocillo, como en el anterior experimento). Esta vez el cultivo se incubó 5 días en ausencia de estímulos activadores, solo con las citoquinas necesarias para su correcta diferenciación en DCs. En lugar de activar con LPS bacteriano, este se sustituyó por el GCV, agregando las 6 concentraciones distintas, una por pocillo, a cada muestra. Y dejándolo los 2 días de activación.

Tras la incubación, se usó todo el volumen para realizar un análisis FACS.

Las muestras para FACS se analizaron 3 días después de su preparación, por lo que se conservaron en 300 μ l PBS + 4 % Paraformaldehído. Para la prueba se usaron los 3 mixes de anticuerpos previamente descritos. Además, debido al desconocimiento de si GCV podría generar interferencias con la absorbancia, se usaron blancos para cada pocillo de la placa de cultivo. Obteniéndose un total de 48 tubos a analizar.

Para preparar los tubos con mix de anticuerpos se partió de 200.000 células teóricas (asumiendo que no hubiera muerte celular o pérdidas durante la preparación). El sobrante se usó como blanco (600.000 cel). Se pudieron obtener más de 6.000 eventos para casi todos los tubos, suficientes como para poder comparar la fluorescencia de las diferentes concentraciones. Siendo la excepción el mix 3 de la muestra B a 75 μ M.

Los datos del análisis se guardan para cada tubo en un archivo “.fcs”, siendo necesario usar un programa específico para leer estos archivos (en este caso, se usó el programa FlowJo).

Para evitar analizar las células en mal estado, primero hay que seleccionar los eventos que corresponden a células individuales, ya que en un evento compuesto por múltiples células la fluorescencia total se contará como si fuera la de una sola célula. Para ello, se compara el tamaño, analizado por el Forward Scattering (FCS), del área respecto a la altura máxima, FSC-A vs FSC-H (Figura 9). Siendo que el área aumenta al cuadrado respecto a la altura, aquellos eventos que no lo hagan, o que tengan un área muy grandes (más de 200 k) o muy pequeña (menos de 50 k), se descartan. Se permite una variación en la altura para un área dada de hasta 2,4 veces entre los extremos superiores e inferiores.

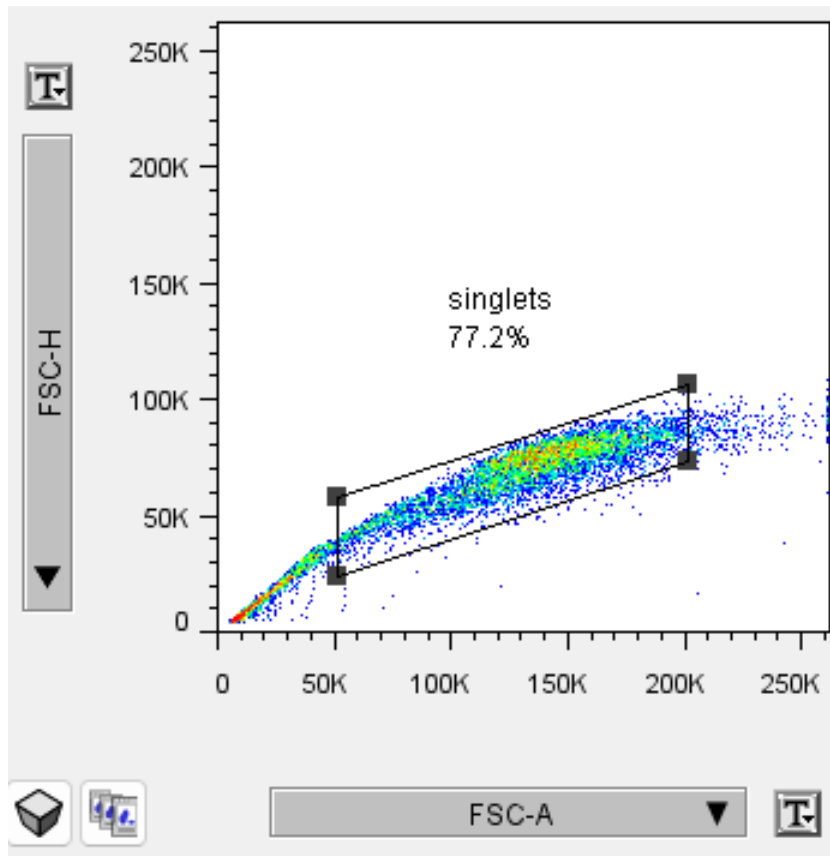


Figura 9: Selección de células individuales. La fracción de los eventos obtenidos que son reconocidos como células enteras individuales, o *singlets*, mediante el uso de FlowJo. Basado en sus valores de FSC-A y FSC-H medidos por citometría de flujo. Ejemplificado usando el mix 1 del control de la muestra A.

Del grupo conservado, se tendría que mirar la absorbancia Pacific blue para separar las células vivas de las muertas. Pero por un error en la preparación de las muestras, estas no se pudieron teñir con *Live and Dead Violin*, ya que esto se detectó una vez las células ya se encontraban conservadas en PBS + 4% paraformaldehído. Estado en el que se encuentran preservadas pero muertas, por lo que la tinción daría todas las células positivas. En su defecto, se discriminan las células vivas de las muertas en base a su complejidad interna, analizado mediante el Side Scattering (SSC). Ya que las células vivas, a diferencia de las muertas, poseen una presión osmótica interna diferente a la del medio. Este no es el método ideal, pero permite quitar eventos con complejidades anormales, quedándonos con las que se quedan cerca un SSC-A de unos 60 k (figura 10).

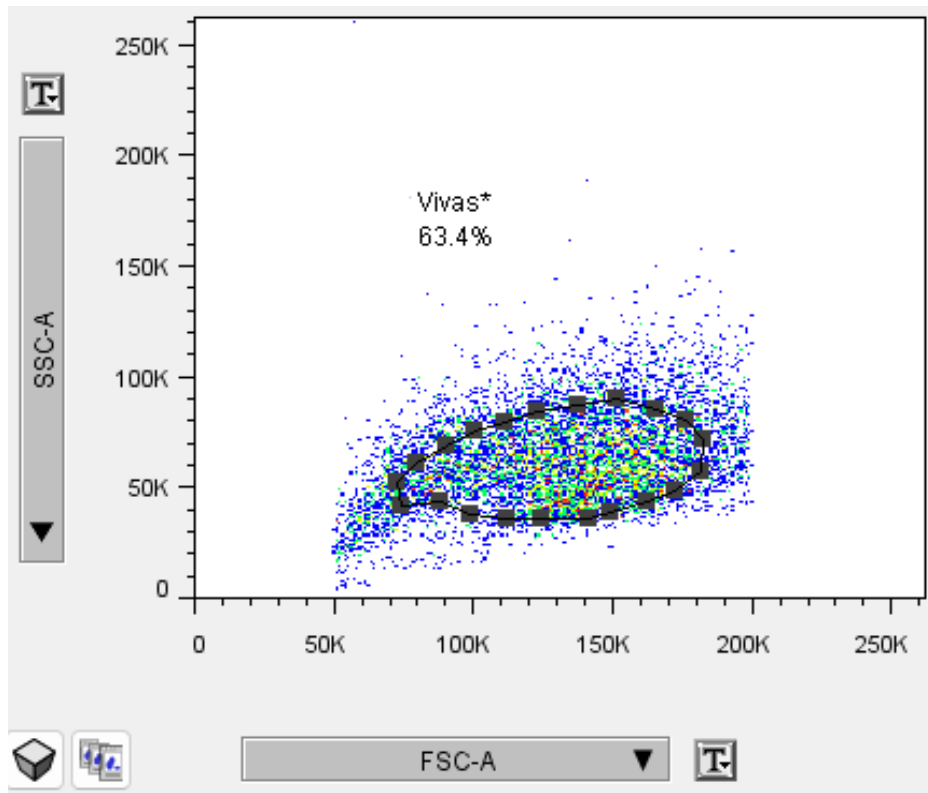


Figura 10: Población de células vivas seleccionada. En base al valor de su SSC-A usando FlowJo, obtenidos mediante citometría de flujo. Ejemplificado usando el mix 3 del control de la muestra A.

De este grupo, se extraen los valores medios de absorbancia, o *Mean Fluorescence Intensity* (MFI), para la frecuencia de los fluoróforos APC y PE. Para ello hay que usar la opción “*add statistic*” del FlowJo. Y se exportan en formato “.CVS”, que puede ser editado mediante Excel. En este estado los datos se pueden reordenar y especificar a qué anticuerpo corresponde cada valor de MFI. El archivo se guarda en formato “.xlsx”.

Para visualizar los resultados de forma que sean más fáciles de comparar, se puede generar un boxplot a partir de estos. Mediante el uso de la herramienta de programación “R studio” para trabajar con el lenguaje de programación R.

Para la creación del boxplot se han usado las librerías “`tydiverse`” y “`ggpubr`”. La primera aporta el paquete “`ggplot2`” para generar la figura, mientras que la segunda aporta funciones que ayudan a ajustar los parámetros de “`ggplot2`”.

El boxplot también va acompañado de un t test que compara las medias de las diferentes muestras biológicas para una concentración de GCV concreta, para determinar si las diferentes concentraciones difieren significativamente respecto al control. La población que presenta una concentración de GCV de 0 μM .

También, los valores del mix 3 de la muestra B con 75 μM de GCV, del que no había suficiente muestra, se han sustituido por los de la muestra A de la misma concentración y mix, para poder seguir haciéndole el t test.

Ha habido una complicación con el código, que causa que el último t test (el grupo de 120 μM de GCV) quede tapado por el título de la figura y no se pueda leer bien.

Para remediarlo, se ha agregado una concentración extra a la lista de resultados con valores iguales al control, llamada “_” para que sea este el que se quede tapado por el título. Generando así los resultados del experimento 2 (figura 11).

Basándose en el aumento observado de los niveles de CD80, CD86 y HLA-DR conforme aumentan las concentraciones de GCV, los resultados parecen sugerir el cumplimiento de la hipótesis, que GCV posee ciertas propiedades proinflamatorias.

En retrospectiva, habría estado bien tener un segundo control de células activadas con LPS. Para así poder contrastar la intensidad de la activación causada por GCV. Los niveles de CD1a y CD 209 respecto CD14 parecen sugerir que se ha dado una correcta diferenciación. Sin embargo, el haber usado solamente 2 muestras vuelve más imprecisos estos resultados, sobre todo habiendo algunos grupos con grandes diferencias entre las muestras biológicas. Lo que se junta a resultados que tampoco son tan diferentes entre ellos, quedando la duda de hasta qué punto el aumento del fenotipo proinflamatorio es relevante. No se puede distinguir un punto de inflexión que indique posibles concentraciones con efectos antiinflamatorios, o ausencia de una inflamación proporcional a la concentración de GCV.

Tratamiento con GCV

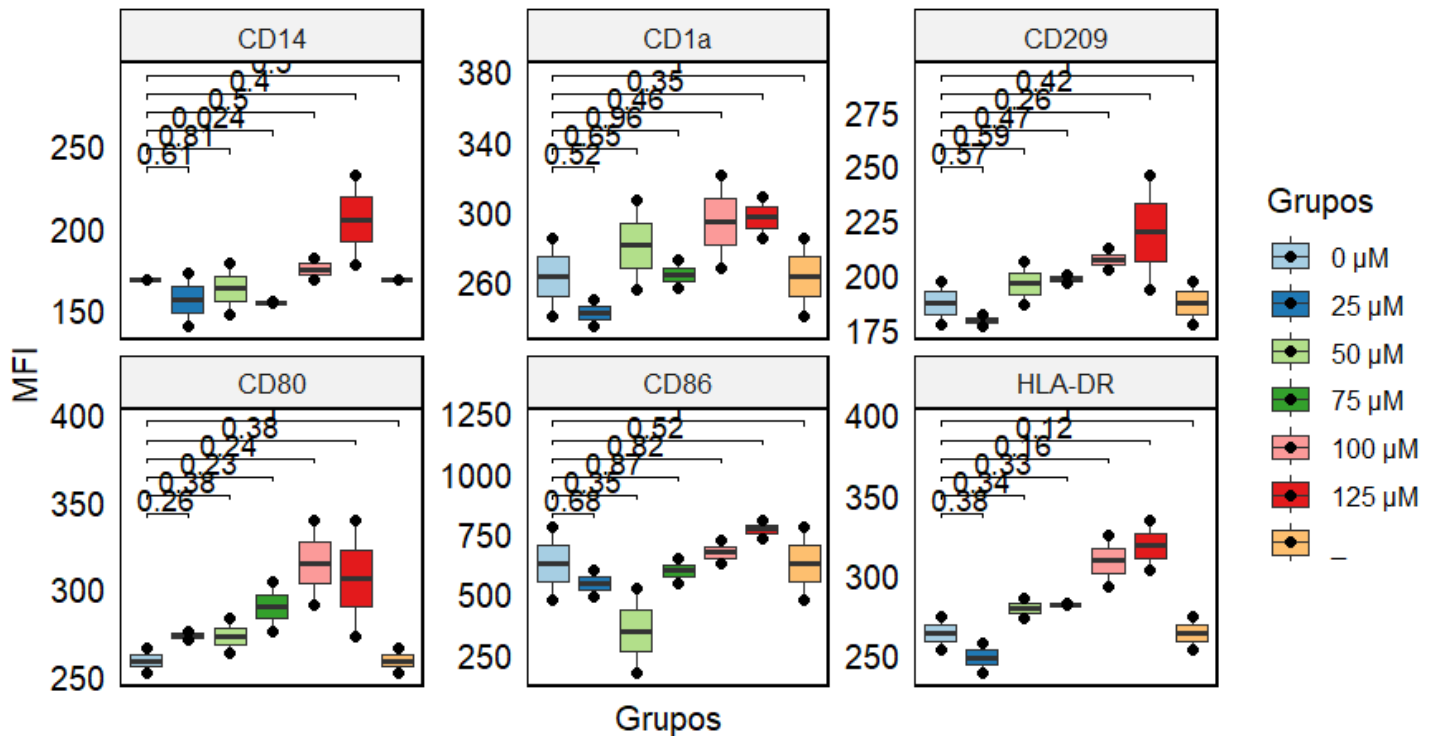


Figura 11: Boxplots del FACS de muestras tratadas con GCV. Agrupados según la concentración de GCV en las placas de cultivo. Comparación de la variación relativa de los marcadores de superficie por inmunotinción con los anticuerpos de los mixes 1, 2 y 3. Acompañados de un análisis t test de la similitud respecto al control. Imagen creada utilizando R studio para programar en R.

El tercer experimento, creado para complementar la información obtenida en el anterior, se ideó con la intención de estudiar los efectos del GCV en presencia de LPS bacteriano, para tratar de observar sus posibles efectos antiinflamatorios. Similar al experimento anterior, se usó una placa de 12 pocillos para estudiar dos muestras biológicas diferentes. Usando GCV a concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 μM para cada muestra. Además, para contextualizar mejor los resultados, se ha usado un segundo control, células en ausencia tanto de GCV como de LPS bacteriano. Se partieron de dos muestras con una densidad celular de:

Muestra A: $21,1 \cdot 10^6$ cel/ml

Muestra B: $16,6 \cdot 10^6$ cel/ml

Se cogió suficiente volumen para sembrar cada pocillo con $1,2 \times 10^6$ células, 6 pocillos cada muestra. Similar al experimento anterior, se dejó que los monocitos se diferenciaron hasta el quinto día en DCs en ausencia de señales activadoras. En la etapa de activación, se agregó tanto suficiente GCV como para tener las concentraciones indicadas como LPS. Dejándose dos días más de incubación antes de recoger las muestras, usándolas para realizar un FACS.

Se usaron todas las células para el FACS, partiendo de 300.000 células teóricas para cada uno de los 3 mixes, usando las 300.000 restantes para hacer 1 blanco por muestra ($300.000 \times 4 = 1.200.000 =$ el total de células en cada pocillo).

A diferencia del experimento anterior, sí que se realizó la tinción con *Live and Dead Violin* durante la preparación de las muestras. Aunque, para intentar ahorrar tiempo, se incubaron las muestras con Fc block a la vez que con los mixes de anticuerpos, lo que ha podido invalidar parcialmente el uso de Fc block. Por un error agregando los anticuerpos, la muestra B sin GCV ni LPS bacteriano con el mix 2 se tuvo que descartar. Las muestras se conservaron en 300 μ l de PBS 4 % paraformaldehído, para ser usadas 4 días después en el FACS.

Durante este, se lograron alcanzar los 10.000 eventos en la mayoría de los tubos. Encontrándose el resto entre los 6.000 y 10.000 eventos. Aunque hubieron 3 tubos que no llegaron a los 6.000 eventos: Los mixes número 2 de la muestra A con 100 μ M de GCV (unos 3.500 eventos), y de las muestras B con 50 y 75 μ M de GCV (unos 4.500 y 3.500 eventos respectivamente).

El procesamiento de los datos con FlowJo fue similar, pero una vez aislados los eventos correspondientes a células individualizadas, se usó la absorbancia de Pacific Blue, junto con FSC-A, para determinar las células vivas (Figura 12).

Se observó que las muestras de A con 75 y 100 μ M de GCV, y en menor medida la muestra B con 100 μ M de GCV, presentaban una absorbancia mayor, tanto las células vivas como muertas. No hubo problemas separando ambas poblaciones, pero la intensidad general era mayor que el resto. Una posible explicación sería que hubieran estado más tiempo incubándose con el tinte que el resto de las muestras. En cualquier caso, del grupo seleccionado se extrajo el MFI para APC y PE, y se exportó a una tabla Excel. Dónde se asoció cada valor con su anticuerpo, en función del mix que contenía el tubo, para cada muestra y condición.

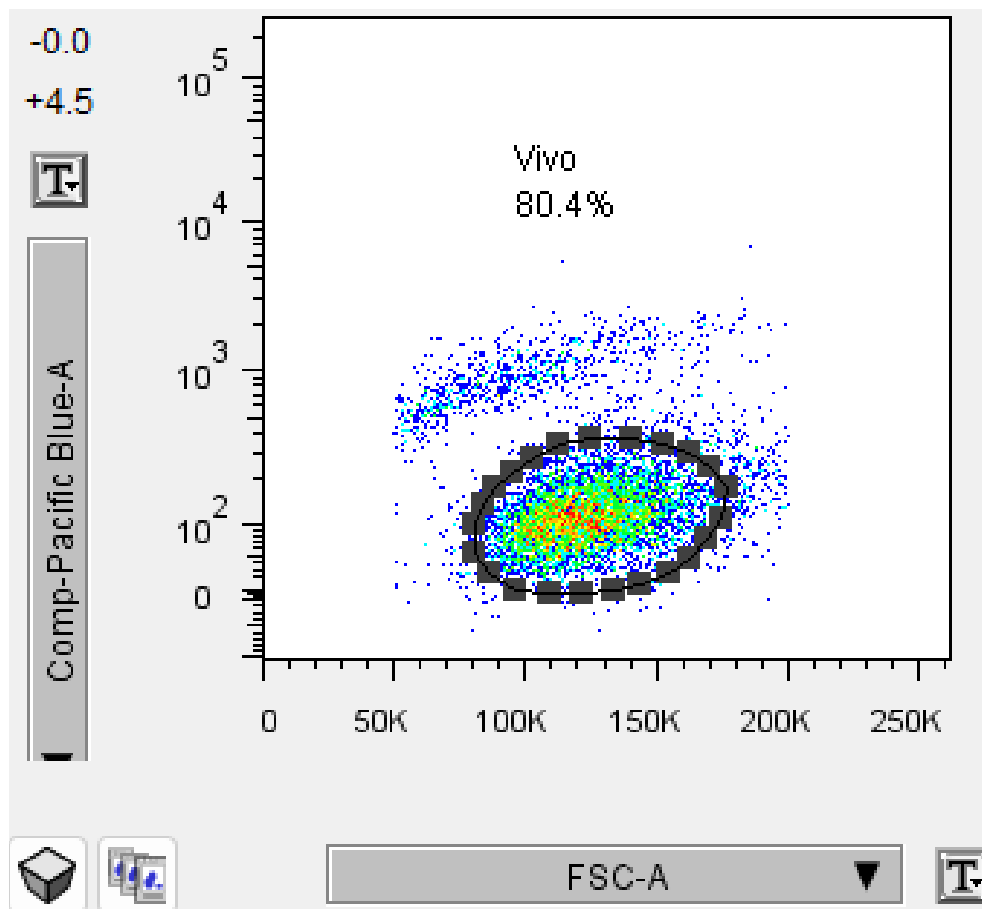


Figura 12: Selección de células vivas por *Live and Dead Violin*. Identificación por tinción negativa. Gracias a esta, como se puede ver en la gráfica, se pueden distinguir fácilmente las dos poblaciones de células, las vivas y las muertas, en función de la intensidad de su absorbancia. La imagen es un ejemplo usando el mix 1 la muestra A con LPS y con GCV = 0 μ M, extraída usando FlowJo.

También se removieron las muestras que se tuvieron que descartar por falta de suficientes eventos o mal preparadas, descritas previamente. Sustituyendo por los valores del pocillo con las mismas condiciones de la otra muestra, para poder hacer el t test. Igual que en el experimento anterior, se ha agregado la concentración extra para evitar que el último t test final sea tapado por el título. Pudiendo generar así un boxplot como el del experimento anterior (Figura 13). En base a este, se puede confirmar que se ha dado una correcta diferenciación, ya que los valores de MFI de CD1a y CD209 son, para cada grupo, superiores al de su respectivo CD14.

Teniendo en cuenta los altos valores de CD86, este es el mejor indicador de la activación, ya que además presenta la diferencia más remarcable entre las muestras con y sin LPS bacteriano. Aunque no hay cambios apreciables entre las muestras con y sin LPS bacteriano. Aunque no hay cambios apreciables entre las diferentes concentraciones de GCV, a excepción del control activado sin GCV. En contraste, CD80 y HLA-DR, presentan un aumento proporcional a la concentración de GCV. Aunque la diferencia entre el control activado e inactivado con LPS bacteriano es mucho menos apreciable. No hay tampoco indicios de una posible actividad antiinflamatoria. Puede haber varias explicaciones para esto: O bien esta se da a concentraciones de GCV fuera del rango usado, o se da en una ventana de concentraciones tan pequeña que queda en medio de dos de las concentraciones usadas, o directamente no es un fenómeno que suceda en DCs.

Tratamiento con GCV+LPS

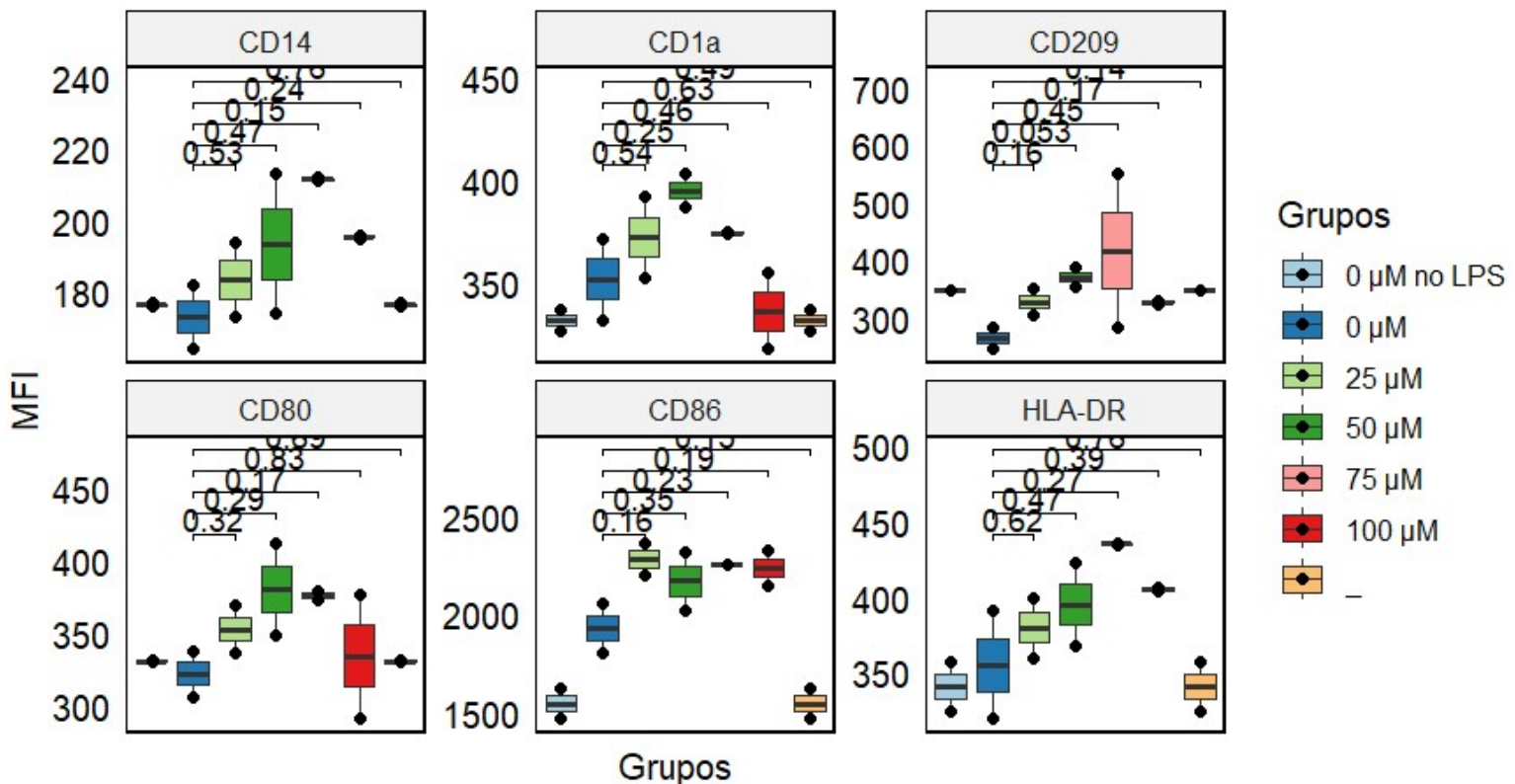


Figura 13: Boxplots del FACS de muestras con LPS y GCV. . Un valor de MFI por cada anticuerpo utilizado en los mixes. Haciendo la media entre la muestra A i B para cada concentración de GCV y LPS bacteriano. Acompañado de un t test respecto al control activado. Creada utilizando R studio para programar en R.

Estos resultados también cuentan con el inconveniente de que al solo usar dos muestras biológicas, la variabilidad que estas tienen pueda distorsionar los resultados. Más aún cuando se da algún fallo y se tiene que descartar algún resultado, como ha pasado aquí. Por suerte, en la mayoría de los casos la diferencia entre los valores entre las muestras biológicas para un mismo anticuerpo y tratamiento no es muy alta, lo que facilita la observación de patrones. Aunque en el experimento anterior hay aún menos variabilidad.

Para solidificar los resultados obtenidos, se decidió realizar un último experimento final. En este cuarto experimento, a diferencia de los anteriores, se optó por usar menos concentraciones, y se trabajó en un rango mayor. Usándose un total de 24 cultivos celulares, distribuidos en 4 placas de 6 pocillos cada una, que son más grandes que las de 12. Este aumento de pocillos, combinado con la disminución de concentraciones de GCV usadas, permitió el uso de tres muestras biológicas. Las concentraciones de GCV usadas fueron 0, 40, 80 y 120 μM . Cultivando, para cada muestra, dos pocillos diferentes por cada concentración. Para así, luego, poder activar una de las dos con LPS bacteriano. Lo que, a nivel efectivo, constituye repetir los experimentos dos y tres a la vez. Solo que esta vez, usando las mismas muestras biológicas, lo que permite una comparación tanto de:

Las diferentes concentraciones de GCV, tanto en presencia como ausencia de LPS bacteriano, y las diferencias, para cada concentración, del estado activado respecto el no activado con LPS bacteriano. Maximizando la información obtenida.

A partir de las muestras de monocitos aislados, que tras contarlos en la cámara de Neubauer dieron una concentración de:

Muestra A = $28 \cdot 10^6$ cel/ml

Muestra B = $15,8 \cdot 10^6$ cel/ml

Muestra C = $25,2 \cdot 10^6$ cel/ml

Esta vez, las pruebas realizadas requieren de más células que el resto de experimentos. Por lo que, de cada muestra, se extrajo un volumen equivalente, según la concentración celular de cada uno, a $2,2 \cdot 10^6$ células por cada pocillo sembrado. Para mantener la densidad celular, se usaron 2 ml de medio de cultivo para cada pocillo.

Por accidente, la placa que contenía todas las muestras que iban a recibir 120 μ M de GCV recibió un golpe. Lo que pudo haber causado un cambio en la densidad celular, o en la cantidad de células en cada pocillo.

De todos modos, se dejó incubando 5 días en ausencia de GCV y LPS bacteriano. Para luego agregar la concentración apropiada de GCV a cada pocillo. Así como LPS bacteriano, los que lo requieren. Dos días de incubación post activación, se recogieron las muestras. 1 ml de cada pocillo se guardó a -80 °C para posteriormente realizar una RT-qPCR. Mientras que el ml restante se usó para realizar una prueba FACS. Este se separó en dos mitades iguales, una por cada mix de anticuerpos. Obteniéndose unas 500.000 células de media por tubo.

Para esta prueba, en vez de usar los mixes convencionales, y para mantener el número de tubos analizados por debajo de 52, solo se usaron dos mixes de anticuerpos:

El mix 1: Que contiene CD86-APC y CD1a-PE

El mix 2: Que contiene CD14-APC y CD80-PE

La concentración de cada uno respecto al número de células tampoco cambió.

También se usó como blanco solamente 100 μ l de los pocillos sin GCV o LPS, por cada muestra. Teniendo 3 blancos + 24 pocillos * 2 mixes de anticuerpos = 51 tubos totales. La preparación de las muestras transcurre sin mayores problemas: Tiñendo con *Life and Dead Violin*, incubando con Fc block y luego con el mix de anticuerpos y conservando las muestras en 300 μ l de PBS 4 % paraformaldehído para el día siguiente.

Durante el análisis FACS, gracias al gran número de células usadas, se consiguieron obtener los 10.000 eventos correspondientes a células individuales en todos los tubos, a excepción de los blancos, dónde no es necesario. Pero por un error, no se analizó el tubo con el mix 2 de la muestra A activado solo con LPS bacteriano. Usando el programa FlowJo, se seleccionaron las MFIs de APC y PE de los eventos correspondientes a células individuales vivas, siguiendo el mismo procedimiento que el experimento 3. Al guardar los datos en formato .CSV, se observó que los valores MFI para el mix 2 de la muestra C activada solo con LPS bacteriano eran excesivamente elevados respecto a los otros MFIs del mix 2. Se descartó considerándose un error, al tener unos valores tan alejados del resto.

Junto al tubo de la muestra A no medido, y para que el t test se siguiera pudiendo efectuar, se sustituyeron los valores de ambas muestras (A y C) con los valores del mix 2 de la muestra B activada solo con LPS bacteriano. Se copiaron también los valores de las muestras sin GCV o LPS en la concentración ficticia “_” para evitar la obstrucción del t test por el título del boxplot, como en los anteriores. Este fue el estado en el que se usaron los datos para generar un boxplot por cada anticuerpo con todas las muestras (Figura 14). El t test de las muestras, en este caso, compara las poblaciones tratadas con LPS bacteriano respecto a las poblaciones con la misma concentración de GCV pero sin LPS. Permitiendo comparar, para una misma dosis de GCV, cuánto cambia la expresión de los marcadores de superficie al ser activadas con GCV, y ver cómo cambia respecto a la concentración de este.

Estos resultados indican primeramente, que se ha dado una correcta diferenciación. Comparando los niveles de CD1a con los de CD14. Incluyendo las concentraciones con 120 μM de GCV, que pertenecen a la placa que recibió el golpe durante su siembra. Parece ser que la densidad celular resultante del accidente siguió siendo suficiente para diferenciarse en DCs con las citoquinas administradas. Aunque los niveles de CD1a sean más bajos que el resto de placas. Por lo que tal vez no todas se hayan diferenciado correctamente, y parte de la población sean monocitos o un estado intermedio.

También es curioso que se observen niveles de CD1a mayores en los cultivos sin LPS bacteriano. Aunque su diferencia no sea muy grande, su consistencia en todos los casos sugiere que podría ser causado por el LPS bacteriano.

Confirmando de forma mucho más radical lo que ya se veía en el experimento anterior, CD86 es el marcador de superficie usado con la mayor diferencia de abundancia en las DCs según su estado de activación. CD80 también permite ver esta distinción, pero de forma no tan clara, ya que hay una menor diferencia entre las MFIs de ambos casos. Comparando los t tests de las diferentes concentraciones de GCV, para los casos de CD80 y CD86, se puede observar un ligero descenso de los valores obtenidos conforme aumentan los niveles de GCV. Indicando que este podría ser capaz de aumentar la potencia de la respuesta inmune, al crear mayores diferencias entre poblaciones activadas, y no activadas. La excepción sería el caso con 80 μM de GCV para CD80. Aunque esto se puede deber que uno de los puntos sea inusualmente bajo (el de la muestra C) o alto (el de la muestra B), en relación al resto de puntos en el grupo, para el caso con y sin LPS, respectivamente.

Tratamiento con GCV con y sin LPS

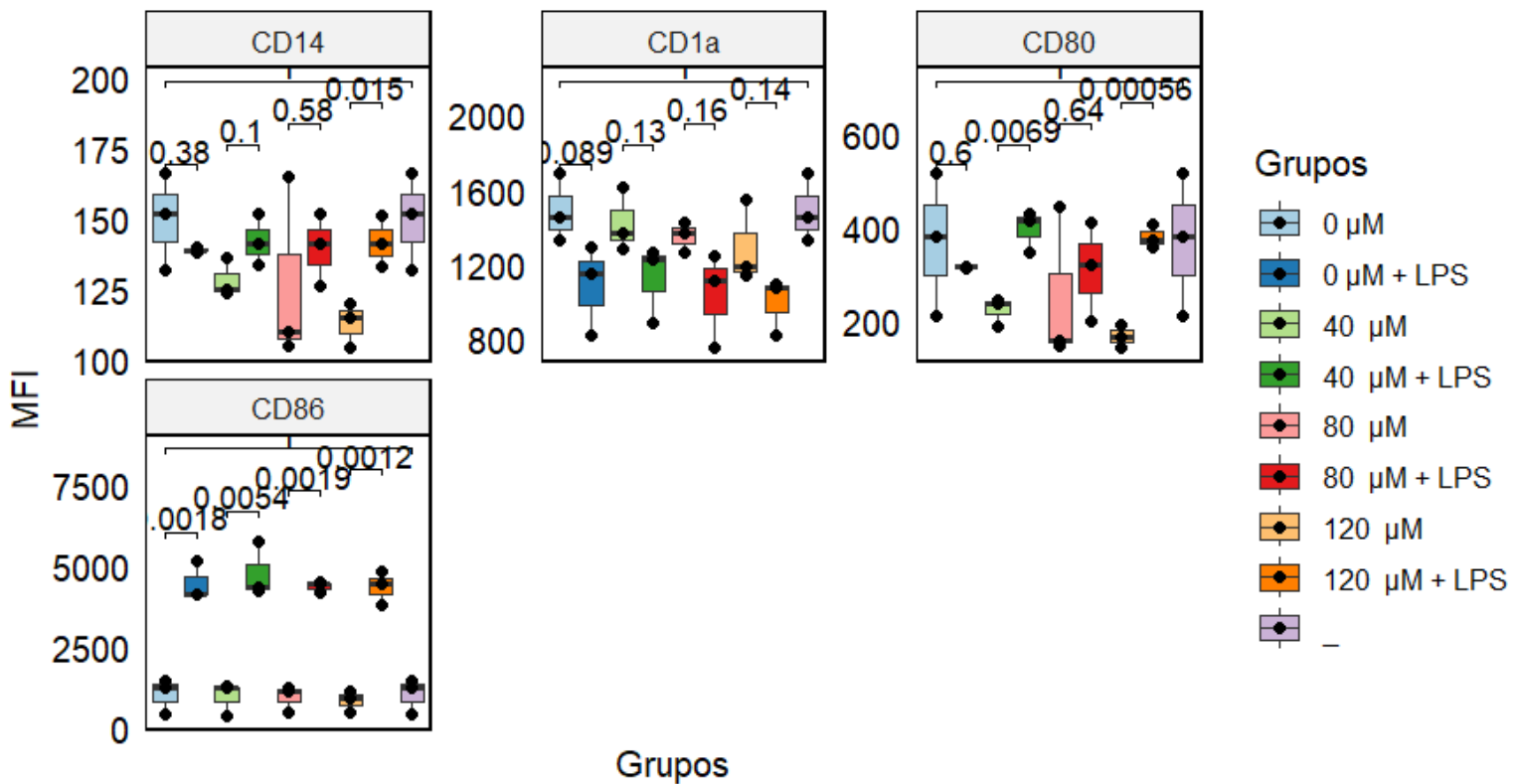


Figura 14: Boxplots del FACS de muestras con GCV y con y sin LPS. La media de las MIFs de las tres muestras es usada en el t test para valorar cómo de similares son, para cada concentración de GCV, la versión con y sin LPS bacteriano. Permitiendo valorar cómo este influye en el cambio. Imagen creada utilizando R studio para programarla en R.

Las considerables diferencias entre las muestras con y sin LPS bacteriano dificultan comparar apropiadamente las diferentes concentraciones de GCV entre miembros del mismo macrogrupo (con y sin LPS). Para mejorarlo, se puede cambiar, en el Excel usado como base para los boxplots, el nombre de los anticuerpos según si la muestra asociada tuviera o no LPS bacteriano (por ejemplo, agregando un “+” a los que lo tuvieran). El t test también ha de cambiarse, comparando cada valor de GCV con su control. Usando el control apropiado en función de si ambos fueron activados o no con LPS bacteriano. La concentración ficticia ha de estar en ambos casos para que se vean bien todos los t tests. Esto lo que permite es separar los valores en boxplots diferentes en función de a qué categoría pertenecen (Figura 15).

Comparándolos con lo observado en los boxplots de las figuras anteriores (en los experimentos 2 y 3), algunas de las observaciones y especulaciones pueden reevaluarse con esta información extra. Para empezar, en los casos sin LPS bacteriano, no se observa el aumento progresivo de CD80 y CD86 conforme se aumenta la dosis de GCV, como pasaba en el experimento 2. El efecto se pudo observar con CD86 solo entre los 75 a 125 μM de CGV, rango en el que se encuentran los grupos de 80 y 120 μM , está última siendo de fiabilidad dudosa por el golpe que recibió su placa. Teniendo en cuenta lo ligero que era este, y que (a excepción de los pocillos de la placa golpeada) en esta prueba los niveles apenas varían, no se ha podido corroborar este efecto.

Para CD80, las MFIs son demasiado bajas, y demasiado similares, para poder corroborar o desmentir lo observado en experimentos anteriores.

Tratamiento con GCV con y sin LPS

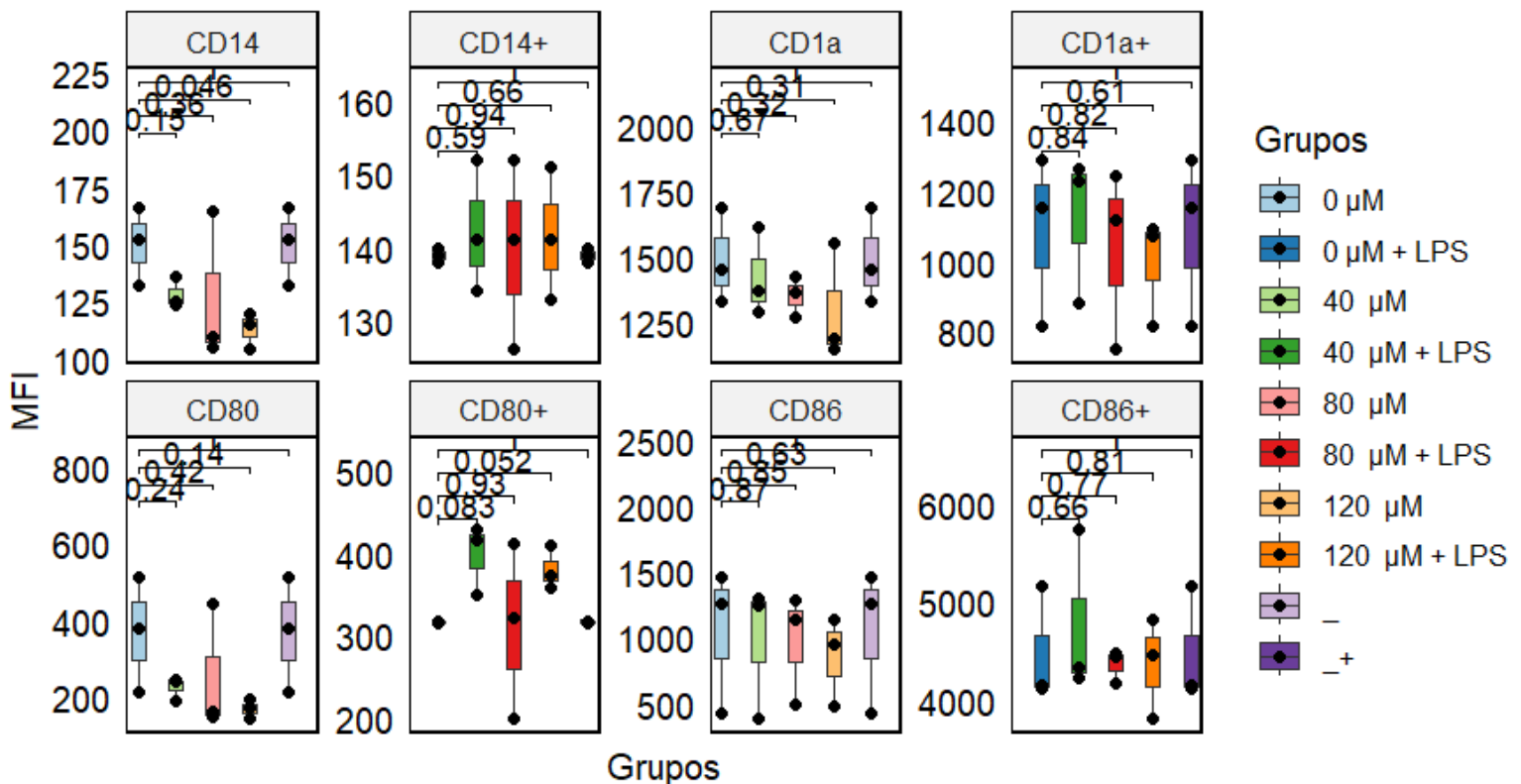


Figura 15: Boxplots con las muestras separadas en con y sin LPS. Usando boxplots diferentes según si esta condición es presente (+) o ausente (-). Con t tests que comparan la similitud de las muestras con el control. Creada con R studio para programar en R.

Para los casos activados con LPS, no obstante, las comparaciones son más esclarecedoras. Observándose en CD86 un aumento de los MFIs al aumentar la dosis de GCV, que, aunque es muy ligero, sigue un patrón similar al observado en el experimento 3. Sobre todo entre las concentraciones de 0 a 40 o 50 (según el experimento) μM de GCV. Pudiendo explicar el aumento de la intensidad de la respuesta inmune observado en la figura anterior. Aunque sería preferible tener muestras con 120 μM de GCV en mejor estado para tener datos más fiables. Además, se ha reforzado lo observado en el experimento 3, que el GCV junto al LPS bacteriano genera una activación más intensa que el LPS solo. Similarmente, se puede ver un aumento de CD80 al agregar GCV a la activación con LPS, observado también en el experimento anterior.

Aunque, al igual que en el experimento 3, la calidad de los datos no permite distinguir bien si este aumento es proporcional a la concentración de GCV usada, o a partir de un valor mínimo el aumento se estanca. También se pueden observar niveles similares de CD80 en ausencia de GCV tanto en las muestras con LPS bacteriano como en las muestras sin. Algo que también pasaba en el experimento 3, reforzando la solidez del fenómeno (aunque este no tenga nada que ver con el GCV). Aunque en ambos casos ha habido muestras descartadas (muestras con LPS bacteriano en este experimento, muestras sin en el anterior), Como en los experimentos anteriores, los datos obtenidos no permiten observar concentraciones de GCV con efectos antiinflamatorios.

Al día siguiente de la preparación de las muestras para el FACS, se descongeló el ml separado de cada muestra para la RT-qPCR. El millón de células (aprox.) presentes en este ya fue centrifugado y resuspendido en la solución homogeneizadora el día anterior. Al tener un total de 24 muestras, como la máquina Maxwell solo es capaz de trabajar con hasta 16 cartuchos a la vez, se extrajo el RNA en dos tandas. Aprovechando el tiempo que duró la segunda para cuantificar el RNA de la primera. A partir de los datos del análisis con el nanodrop, se calculó cuánto volumen se necesitaba para obtener suficiente cDNA, se engrasaron hasta los 12 μl , y se guardó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día siguiente.

Tras descongelarse, se le agregaron todos los componentes necesarios para la conversión y se sintetizó el cDNA. Este se analizó en la placa de 128 pocillos, usando SYBER Green junto con los *primers* apropiados. A partir de los datos obtenidos del análisis con la máquina Roche, usando la propia placa como referencia, hay que especificar el gen amplificado en cada pocillo (mediante un sistema de coordenadas en la placa). Generándose un archivo Excel (.xlsx), con el número de ciclos de replicación que han sido necesarios para sobrepasar el punto de cruce (Cp) en cada coordenada (pocillo). Una por una, los valores de Cp en cada coordenada han de asociarse a la muestra que estaba presente en ese pocillo.

Haciendo una media de los triplicados técnicos, excepto en aquellos casos en los que se hayan detectado errores o irregularidades, se obtuvieron los valores Cp de cada gen amplificado para cada muestra. Estos valores, sin embargo, requieren de una referencia cuya expresión se haya mantenido constante.

Ya que sus niveles son proporcionales a la cantidad de células de partida, lo que genera valores diferencias entre las diferentes muestras ajenas al tratamiento. Para cada muestra, el Cp del gen housekeeping usado (RPL-38), ha de ser restado del valor de los demás genes. Obteniendo así el ΔCp , que indica si la expresión del gen es superior ($\Delta\text{Cp}>0$) o inferior ($\Delta\text{Cp}<0$) al gen de referencia. Aunque este resultado por sí solo únicamente relaciona el gen a analizar con el gen de referencia de esa misma muestra.

Para poder comparar la expresión del con el resto de muestras, se partió de una muestra de control, en este caso las muestras sin GCV. El ΔCp de cada gen del control le fue restado al ΔCp del resto de muestras, obteniendo $\Delta\Delta\text{Cp}$. Para luego calcular $2^{-(\Delta\Delta\text{Cp})}$, y así poder observar cómo difiere la expresión de la muestra tratada con CGV respecto al control. Presentando las muestras un valor superior a 1 si la expresión del gen ha aumentado, o presentando un valor mayor que 0 y menor que 1 si ha disminuido. Esto se hizo por separado para cada muestra biológica, y dentro de cada una de estas, se separó también en función de si habían sido tratadas o no con LPS bacteriano. En este estado, los datos se ordenaron en un Excel, y se generó un boxplot con cada gen para poder comparar las diferentes dosis de GCV (Figura 16). También se realizó un t test, comparando las muestras con el control (cuyo $2^{-(\Delta\Delta\text{Cp})}=1$). Para lo fue necesario agregar un grupo extra para evitar solapamientos con el título.

Observando las muestras no activadas con LPS bacteriano, ninguno de los cuatro genes analizados presenta cambios en su expresión remarcables. Ya que la expresión de estos es casi la misma con y sin GCV. El caso con el mayor aumento siendo el gen NF κ B con 80 μ M de GCV, pero hasta su punto más alto ni siquiera aumenta 1,5 veces (que además difiere mucho de los otros 2 puntos). Y todos los puntos en el grupo de 120 μ M que son tan anormalmente bajos provienen de la misma muestra biológica (la muestra C). Que presenta genes (excepto RPL38) con Cps anormalmente altos respecto el resto de muestras en los tres replicados técnicos. Por lo que la anomalía se origina en la placa de cultivo.

Si por el contrario se observan las muestras que fueron activadas con LPS bacteriano, sí que es posible identificar genes cuya expresión ha aumentado de forma sustancial al agregar GCV. Siendo estos TNF α y IL-10.

Mientras que los niveles de NF κ B y IL6, genes que en un principio son proinflamatorios, se han mantenido en todas las concentraciones de GCV, careciendo este de influencia sobre ellos.

El aumento observado en los otros dos genes parece ser proporcional a la concentración de GCV agregada, por lo menos hasta los 80 μ M. Al pasar a los 120 μ M, la bajada de expresión, al ocurrir de manera similar en más de una de las muestras biológicas, se puede interpretar como un posible efecto antiinflamatorio del GCV.

Aunque estos datos, al provenir de la placa golpeada, cabe la posibilidad de que el GCV se haya diluido de más, al haberse transferido parte del volumen de las placas no activadas con LPS bacteriano en el impacto.

Pero es poco probable, ya que debería haber pasado en los tres pocillos de forma similar. Y la transferencia de volumen tampoco fue muy exagerada, ya que al recoger las muestras pipeteando, no se observaron diferencias en el volumen que justificaran diluciones del GCV más de un 10-20 % superiores al resto de placas (100-200 μ l de diferencia con las muestras de otras placas como mucho).

Efectos del GCV en la metagenómica

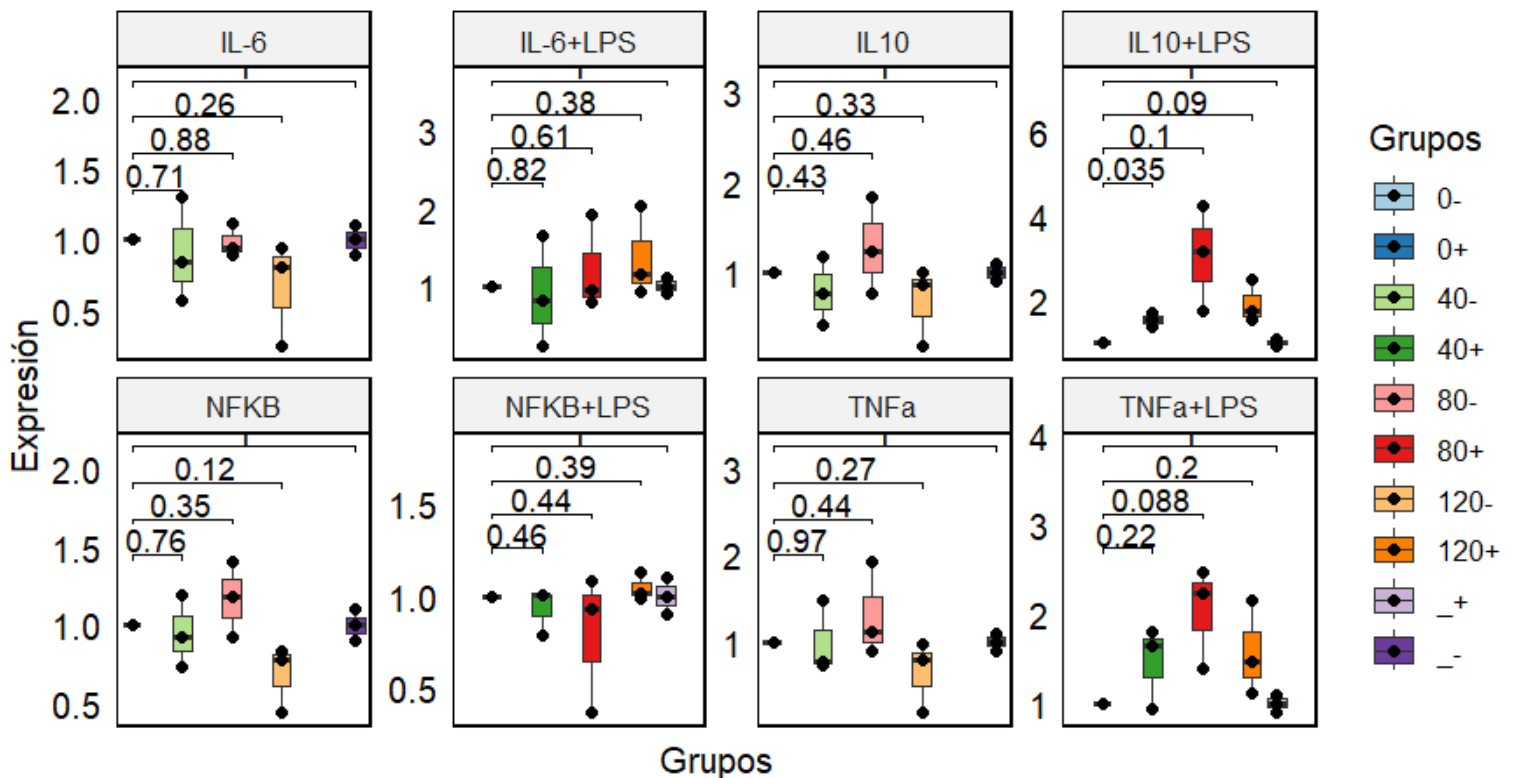


Figura 16: Boxplots de los cambios en la expresión génica. Separados por gen y presencia o ausencia de LPS bacteriano. Acompañados de un t test que mide su similitud con las muestras sin GCV. Imagen creada con R studio para crearla con R.

TNFa, al ser un gen inflamatorio, su aumento implica una potenciación de la respuesta inmune. IL-10, por el contrario, es un gen antiinflamatorio, que inhibe o limita varios procesos de la inflamación. Por lo que un aumento simultáneo de ambos puede parecer que no tiene sentido, puesto que presentan efectos opuestos. No obstante, es importante diferenciar entre la expresión de un gen, la síntesis de las proteínas que codifica, y la liberación de estas al medio. En DCs sanas, el recibir un estímulo de activación (como sería el LPS bacteriano), induce a la síntesis y secreción de TNFa. Que promueve la inflamación (junto a otros compuestos). Posteriormente a su actuación, IL-10 es liberado, para contrarrestar y balancear las señales proinflamatorias, evitando una reacción excesiva. Siendo el aumento del propio TNFa el inductor de IL-10.

Por lo que aunque haya un aumento de ambos, lo que en realidad está ocurriendo es un aumento de la intensidad de la respuesta inmune. Siendo el aumento de IL-10 la respuesta del sistema (la célula) para estabilizarse frente al estímulo (activación), al haber sido este potenciado en el experimento con GCV.

Estas comparaciones han permitido observar los efectos del GCV sobre los genes estudiados. Así que por último, para constatar en este caso los efectos del LPS bacteriano sobre estos genes, se ha recalculado el $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$ de las muestras activadas con este. Usando esta vez, en vez del control, la muestra con la misma concentración de GCV, pero sin LPS bacteriano. Estos valores, reorganizados en un Excel, han sido usados para crear un heatmap que permita observar los cambios en la expresión de los genes (Figura 17). Al ser difícil distinguir entre la intensidad del color de la mayoría de los valores, ya que estos son muy variados entre sí, se han usado dos escalas de color distintas:

El color del valor, que representa si su expresión ha aumentado (valor>1) o disminuido (valor<1). Y el color de fondo, cuya intensidad indica cuánto ha aumentado o disminuido respecto al resto de genes en esa muestra.

Observando el patrón de proporciones que se repite en casi todas las muestras, se puede concluir que la activación ha sido exitosa. Ya que genes cuyo fenotipo se asocia a la inflamación, como NFkB, TNFa y sobre todo IL-6 han visto su expresión aumentada varias veces como consecuencia del LPS bacteriano.

Por el contrario, IL-10, la citoquina antiinflamatoria, se ha visto altamente reducida. Extrapolando al funcionamiento del sistema inmune, sus relativamente altos niveles iniciales pueden interpretarse como un seguro, siendo IL-10 temporalmente inhibido al detectarse una infección en el organismo, permitiendo así que sea eliminado.

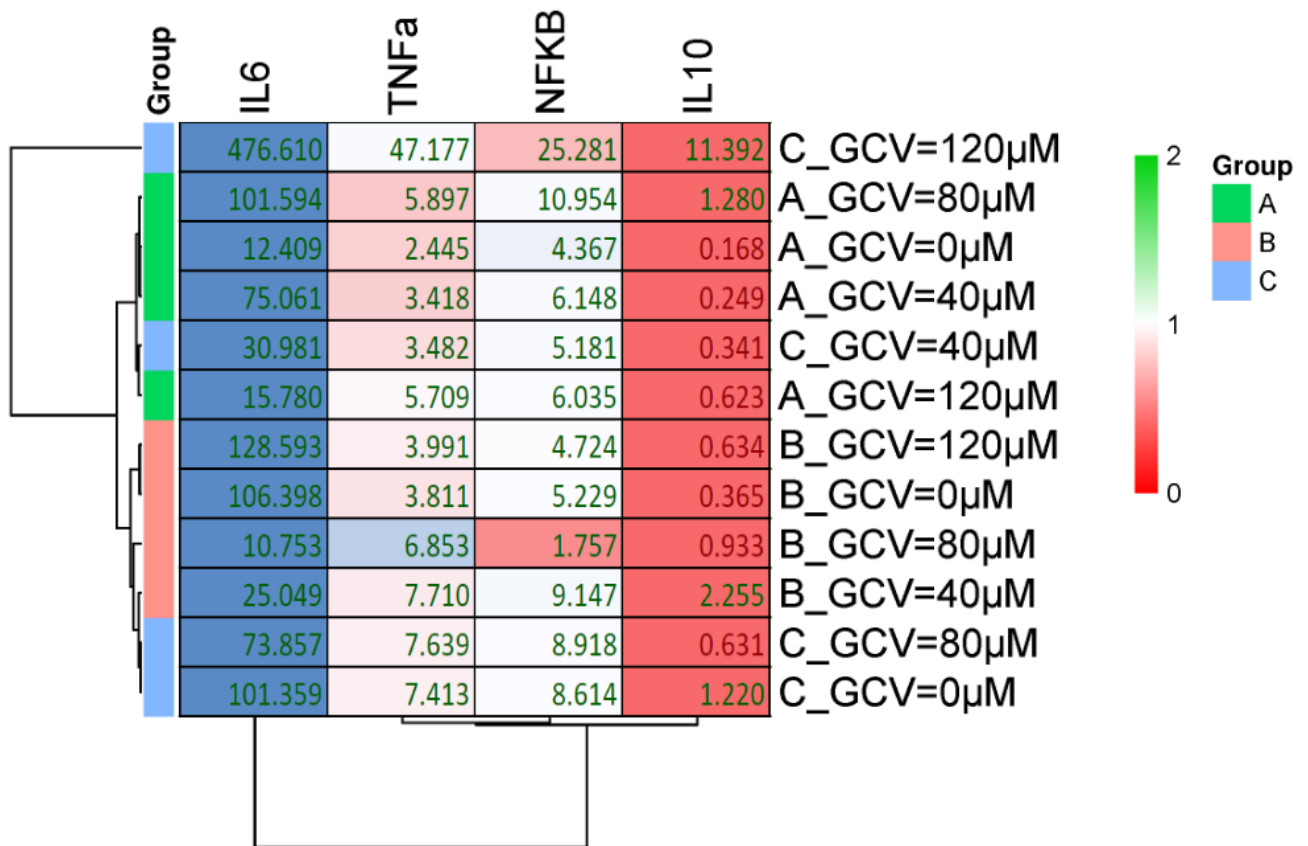


Figura 17: Heatmap del cambio en la expresión de los genes por LPS. Para cada concentración de GCV de cada muestra. Si esta aumenta, el color del valor es verde, y si disminuye, es rojo. Cuanto más intenso es el color de fondo, más se aleja de la media. Siendo de color azul si es superior, o de color rojo si es inferior. De creación propia usando Excel y la web de análisis y visualización de datos SRplot. Disponible en: <https://www.bioinformatics.com.cn/en>

La agrupación de las muestras en el heatmap permite distinguir, aunque no a la perfección, una agrupación de estas basada en el origen biológico, antes que en las concentraciones de GCV, por ejemplo. Siendo la variabilidad biológica bastante severa. También, al comparar muestras de pocillos diferentes, un aumento notorio, como en la muestra C con 120 μM, puede no deberse a altos niveles en el pocillo con LPS bacteriano, sino a niveles anormalmente bajos en el pocillo sin (como se pudo ver en el boxplot de IL-6 de la figura 16).

- Conclusiones

A pesar de los problemas que han ido surgiendo durante la realización de los experimentos, suficiente información ha podido ser reunida para poder evaluar los efectos del GCV sobre las células dendríticas humanas.

Las concentraciones de GCV usadas por sí solas no fueron capaces de generar una señal de activación suficientemente potente. No generando cambios en la expresión de los genes analizados. Tampoco fueron capaces de generar cambios suficientemente relevantes en la abundancia de los marcadores de superficie estudiados.

No obstante, en presencia de otras moléculas capaces de activar la ruta de señalización cGAS-STING, en este caso LPS bacteriano, se pudieron observar efectos remarcables derivados de la presencia del GCV. Como lo es un aumento significativo de los marcadores de superficie encargados de la activación de linfocitos, lo que ayuda al desarrollo de una respuesta inmune más robusta. Aunque no se pudo observar el efecto contrario. Tampoco se pudieron determinar ni las concentraciones mínimas ni óptimas de GCV, o hasta que punto sus efectos escalan con su concentración. Sería interesante si en futuras investigaciones se confirmara que este aumento en los marcadores de superficie causados por el GCV se traduce en una mejor activación de los linfocitos.

A nivel de la expresión génica, por el contrario, sí se pudieron detectar concentraciones con efectos tanto estimuladoras de la inflamación, como con efectos atenuadores de su intensidad. Aunque estos niveles atenuados siguen presentando un aumento respecto a la ausencia de GCV. Es posible que se requieran dosis superiores para observar un efecto verdaderamente antiinflamatorio. No se pudo determinar el punto de inflexión entre ambos efectos, pero se pudo acotar a concentraciones de entre 80 y 120 μM de GCV.

Aunque no formara parte de los objetivos iniciales, este trabajo también ha servido para evaluar la activación de las DCs mediante el uso de LPS bacteriano. Habiendo podido evaluar la severidad de los cambios en los patrones de expresión génica y en la abundancia proteica que este es capaz de inducir en las células usadas (más concretamente, en los genes y marcadores de superficie que se decidieron estudiar).

En resumen, con todo lo observado anteriormente, se puede afirmar que Ganciclovir es capaz de ejercer influencia sobre la intensidad de respuesta inmune, alterando el comportamiento de las células dendríticas. Aunque futuras investigaciones serán requeridas para evaluar mejor su espectro de concentraciones y grado de influencia. Así como si estos cambios són lo suficientemente relevantes para justificar un uso alternativo de este medicamento.

- **Autoevaluación**

Realizar este trabajo me ha permitido experimentar los diferentes aspectos involucrados en la realización de una investigación científica. Aprendiendo la relevancia a nivel laboral de varias de las aptitudes que se nos han estado exigiendo durante la carrera, así como otras que no suelen recibir tanta atención. Como las capacidades organizativas o la optimización de las pruebas.

Originalmente, mi objetivo era estudiar en mayor profundidad este fenómeno, pero en dos meses de prácticas externas no hubo tiempo suficiente. Aunque la experiencia me sirvió para hacerme una idea general del tiempo y recursos que se han de dedicar a investigaciones más complejas, como las realizadas en artículos científicos publicados.

Con respecto a aspectos que podrían mejorarse, en vez de analizar la expresión de genes asociados a la inflamación, como TNFa, tal vez habría sido preferible analizar genes codificantes de Interferón tipo 1. Ya que aunque ambos se asocian a la inflamación, el interferón tipo 1 es generado específicamente por la activación de

STING, lo que permitiría confirmar que la inmunomodulación con GCV es efectivamente mediante esta ruta.

Por otro lado, se podría haber estudiado el cambio en las concentraciones de las proteínas codificadas por los genes asociados a la inflamación, en vez de solamente el cambio en el RNAm. Se intentó durante las prácticas realizar una ELISA del TNFa en el sobrenadante, pero salió mal y por limitaciones de tiempo no se pudo repetir.

- **Bibliografía y webgrafía**

(1): Morante-Palacios O, Fondelli F, Ballestar E, Martínez-Cáceres EM. Tolerogenic Dendritic Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases. Trends Immunol. 2021 Jan;42(1):59-75. doi: 10.1016/j.it.2020.11.001.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33293219/>

(2): Vento-Tormo R, Company C, Rodríguez-Ubreva J, de la Rica L, Urquiza JM, Javierre BM, Sabarinathan R, Luque A, Esteller M, Aran JM, Álvarez-Errico D, Ballestar E. IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation. Genome Biol. 2016 Jan 13;17:4. doi:

10.1186/s13059-015-0863-2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26758199/>

(3): Dendritic Cell Overview. Thermo Fisher Scientific-US.

<https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/immunology-at-work/dendritic-cell-overview.html> [Consultada 30/8/2023]

Fuente de la Figura 1

(4): Cunha P, Gilbert FB, Bodin J, Godry L, Germon P, Holbert S, Martins RP. Simplified Approaches for the Production of Monocyte-Derived Dendritic Cells and Study of Antigen Presentation in Bovine. Front Vet Sci. 2022 Jun 9;9:891893. doi:

10.3389/fvets.2022.891893. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35754538/>

(5): Gong LK, Yang X, Yang J, Wu S, Chen Y, Zhang JT, Wang ZH, Chen LH, Xing C, Liu T. Low-dose ganciclovir ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis through inhibiting macrophage STING activation in mice. *Front Pharmacol*. 2022 Nov 17;13:1020670. doi: 10.3389/fphar.2022.1020670.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36467059/>

(6): Young PG, Rubin J, Angarone M, Flaherty J, Penugonda S, Stosor V, Ison MG. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: a single-center retrospective cohort study. *Transpl Infect Dis*. 2016 Jun;18(3):390-5. doi: 10.1111/tid.12537. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27037651/>

Fuente de la Figura 2

(7): Cunningham C, Gatherer D, Hilfrich B, Baluchova K, Dargan DJ, Thomson M, Griffiths PD, Wilkinson GW, Schulz TF, Davison AJ. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J Gen Virol*. 2010 Mar;91(Pt 3):605-15. doi: 10.1099/vir.0.015891-0.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36467059/>

(8): Lu D, Shang G, Li J, Lu Y, Bai XC, Zhang X. Activation of STING by targeting a pocket in the transmembrane domain. *Nature*. 2022 Apr;604(7906):557-562. doi: 10.1038/s41586-022-04559-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35388221/>

(9): Liu N, Pang X, Zhang H, Ji P. The cGAS-STING Pathway in Bacterial Infection and Bacterial Immunity. *Front Immunol*. 2022 Jan 13;12:814709. doi: 10.3389/fimmu.2021.814709. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35388221/>

(10): Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):1151-64. doi: 10.1172/JCI37223. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20237412/>

(11): Vatner RE, Janssen EM. STING, DCs and the link between innate and adaptive tumor immunity. *Mol Immunol*. 2019 Jun;110:13-23. doi: 10.1016/j.molimm.2017.12.001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29273394/>

(12): Thim-Uam A, Prabakaran T, Tansakul M, Makjaroen J, Wongkongkathep P, Chantaravisoot N, Saethang T, Leelahavanichkul A, Benjachat T, Paludan S, Pisitkun T, Pisitkun P. STING Mediates Lupus via the Activation of Conventional Dendritic Cell Maturation and Plasmacytoid Dendritic Cell Differentiation. *iScience*. 2020 Sep 4;23(9):101530. doi: 10.1016/j.isci.2020.101530.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33083760/>

(13): Wang Y, Zhang X, Guo Y, Li X, Guo G, Niu Z, Zhang J. Type 1 interferon aggravates lipopolysaccharide-induced sepsis through upregulating Caspase-11 and Gasdermin D. *J Physiol Biochem*. 2021 Feb;77(1):85-92. doi:

10.1007/s13105-021-00785-1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33083760/>

(14): Lieberman JA. Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic. *CNS Drugs*. 2004;18(4):251-67. doi: 10.2165/00023210-200418040-00005.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15015905/>

(15): National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 135398740, Ganciclovir.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ganciclovir> [Consultada 30/8/2023].

Fuente de la Figura 4a

(16): National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 135471108, Cgamp.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cgamp> [Consultada 30/8/2023]

Fuente de la Figura 4b

(17): Pang ES, Daraj G, Balka KR, De Nardo D, Macri C, Hochrein H, Masterman KA, Tan PS, Shoppee A, Magill Z, Jahan N, Bafit M, Zhan Y, Kile BT, Lawlor KE, Radford KJ, Wright MD, O'Keeffe M. Discordance in STING-Induced Activation and Cell Death Between Mouse and Human Dendritic Cell Populations. *Front Immunol*. 2022 Feb 25;13:794776. doi: 10.3389/fimmu.2022.794776.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35281062/>

(18): George S, Georgouli M, Sanz-Moreno V. Protocol to drive human monocyte-to-macrophage polarization in vitro using tumor conditioned media. STAR Protoc. 2022 Dec 16;3(4):101666. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101666.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36125932/>

Fuente de la Figura 5

(19): Overview of Flow Cytometry. Cell Signaling Technology.

https://www.cellsignal.com/applications/flow-cytometry/flow-cytometry-overview?_requestid=13772 [Consultada 30/8/2023]

Fuente de la Figura 6

(20): Maxwell® RSC Instrument. Extracción Automatizada de ADN o ARN con cuantificación integrada. Promega.com.

<https://www.promega.es/products/lab-automation/automated-dna-rna-extraction-purification-maxwell/maxwell-rsc-instrument/?catNum=AS4500> [Consultada 30/8/2023]

Fuente de la Figura 7

- **Anexos**

Debido al volumen de datos obtenidos durante la parte experimental, y para no agregar demasiado volumen extra a las versiones físicas de este trabajo, el siguiente enlace redirige a una carpeta de Google Drive abierta a la visualización de terceros. Esta contiene los resultados sin procesar, o “brutos”, de los experimentos realizados. Con 3 carpetas, en las que cada una contiene los archivos .fsc resultantes de la prueba FACS de los experimentos 2, 3 y 4. Y un Excel con los resultados de la RT-qPCR del experimento 4.

<https://drive.google.com/drive/folders/1WSAO5Wu7I3qbL98fkRuCDfhdtOk1AZLr?usp=sharing>