

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA



**Estudio del perfil inflamatorio de
macrófagos peritoneales de pacientes con
cirrosis y ascitis. Posibles dianas
terapéuticas.**

Memoria presentada por la Licenciada de Grado

D^a Ana Tapia Abellán

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia

(Tesis Doctoral con Mención Doctor Internacional)

Murcia Octubre 2013



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular (B) e Inmunología.
Campus de Espinardo, 30100 Murcia. Tlf: 868883960. Fax: 868888601

Doña **María Concepción Martínez-Esparza Alvargonzález**,
Profesora Titular de Universidad del Área de Inmunología en el
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular (B) e Inmunología,

AUTORIZA

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Estudio del perfil inflamatorio de macrófagos peritoneales de pacientes con cirrosis y ascitis. Posibles dianas terapéuticas”**, realizada por Doña Ana Tapia Abellán bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular (B) e Inmunología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia, con Mención Doctor Internacional.

En Murcia, a 10 de Octubre de 2013

Fdo. María Concepción Martínez-Esparza Alvargonzález



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular (B) e Inmunología.
Campus de Espinardo, 30100 Murcia. Tlf: 868883960. Fax: 868888601

Don **José Ángel Martínez Menárguez**, Catedrático de Universidad del Área de Biología Celular y Presidente de la comisión Académica del Programa de doctorado “Integración y modulación de señales en Biomedicina de la Facultad de Medicina,

INFORMA

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Estudio del perfil inflamatorio de macrófagos peritoneales de pacientes con cirrosis y ascitis. Posibles dianas terapéuticas”**, ha sido realizada por Doña Ana Tapia Abellán bajo la dirección de la Profesora Titular Doña María Concepción Martínez-Esparza Alvargonzález, y que la Comisión Académica que presido ha dado conformidad unánime para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 11 de Octubre de 2013



Fdo. José Ángel Martínez Menárguez

Ana Tapia Abellán ha disfrutado de una beca del
Programa de Formación de Personal Investigador de la
Fundación Séneca (2009-2013)

El trabajo experimental expuesto en la presente Memoria ha sido
subvencionado con cargo a los proyectos PI060006 del Instituto
de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo y
11926-PI-09 de la Fundación Séneca, de la Comunidad
Autónoma de la Región de Murcia

Algunos de los resultados expuestos en esta Memoria han dado lugar a los siguientes artículos:

- Ruiz-Alcaraz AJ, Martínez-Esparza M, Cano R, Hernández-Caselles T, Recarti C, Llanos L, Zapater P, **Tapia-Abellán A**, Martín-Orozco E, Pérez-Mateo M, Such J, García-Penarrubia P, Frances R. Peritoneal macrophage priming in cirrhosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion. *Eur J Clin Invest* 2011; 41(1): 8-15.
- **Tapia-Abellán A**, Martínez-Esparza M, Ruiz-Alcaraz AJ, Hernández-Caselles T, Martínez-Pascual C, Miras-López M, Such J, Frances R, García-Penarrubia P. The peritoneal macrophage inflammatory profile in cirrhosis depends on the alcoholic or hepatitis C viral etiology and is related to ERK phosphorylation. *BMC Immunol* 2012; 13(1): 42.
- **Tapia-Abellán A**, Ruiz-Alcaraz AJ, Hernández-Caselles T, Such J, Francés R, García-Peñarrubia P, Martínez-Esparza M. Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients. *Liver Int.* 2013 Apr; 33 (4): 552-60.
- **Tapia-Abellán A**, Ruiz-Alcaraz AJ, Antón G, Miras-López M, Francés R, Such J, Martínez-Esparza M, García-Peñarrubia P. Regulatory role of PI3K-Akt on the release of IL-1 β in peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients *Liver Int.* 2013 (En revisión).

Algunos de los resultados expuestos en esta Memoria han dado lugar a las siguientes comunicaciones a congresos:

Autores: **Ana Tapia-Abellán**, Antonio J. Ruiz-Alcaraz, M^a Dolores Fernández-Fernández, Pilar García-Peñarrubia and María Martínez-Esparza.

Título: Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the LPS and *Candida albicans*-induced cytokine release of peritoneal macrophages from ascites of cirrhotic patients.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: MED-SOUK: Congreso Internacional de Jóvenes Investigadores del Mediterráneo.

Lugar de celebración y año: Murcia, 23-25 Octubre 2013.

Autores: **Tapia-Abellán, A.**, Fernández-F, M.D., Rodríguez- Alcázar, J.F., Ruiz-Alcaraz, A., Argüelles, J.C, García-Peñarrubia, P., Martínez-Esparza, M.

Título: Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the Candida albicans-induced cytokine release of human monocyte derived macrophages.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Celular.

Lugar de celebración y año: Madrid, 3-6 Septiembre 2013.

Autores: M^a Dolores Fernández-Fernández, **Ana Tapia-Abellán**, Juan Francisco Rodríguez-Alcázar, Antonio José Ruíz-Alcaraz, Pilar García-Peñarrubia and María Martínez-Esparza-Alvargonzález

Título: Study of LAIR-1 expression on human macrophages and its potential role in hepatic cirrhosis development.

Tipo de participación: Oral

Congreso: II Jornadas de Inicio a la Investigación de la Facultad de Biología.

Lugar de celebración y año: Murcia, 11-12 Abril 2013.

Autores: **Ana Tapia-Abellán**, María Martínez-Esparza, Antonio J. Ruiz-Alcaraz, M^a Dolores Fernández-Fernández, Juan Francisco Rodríguez-Alcázar y Pilar García-Peñarrubia.

Título: El patrón de producción de citocinas proinflamatorias en el líquido ascítico de pacientes con cirrosis está relacionado con la etiología viral (VHC) o alcohólica

Tipo de participación: Oral

Congreso: II Jornadas de Inicio a la Investigación de la Facultad de Biología.

Lugar de celebración y año: Murcia, 11-12 Abril 2013.

Autores: **Ana Tapia-Abellán**, Antonio J. Ruiz-Alcaraz, Trinidad Hernández-Caselles, Rubén Francés, Pilar García-Peñarrubia y María Martínez-Esparza.

Título: Role of Mitogen Activated Protein Kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from ascites of cirrhotic patients.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: European Congress of Immunology

Lugar de celebración y año: Glasgow, Escocia 5-8 Julio 2012.

Autores: **Ana Tapia-Abellán**, María Martínez-Esparza, Antonio J. Ruiz-Alcaraz, Trinidad Hernández-Caselles, Cristina Martínez-Pascual, Manuel Miras-López, José Such, Rubén Francés y Pilar García-Peñarrubia

Título: Peritoneal macrophage inflammatory profile in cirrhosis is dependent on the alcoholic or hepatitis C viral etiology and is related to ERK phosphorylation level.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: European Congress of Immunology

Lugar de celebración y año: Glasgow, Escocia 5-8 Julio 2012.

Autores: Ruiz-Alcaraz AJ, Martínez-Esparza M, Caño R, Hernández-Caselles T, Recarti C, Llanos L, Zapater P, **Tapia-Abellán A**, Martín-Orozco E, Pérez-Mateo M, Such J, García-Peñarrubia P, Francés R.

Título: “Peritoneal macrophage priming in cirrosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion”.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Barcelona Biomed Conference. IRB Barcelona (Institute for Research in Biomedicine).

Lugar de celebración y año: Barcelona, del 25-27 de Octubre 2010

Autores: **A.Tapia-Abellán**, R. Sánchez-Fresneda, J.C. Argüelles, P. García-Peñarrubia, M. Martínez-Esparza.

Título: “Comparative study of HL-60, U937 and THP-1 monocytic human cell lines.”

Congreso: Barcelona Biomed Conference. IRB Barcelona (Institute for Research in Biomedicine).

Lugar de celebración y año: Barcelona, del 25-27 de Octubre 2010.

Autores: **A.Tapia-Abellán**, R. Sánchez-Fresneda, J.C. Argüelles, P. García-Peñarrubia, M. Martínez-Esparza.

Título: “Estudio de la interacción de la líneas celulares humanas de macrófagos con *Candida albicans* y *parapsilosis*”.

Tipo de participación: Póster

Congreso: III Congreso de Microbiología Clínica

Lugar de celebración y año: Ávila, del 8-10 Julio del 2010.

Autores: **Tapia-Abellán A**, Ruiz-Alcaraz AJ, Hernández-Caselles T, Such J, Francés R, García-Peñarrubia P, Martínez-Esparza M.

Título: “Study of inflammatory response in macrophages obtained from ascites fluid”.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: XIII Congress of the SEBC (Spanish Society for Cell Biology)

Lugar de celebración y año: Murcia, del 16-18 Diciembre 2009.

AGRADECIMIENTOS

No quisiera terminar esta Tesis sin agradecer a todas las personas que me han ayudado, de una forma u otra, a hacer que esto sea posible.

A mi Directora de Tesis María, por su incansable ayuda, por haberme enseñado todo lo que sé y por ser mi incondicional. Gracias de corazón por ser así, te mereces todo y mucho más y espero estar a tu lado para verlo. A tí, mi amiga, mi jefa y mi compañera.

A Pilar, fuente de sabiduría de este grupo, por tu ayuda día tras día y por motivarme a que las ganas de investigar y de aprender cosas nuevas no mueran nunca.

A mi Antoñero, mi compañero y amigo. Gracias por haber estado ahí todos los días, por escucharme y ayudarme siempre, por enseñarme con paciencia, y por ser como eres, no cambies nunca.

A todos mis compañeros de Inmunología con los que he compartido tanto estos años, Miriam (no sabes lo mucho que te he echado de menos, pero lo feliz que soy de que te vaya genial) David (ya hecho todo un doctor), a Chiara (una luchadora y una de las personas más inteligentes que conozco) a Trini, Elena, Gonzalo y Pedro.

A los compis de Bioquímica, que son lo mejor del mundo: Martica (mucho ánimo con tu inminente Tesis, tu puedes con eso y más porque eres una máquina y creételo ya!), Ana Lamber (que desde que llegó llenó de alegría este laboratorio), Ana Belén (que siempre estás ahí, eres genial), a Brunete (sé que llegarás muy lejos en la ciencia y que sepas que eres un encanto de hombre aunque a veces te pongas en modo escucha..), a Conchi (gracias por aquella charla...), a Andrés (por ayudarme tanto al principio), y a los demás profesores del área. Aquí también me gustaría incluir a Paco y Fernando que siempre han estado cuando les he necesitado.

Al Dr. Thierry Jouault por haberme aceptado en su laboratorio de Lille y aguantarme 3 largos meses. Muchas gracias por permitirme vivir esa experiencia. Cómo no, a mi Audrey, que estuvo a mi lado todo el tiempo que estuve allí, animándome y cuidándome, gracias de corazón.

A Paco y todo su equipo de Terapia Génica del Genyo: Miguel, Karim, Ángelica, Per y Pili; qué gran familia formáis, sois un equipo de trabajo envidiable y unos grandes

compañeros. Gracias por todo lo que me enseñasteis con los lentivirus y por haberme hecho muy feliz el mes que estuve con vosotros.

A los profesionales del SACE: Juana, Toñi y Pepe por haberme enseñado tanto de citometría y a César del CAID por su ayuda con la PCR cuantitativa.

A mis amig@s de la uni, que me habéis dado los mejores años de estudiante y os deseo todo lo mejor del mundo y que consigáis llegar donde queráis, en especial a María “de Bullas” y a Nico.

A mis amigas por ser las mejores, las más guapas, las más simpáticas y las más de todo: Marina, Lucía, Paula, Esther, María, Marta, la Roji, Carmen y Mavi. También a mis amiguicos más recientes que no por conocerlos menos tiempo son menos importantes: Estela, Lolica, Gala y Juanito (que me hizo su futura jefa de I+D jeje), Nata y Ángel.

A mi Dieguico, eres el mejor del mundo.

A mis padres, que aguantan lo inaguantable y a mi hermana. Sois la mejor familia que podría desear.

A toda mi familia, pero en especial a mi abuela

En definitiva, gracias a todos, no sabéis lo afortunada que me siento por teneros en mi vida.

A mi hermana

Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica, adquiere el aprendizaje preciso y, por todos los medios, hazlo. Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro.

Severo Ochoa

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Sistema inmunitario	7
1.2. Citocinas e inflamación	9
1.2.1. TNF- α	11
1.2.2. IL-1 β	12
1.2.3. IL-12	14
1.2.4. IL-6	15
1.2.5. IL-10	16
1.3. Otras proteínas implicadas en inflamación: Galectina-3	17
1.4. Monocitos-macrófagos	18
1.4.1. Macrófagos de defensa del hospedador	20
1.4.2. Macrófagos de reparación tisular	21
1.4.3. Macrófagos reguladores	22
1.5. Receptores implicados en la detección de patógenos y daño tisular expresados en macrófagos	24
1.5.1. Receptores tipo Toll (TLR)	25
1.5.2. Receptores del tipo NOD (NLR)	28
1.6. Transducción de la señal mediada por receptores de PAMPs y DAMPs	30
1.6.1. Señalización vía MAPK	31
1.6.2. Señalización vía PI3K/Akt	33
1.6.3. Factores de transcripción	33
1.7. Patologías relacionadas con la inflamación	35
1.8. Cirrosis hepática	36
1.9. Ascitis	41
1.10. Traslocación bacteriana y peritonitis bacteriana espontánea	42
2. OBJETIVOS	47

3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1. Pacientes	53
3.2. Muestras de ascitis y sangre	54
3.3. Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM)	54
3.3.1. Obtención de M-DM peritoneales del AF	54
3.3.2. Obtención de M-DM de sangre periférica	55
3.3.3. Líneas celulares y condiciones de cultivo	56
3.4. Tinción de células. Análisis por citometría de flujo	58
3.5. Estimulación M-DM	59
3.6. Determinación de viabilidad celular	60
3.6.1. Exclusión con azul tripán	60
3.6.2. Método de MTT	61
3.7. Análisis de la producción de citocinas mediante ELISA	62
3.8. Análisis de señalización intracelular mediante Western blot	63
3.8.1. Obtención de extractos celulares	63
3.8.2. Determinación de la concentración proteica y preparación de las muestras	64
3.8.3. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético	64
3.8.4. Electroforesis	65
3.8.5. Transferencia de proteínas y detección inmunoquímica	66
3.9. Bases de datos y herramientas bioinformáticas	69
3.10. Análisis de la expresión génica mediante q-RT-PCR	70
3.10.1. Extracción, Purificación y Cuantificación de DNA genómico	70
3.10.2. Extracción, Purificación y Cuantificación de RNA	70
3.10.3. Síntesis de cDNA. Retrotranscripción (RT)	71
3.10.4. PCR cuantitativa o PCR a tiempo real (qPCR)	72
3.11. Subclonación de <i>GAL-3.1</i> en el vector pHR⁺SINcppt-SEWP	76
3.11.1. Amplificación y purificación de la secuencia de <i>GAL-3.1</i>	77
3.11.2. Generación de extremos cohesivos en <i>GAL-3.1</i> y SEWP	79

3.11.3. Ligación de <i>GAL-3.1</i> en SEWP	80
3.11.4. Transformación y purificación de SEWP- <i>GAL-3.1</i>	80
3.11.5. Confirmación de la subclonación de <i>GAL-3.1</i> en SEWP	81
3.12. Transducción con lentivirus	82
3.12.1. Transfección de HEK293T con los vectores virales	82
3.12.2. Obtención y concentración de los viriones	83
3.12.3. Transducción de las líneas THP-1, HL-60 y U937	83
3.13. Tratamiento estadístico de los datos	84
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
4.1. Peritoneal macrophage priming in cirrhosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion	87
4.1.1 Baseline clinical and analytical characteristics of patients	90
4.1.2. Peritoneal M-DM status at baseline	91
4.1.3. Peritoneal macrophage response to bacterial products	94
4.1.4. Discussion	96
4.2. The peritoneal macrophage inflammatory profile in cirrhosis depends on the alcoholic or hepatitis C viral etiology and is related to ERK phosphorylation	99
4.2.1. Patient baseline characteristics	102
4.2.2. HCV-C is associated with increased counts of some leukocyte subpopulations in ascites	103
4.2.3. Anti-inflammatory cytokine levels are higher and pro-inflammatory levels are lower in the ascites of HCV-C cirrhotic patients	104
4.2.4. Peritoneal M-DM isolated from ascites of cirrhotic patients maintain their cytokine secretory profile <i>in vitro</i>	106
4.2.5. Peritoneal M-DM isolated from ascites of cirrhotic patients are able to further respond to <i>in vitro</i> stimulation with several microbial stimuli	108
4.2.6. ERK1/2 phosphorylation levels are lower in peritoneal M-DM isolated from ascites of patients with HCV-C vs. ALC-C	109
4.2.7. Discussion	110

4.3. Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from ascites of cirrhotic patients	115
4.3.1. LPS- and heat killed <i>C. albicans</i> -induced activation of cell signaling molecules in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites	118
4.3.2. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed <i>C. albicans</i> -stimulated IL-6 release from peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites	120
4.3.3. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed <i>C. albicans</i> -stimulated TNF- α release from peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites	122
4.3.4. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed <i>C. albicans</i> -stimulated IL-10 release from peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites	123
4.3.5. Discussion	124
4.4. Regulatory role of PI3K-Akt on the release of IL-1β in peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients	129
4.4.1. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed <i>C. albicans</i> -stimulated IL-1 β release from M-DM of cirrhotic patients	132
4.4.2. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed <i>C. albicans</i> -stimulated IL-1 β release from M-DM of healthy donors	135
4.4.3. Activation level of cell signaling molecules in response to LPS and <i>C. albicans</i> in M-DM from patients with cirrhosis and healthy donors	137
4.4.4. Effect of PI3K inhibition on <i>IL1β</i> gene and protein expression in M-DM from cirrhotic patients and healthy donors	139
4.4.5. Role of CASP1 on the release of IL-1 β in M-DM from patients with cirrhosis	142
4.4.6. Discussion	147
4.5. Galectin-3 in decompensated hepatic cirrhosis	153
4.5.1. <i>GAL-3.1</i> and <i>GAL-3.2</i> mRNA variants are expressed in M-DM from ascites of cirrhotic patients	156

4.5.2. <i>LGALS3</i> gene expression levels are lower in cirrhotic peritoneal M-DM compared with blood healthy M-DM	158
4.5.3 <i>LGALS3</i> gene expression exhibited differential response pattern to stimulation in peritoneal M-DM from cirrhotic patients	159
4.5.4. Study of GAL-3 protein expression in M-DM obtained from blood donors and from ascites of patients with cirrhosis	161
4.5.5. Discussion	164
4.6. Searching for a model to study the role of GAL-3 in human macrophages	167
4.6.1. Classical transfection methods resulted in low transfection efficiency and high mortality rates	169
4.6.2. Lentiviral transduction method and expression controlled by SFFV promoter showed the highest efficiency rates	170
4.6.3. <i>GAL-3.1</i> cDNA transduction with lentiviral particles	173
4.6.4. Analysis of GAL-3.1 expression after lentiviral transduction in human macrophage-like cell lines	174
4.6.5. Effect of differentiation to macrophages on GAL-3 protein expression and location in myelocytic cell lines	175
4.6.6. Discussion	177
5. CONCLUSIONES	181
6. BIBLIOGRAFÍA	185
7. SUMMARY	207

ABREVIATURAS

La mayoría de las abreviaturas empleadas en esta Memoria proceden del inglés y por ello se han mantenido como tal:

LISTADO DE ABREVIATURAS

- **AF:** Ascitic Fluid.
- **ALC:** Alcohol intake
- **ALC-C:** Alcohol induced-Cirrhosis
- **ALD:** Alcoholic Liver Disease
- **AP-1:** Activation Protein-1
- **ASC:** Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
- **ATF:** Activating Transcription Factor.
- **ATP:** Adenosine Triphosphate
- **BSA:** Bovine Serum Albumin
- **BT:** Bacterial Translocation
- **CARD:** Caspase Recruitment Domain
- **CASP1:** Caspase 1
- **CCM:** Complete Culture Medium
- **CD:** Cluster of Differentiation
- **cDNA:** complementary DNA
- **Cél:** Célula
- **CpGs:** Regiones del DNA ricas en citosina y guanina
- **CMV:** Citomegalovirus
- **CRD:** Carbohydrate Recognition Domain
- **Cy5:** Cyano Dye 5
- **DAMP:** Damage-Associated Molecular Patterns
- **DNA:** Deoxyribonucleic Acid
- **dNTP:** Deoxyribonucleotide Triphosphate
- **DO:** Densidad Óptica
- **eGFP:** enhanced Green Fluorescent Protein.
- **ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- **ERK:** Extracellular signal-regulated Kinase.
- **Fig :** Figura

Abreviaturas

- **FITC:** Fluorescein Isothiocyanate
- **GAL-3:** Galectin-3
- **GAPDH:** Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
- **h:** hora
- **HCV:** Hepatitis C Virus
- **HCV-C:** HCV-induced Cirrhosis
- **HIV-1:** Human Immunodeficiency Virus type 1
- **HSC:** Hepatic Stellate Cells
- **I:** Inhibitor
- **IFN:** Interferon
- **Ig:** Immunoglobulin
- **IκB:** NFκB Inhibitor
- **IKK:** IκB Kinase
- **IL:** Interleukin
- **IQR:** Interquartile Range
- **JAK:** Janus Kinase
- **JNK:** C-Jun N-terminal kinase
- **KDa:** Kilodalton
- **KO:** knock-out
- **LPS:** Lipopolysaccharide
- **MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase
- **M-DM:** Monocyte-Derived Macrophages
- **MEK/ MKK:** Mitogen-activated protein Kinase Kinase
- **min:** minuto
- **MP:** Membrana Plasmática
- **mRNA:** messenger RNA
- **MTT:** 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
- **MyD88:** Myeloid Differentiation 88 factor
- **NF-κB:** Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
- **NK:** Natural Killer
- **NLR:** NOD-Like Receptors
- **NLRP:** NLR, Pyrine domain-containing

- **NOD:** Nucleotide Oligomerization Domain-containing protein
- **ODN:** Oligodeoxynucleotide synthetic
- **p:** Probabilidad
- **PAMP:** Pathogen-Associated Molecular Patterns.
- **Pb:** Pares de bases
- **PBS:** Phosphate Buffered Saline
- **PBS-T:** Phosphate Buffered Saline-Tween
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction
- **PD-ODN:** Phosphodiester Oligodeoxynucleotide
- **PE:** Phycoerythrin
- **PI3K:** Phosphatidylinositol 3-Kinase
- **PKB-Akt:** Protein Kinase B
- **PMA:** Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
- **PMN:** Polymorphonuclear cells
- **PRR:** PAMP-Recognition Receptor
- **PS-ODN:** Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide
- **PYD:** Pyrine domain
- **qPCR:** quantitative Polymerase Chain Reaction
- **qRT-PCR:** quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
- **RNA:** Ribonucleic Acid
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **rRNA:** ribosomal RNA
- **RT-PCR:** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
- **s:** segundo
- **SBP:** Spontaneous Bacterial Peritonitis
- **SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate
- **SEM:** Standar Error Mean
- **SFFV:** Spleen Focus Forming Virus
- **STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription Protein
- **TAE:** Tris Acetato EDTA
- **TGF:** Transforming Growth Factor
- **Th:** T helper cell

Abreviaturas

- **TIR:** Toll/IL-1 Receptor
- **TLR:** Toll Like Receptor
- **TNF:** Tumoral Necrosis Factor
- **Treg:** regulatory T cell
- **TU:** Transducer Unit
- *vs: versus*
- **WBC:** White Blood Cells

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema inmunitario.

El sistema inmunitario de vertebrados está constituido por un conjunto de componentes moleculares y celulares que reaccionan de forma conjunta y coordinada frente a la presencia de sustancias ajenas al organismo. El sistema inmunitario protege al organismo de infecciones por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos.

El sistema inmunitario natural o innato constituye la primera línea de defensa contra agentes patógenos. Los principales componentes de la inmunidad innata son:

- Barreras físicas y químicas como los epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en su superficie.
- Proteínas sanguíneas como proteínas del complemento y otros mediadores de la inflamación.
- Células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) y células asesinas naturales (NK).
- Citocinas, que son proteínas que regulan y coordinan muchas actividades de células encargadas de la inmunidad innata.

Si se abre una brecha en las barreras epiteliales, los microorganismos llegan al tejido subepitelial, donde son ingeridos por las células fagocíticas. Estas se activan y producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, cruciales para la destrucción de los patógenos invasores. Además producen citocinas y quimiocinas, que son esenciales para la movilización de los leucocitos al sitio de infección y la iniciación de la respuesta inmunitaria adaptativa. La acumulación local de leucocitos y su activación para destruir los microorganismos forman parte de la respuesta del huésped llamada inflamación. La inflamación generada por las infecciones proporciona una señal de alarma que dispara respuestas inmunitarias específicas.

El sistema inmunitario adaptativo o específico, se inicia posteriormente al innato. Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción, los anticuerpos. Estas células presentan receptores específicos en su superficie con distribución clonal, TCR para los linfocitos T, y BCR o inmunoglobulina (Ig) de membrana para los linfocitos B, capaces de reconocer de forma muy específica una gran diversidad de moléculas extrañas a nuestro organismo. Las

Introducción

células B están involucradas en la respuesta inmunitaria humoral, mientras que las células T lo están en la respuesta inmunitaria mediada por células. Estos linfocitos B y T no sólo actúan como células efectoras para la eliminación de los microorganismos, sino que además desarrollan lo que denominamos memoria inmunológica, que es la capacidad para “recordar” y responder con más fuerza en la siguiente exposición al mismo microorganismo, para brindar una protección más efectiva en futuros encuentros con estos patógenos. Así, las características principales de este tipo de inmunidad son: la extraordinaria especificidad para reconocer moléculas diferentes, el alto grado de especialización que las capacita para responder de forma singular a distintos tipos de microorganismos y su capacidad de “recordar” y responder con más fuerza tras exposiciones repetidas al mismo microorganismo, fundamento de la vacunación protectora (Abbas *et al.*, 2008).

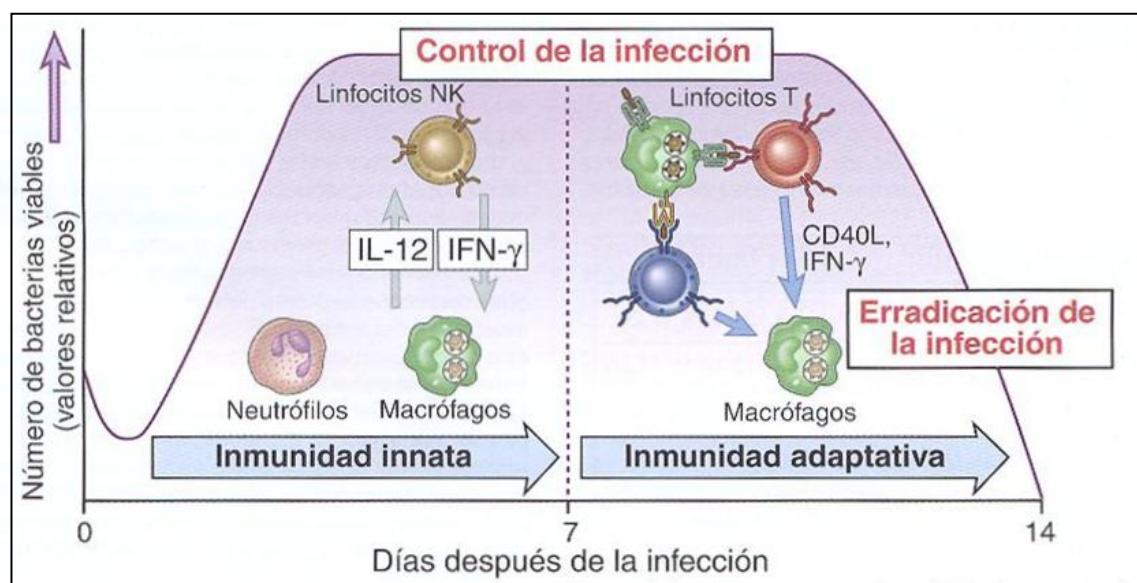


Fig. 1.1. Respuesta inmunitaria innata y adaptativa frente a infecciones (Abbas *et al.*, 2008).

Aunque la inmunidad innata y adaptativa actúan de manera diferente, lo hacen de manera acoplada y sinérgica para potenciar la defensa del hospedador. El sistema inmunitario innato juega un papel central en la iniciación de la respuesta inflamatoria, que es esencial para la movilización y función de varias células inmunitarias efectoras [Figura (Fig). 1.1]. Además, las células del sistema inmunitario innato actúan como células presentadoras de antígenos para que se produzca la creciente y eficiente respuesta inmunitaria adaptativa, cuya respuesta defensiva tarda días o semanas en desarrollarse. Recíprocamente, los linfocitos T y B pueden regular las funciones de las

células del sistema inmunitario innato, secretando una variedad de citocinas y anticuerpos específicos contra patógenos que facilitan la función antimicrobiana de las células del innato (Fig. 1.2).

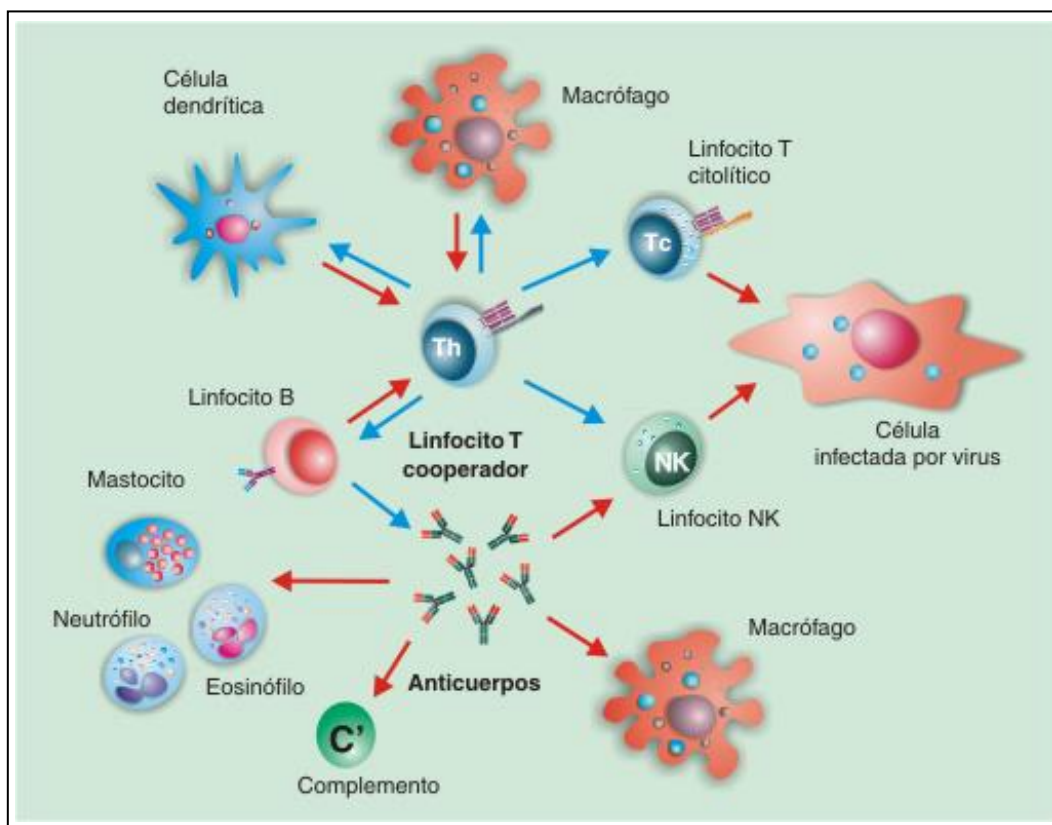


Fig. 1.2. Colaboración y especialización en el sistema inmunitario para la eliminación de patógenos. (adaptado de Regueiro *et al.*, 2004).

1.2. Citocinas e inflamación.

Las **citocinas** son polipéptidos sintetizados en respuesta a microorganismos y otros antígenos que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias, conociéndose como modificadores de la respuesta biológica.

Aunque son variadas desde el punto de vista estructural, comparten varias propiedades:

- A diferencia de las hormonas, las citocinas no están almacenadas en glándulas como moléculas preformadas, pero son rápidamente sintetizadas y secretadas como consecuencia de la activación celular.

Introducción

- Muchas citocinas particulares son sintetizadas por múltiples tipos celulares distintos (Fig. 1.3).
- Las citocinas son pleiotrópicas y redundantes, ya que una citocina puede actuar sobre distintos tipos celulares mediando diferentes efectos biológicos, y varias citocinas diferentes pueden tener los mismos efectos funcionales.
- Las citocinas a menudo influyen en la síntesis de otras citocinas, proporcionando importantes mecanismos de regulación positivos o negativos de las respuestas inmunitarias e inflamatorias.
- Frecuentemente afectan la acción de otras citocinas de manera aditiva, sinérgica o antagónica y actúan en cascada.
- Inician sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos en las células diana, cuya expresión es regulada por señales externas. Sus acciones pueden ser locales o sistémicas, la mayoría actúa cerca de su lugar de producción, en la misma célula que secreta la citocina (acción autocrina) o en una célula próxima (acción paracrina) (Fig. 1.3). Cuando se producen en cantidades grandes, pueden entrar en la circulación y actuar a distancia de su punto de producción (acción endocrina).
- Las respuestas celulares a las citocinas suelen suponer cambios en la expresión génica, dando lugar a la expresión de nuevas funciones celulares y a veces proliferación en las células diana.

El efecto global de una respuesta inmunitaria innata es la inducción de un estado de **inflamación** en un tejido lesionado o infectado. Los síntomas que aparecen son calor, rubor, tumor y dolor. Las citocinas inducen la dilatación local de los capilares sanguíneos, que aumenta el flujo sanguíneo y hace que la piel se caliente y enrojezca. La dilatación vascular produce separaciones en las células endoteliales, lo que aumenta el paso de plasma de la sangre al tejido conectivo. Ese aumento de volumen provoca edema, y presiona las terminaciones nerviosas causando dolor. Las citocinas también alteran las propiedades adhesivas del endotelio vascular, facilitando la extravasación de leucocitos, fundamentalmente neutrófilos y monocitos, a la zona. La inflamación permite que las moléculas y células del sistema inmunitario lleguen rápidamente y en gran cantidad al tejido lesionado o infectado.

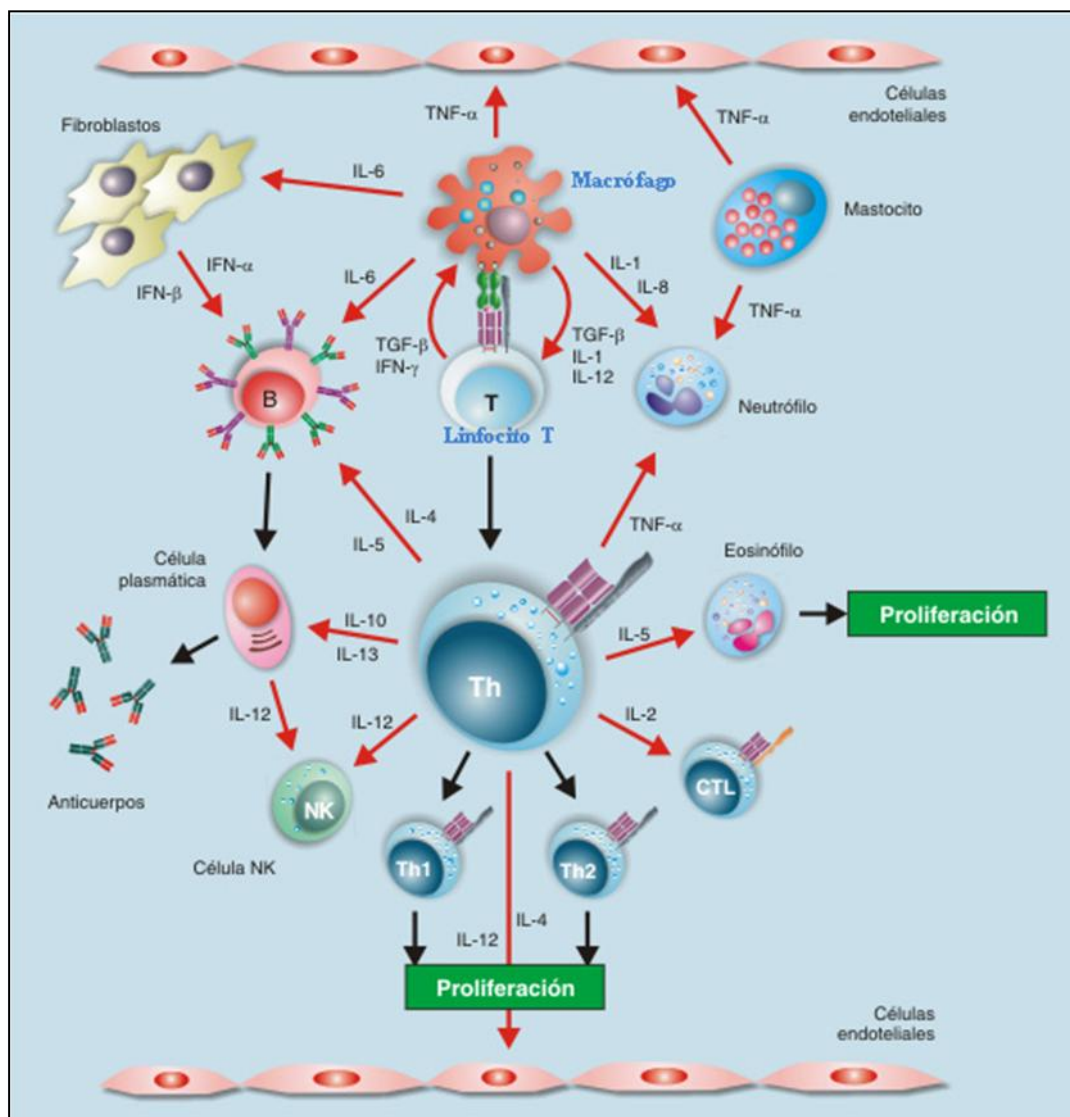


Fig. 1.3. Producción de citocinas por distintos tipos celulares. Los linfocitos T constituyen el eje central de la respuesta inmunitaria específica, y los macrófagos y mastocitos, el de la innata. Para coordinar a los restantes subtipos celulares es necesaria la comunicación de las células mediante diferentes citocinas (representadas por flechas rojas) (Regueiro *et al.*, 2004).

Las **citocinas pro-inflamatorias** son producidas, fundamentalmente, por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por otros tipos celulares. Las más importantes son el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-12 e IL-6. En la Tabla 1.I se resumen las principales características de las mismas:

1.2.1. TNF- α .

Es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos infecciosos, y es responsable de las consecuencias sistémicas de las

Introducción

infecciones graves. Las principales células productoras de TNF- α son monocitos y macrófagos, aunque las células dendríticas, los linfocitos T activados, las células NK, los mastocitos y los hepatocitos también pueden secretar esta proteína. En los macrófagos, se sintetiza como una glucoproteína transmembrana que se ensambla en ella como homotrímero. Un fragmento de cada subunidad puede ser cortado proteolíticamente de la membrana plasmática del fagocito mononuclear dando lugar a la forma secretada que circula como homotrímero estable, capaz de unirse simultáneamente a tres moléculas de receptor. Hay dos receptores diferentes (TNF-RI y RII) que se expresan en la mayoría de los tipos celulares. La mayoría de los efectos biológicos están mediados a través de TNF-RI.

Muchas respuestas de TNF- α implican una tasa aumentada de transcripción de determinados genes diana, a menudo a través de la activación de los factores de transcripción NF- κ B (factor nuclear κ B, del acrónimo *κ -light-chain-enhancer of activated B cells*) o AP-1 (proteína de activación 1). La principal función fisiológica de TNF- α es actuar localmente como regulador paracrino y autocrino de los leucocitos y las células endoteliales, facilitando la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección, y activar a estas células para que eliminen los microorganismos (Tayal y Kalra, 2008). Los efectos de TNF- α son críticos para las respuestas inflamatorias contra los microorganismos; dado que en cantidades inadecuadas puede producirse fracaso en la contención de la infección. Su producción a bajos niveles de manera crónica, da lugar a una remodelación tisular, actuando como factor de angiogénesis.

Cuando la cantidad de TNF- α es elevada, la citocina entra en el torrente sanguíneo y actúa como una hormona endocrina. Cantidades masivas de TNF- α producidas por ejemplo, frente a sepsis causadas por infecciones bacterianas, pueden producir *shock* séptico que puede conducir a la muerte. Este se caracteriza por la disminución de la tensión arterial, trombosis intravascular diseminada y alteraciones metabólicas graves, como la reducción de la concentración de glucosa plasmática a unos niveles muy bajos, incapaces de ser repuestos por el hígado.

1.2.2. IL-1 β .

Actúa como mediador de la respuesta inmunitaria e inflamatoria del huésped frente a infecciones y otros estímulos, presentando así una acción redundante junto con

TNF- α , que además induce la producción de IL-1 β en los macrófagos. Está producida principalmente por monocitos de sangre y macrófagos de tejidos, que sintetizan grandes cantidades de esta citocina y tienen una localización estratégica. Otros tipos celulares diferentes como neutrófilos, células NK, linfocitos T y B, células epiteliales y células endoteliales también pueden sintetizarla (Dinarelli, 2011).

La producción de IL-1 β precisa de dos señales distintas, una que activa la transcripción génica de un monómero precursor, y una segunda señal que activa al inflamasoma (ver más adelante) para que escinda, mediante proteólisis, mediada principalmente por la proteína caspasa-1 (CASP1), a este precursor, generando la IL-1 β madura activa.

Esta citocina no se secreta por la vía clásica convencional de secreción, dado que no presenta la secuencia señal hidrófoba que dirige el polipéptido sintetizado hacia el retículo endoplasmático. Se sintetiza directamente como proteína citoplasmática, aunque su mecanismo de secreción no está claro hasta el momento, parece que puede realizarse directamente a través de la membrana plasmática (MP) o por mecanismos de secreción no convencionales (Fig. 1.4) (Zhang y Schekman, 2013).

IL-1 β media sus efectos biológicos a través de un receptor de membrana llamado receptor de IL-1 de tipo I, que se expresa en casi todos los tipos celulares. Este receptor es una proteína integral de membrana que contiene un dominio Ig extracelular que se une al ligando y un dominio transductor de señales TIR, del inglés *Toll/IL-1 Receptor* (ver más adelante) en la región citoplasmática. Los efectos biológicos son similares a los del TNF- α y también dependen de la cantidad de citocina liberada, probablemente porque los receptores de ambas citocinas transducen señales por proteínas homólogas y activan los mismos factores de transcripción (NF- κ B o AP-1). Sin embargo, esta citocina al contrario que TNF- α , no resulta letal a concentraciones muy altas, ni produce daño tisular por sí misma. A concentraciones bajas su principal función es ser mediadora de la inflamación local; en cantidades mayores pasa a la circulación sistémica ejerciendo efectos endocrinos y provocando fiebre y aumentando la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos del hígado, entre otros.

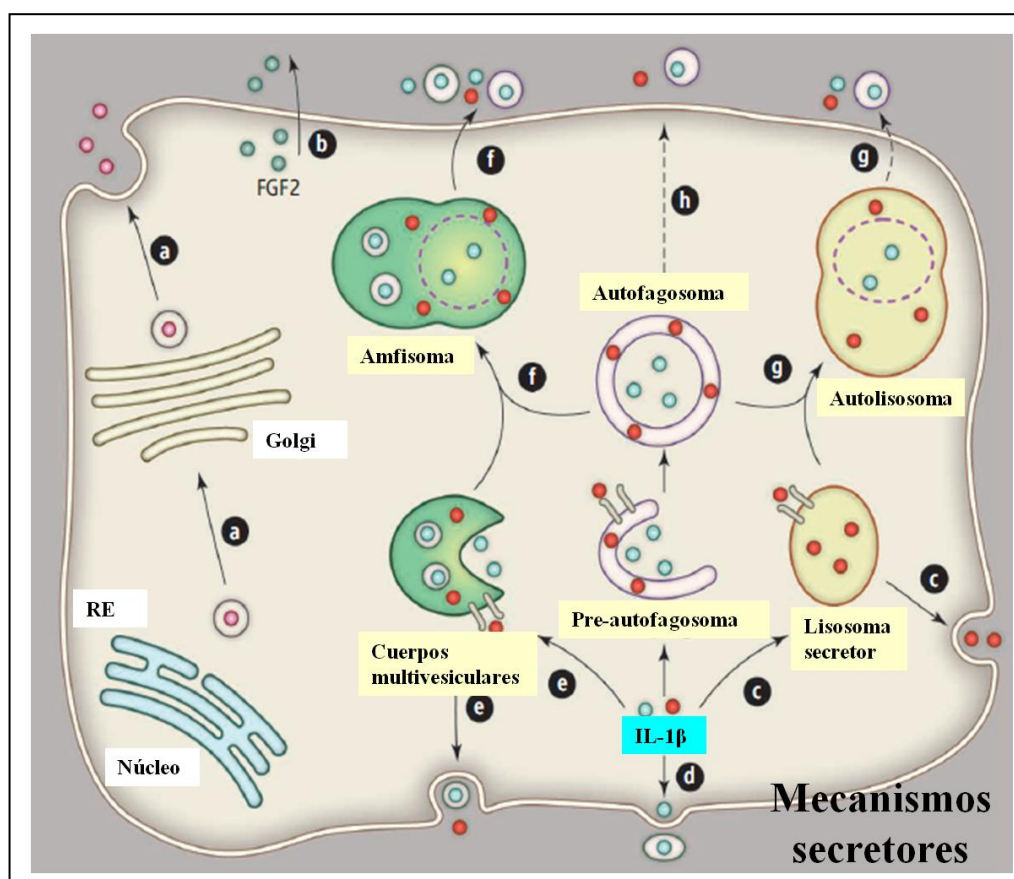


Fig. 1.4. Posibles rutas de secreción proteica. a) Mecanismo de secreción clásica; b) Tránsito directo a través de la MP independiente de un transportador de superficie; (c al h) Rutas de secreción no convencionales; c) Secreción por fusión de lisosomas secretores a la MP; d) Secreción por escisión directa de la MP; e) Secreción en exosomas generados a partir de cuerpos multivesiculares; f) Secreción mediada por amfisosomas; g) Secreción por la fusión directa de autolisosomas con la MP; h) Secreción por fusión directa de autofagosomas con la MP (adaptado de Zhang y Scheckman, 2013).

1.2.3. IL-12.

Es un importante mediador de la respuesta inmunitaria innata temprana e inductor de la inmunidad celular. Es una proteína heterodimérica formada por dos subunidades p35 y p40 unidas por enlaces disulfuro. El receptor que la reconoce tiene dos subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, ambas pertenecen a la familia de receptores de citocinas de tipo I y son expresados principalmente por células NK, linfocitos T y subpoblaciones de linfocitos B. Muchas células sintetizan la subunidad p35, pero la síntesis de la subunidad p40 está restringida a los macrófagos y las células dendríticas activadas. Por consiguiente, estos tipos celulares son las fuentes principales de IL-12 biológicamente activa. Su vía intracelular de señalización activa el factor de transcripción STAT4 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 4*). IL-12 induce inmunidad celular por promover proliferación y actividad citolítica por las células NK,

diferenciación de células T colaboradoras (Th) 1, iniciar respuesta de los macrófagos y tiene actividad anti-angiogénica. Los linfocitos T y las células NK sintetizan interferón (IFN)- γ en respuesta a IL-12 lo que a su vez induce la síntesis de más IL-12 por parte de los macrófagos (Del Vecchio *et al.*, 2007).

1.2.4. IL-6.

Es una citocina que participa en la inmunidad innata y adaptativa. La forma funcional es un homodímero y el complejo receptor que media sus actividades biológicas, está compuesto por una glicoproteína (gp) transmembrana de tipo I llamada receptor de IL-6 (IL-6R) y la proteína transductora de señal transmembrana tipo I, gp130. Es sintetizada por fagocitos mononucleares, células endoteliales vasculares, fibroblastos y algunos linfocitos T activados en respuesta a microorganismos y otras citocinas, sobre todo IL-1 β y TNF- α . Su vía intracelular de señalización activa el factor de transcripción STAT3. La IL-6 estimula la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, aumenta la producción de neutrófilos por la médula ósea, estimula el crecimiento de linfocitos B, favorece la síntesis de IL-17 e inhibe la generación y acciones de los linfocitos T reguladores (Treg) (Heinrich *et al.*, 2003). Además de participar en la activación del sistema inmunitario, IL-6 está también implicada en procesos regenerativos, en regulación del metabolismo, en el mantenimiento de la homeostasis ósea y en varias funciones neuronales (Scheller *et al.*, 2011).

IL-6 está considerada principalmente como una citoquina pro- inflamatoria, pero desarrolla actividades anti-inflamatorias y regenerativas. Estas están mediadas a través de la unión a su receptor de membrana, mientras que la actividad pro-inflamatoria está mediada por su unión a una forma soluble de su receptor que posteriormente se une a la proteína gp130 presente en la membrana de muchos tipos celulares para transmitir las señales que median su actividad (Scheller *et al.*, 2011). El IL-6R de membrana se expresa de forma ubicua en tejido hepático, en donde la IL-6 parece tener un efecto anti-inflamatorio y de regeneración hepática (Gao, 2012). Los efectos anti-inflamatorios de IL-6 parecen conducir a la inhibición de la actividad de TNF- α e IL-1, mediante la inducción de la síntesis del antagonista del receptor de IL-1, IL-1RA y de receptores solubles de TNF- α (Tilg *et al.*, 1994; Garbers *et al.*, 2012).

Como **citocina anti-inflamatoria** podemos citar:

Introducción

1.2.5. IL-10.

Es un inhibidor de las respuestas inmunitarias del huésped, particularmente de las respuestas en las que participan los macrófagos, actuando como un regulador de retroalimentación negativo para estas células. Es un homodímero y su receptor pertenece a la familia de receptores de citocina tipo II y señala activando el factor de transcripción STAT3. Es sintetizada fundamentalmente por macrófagos activados y linfocitos Treg.

Sus actividades principales son inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF, IL-1, IL-12 y quimiocinas por los macrófagos y reducir o bloquear las funciones accesorias de éstos en la activación de linfocitos T. El efecto neto de estas acciones es inhibir la inflamación inmunitaria innata y específica mediada por células T (Couper *et al.*, 2008).

Tabla 1.I. Resumen de las principales propiedades de las citocinas estudiadas.

Citocina	Estructura	Célula origen	Célula diana	Función
TNF-α	Homotrímero	Monocitos y macrófagos, cél dendríticas, linfocitos T activados, cél NK, mastocitos y hepatocitos	Leucocitos, cél endoteliales	-Respuesta inflamatoria de fase aguda. -Inflamación local. -Síntesis proteínas fase aguda. -Activación de endotelio/linfocitos. - <i>Shock séptico</i>
IL-1β	Monómero	Monocitos y macrófagos, neutrófilos, cél NK, linfocitos T y B, cél epiteliales y endoteliales.	Linfocitos T, macrófagos, cél endoteliales	-Inflamación local. -Síntesis proteínas fase aguda. -Activación de endotelio -Activación inflamasona
IL-6	Homodímero	Fagocitos mononucleares, cél endoteliales, linfocitos T activados, fibroblastos.	Linfocitos Th, Monocitos, Eosinófilos.	-Síntesis proteínas fase aguda. -Producción neutrófilos. -Proliferación células B.
IL-12	Heterodímero	Macrófagos, cél dendríticas.	Linfocitos T, B, cél NK.	-Diferenciación de linfocitos Th1. -Activación actividad citolítica NK. -Inducción de IFN- γ .
IL-10	Homodímero	Macrófagos, linfocitos Treg,	Macrófagos, linfocitos T	-Inhibición producción citocinas pro-inflamatorias por macrófagos. -Inhibir inflamación mediada por linfocitos T.

1.3. Otras proteínas implicadas en inflamación: Galectina-3.

Las galectinas son una familia de lectinas solubles de unión a β -galactósidos, con funciones inmunorreguladoras, que pueden ser diferentes e incluso opuestas (Ravinovich *et al.*, 2002). Se expresan en la mayoría de las células del sistema inmunitario innato (macrófagos, células dendríticas, NK) y del adaptativo (células T y B activadas) (Vasta, 2009). Estas lectinas solubles presentan un dominio de unión a carbohidratos (CRD). Las galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14, 15 (estructura prototipo) presentan un dominio CRD que puede dimerizar, mientras que las galectinas 4, 6, 8, 9 y 12 (estructura con repeticiones en tándem) contienen dos CRDs homólogos en tándem en una única cadena polipeptídica (Fig. 1.5). La galectina 3 (GAL-3) (estructura quimera), es única en la familia ya que presenta un dominio CRD C-terminal unido a una región N-terminal rica en prolina, glicina y tirosina con múltiples secuencias homólogas responsables de la oligomerización (Henderson y Sethi, 2009).

Son en general proteínas secretadas que puede actuar de manera paracrina o autocrina. Carecen de un péptido señal y un dominio transmembrana, por lo que se secretan de manera no convencional a través traslocación directa desde la MP o externalizada en vesículas (Ravinovich *et al.*, 2002). Por medio de su capacidad de reconocer estructuras específicas de glucanos en diferentes tipos celulares del sistema inmunitario, las galectinas se han relacionado funcionalmente con procesos críticos como la interacción entre hospedador y patógeno, señalización y activación del sistema inmune, homeostasis de linfocitos Th y conservación de la tolerancia fetomaternal. Actúan tanto intracelularmente, en el citoplasma y núcleo, como extracelularmente (Mascanfroni *et al.*, 2011).

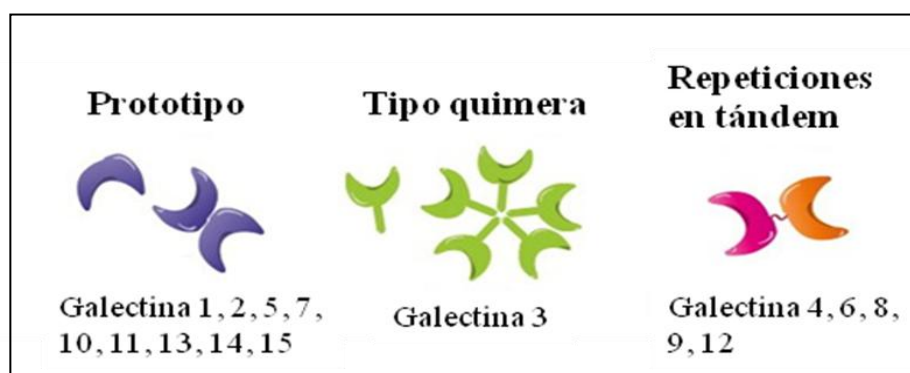


Fig. 1.5. Estructura de las galectinas (Adaptado de Mascanfroni *et al.*, 2011).

Introducción

GAL-3 es sintetizada por monocitos, macrófagos y células epiteliales. Muchos estudios sugieren que GAL-3 puede regular las respuestas inflamatorias mediante sus funciones sobre la activación celular, migración celular y regulación de apoptosis en células del sistema inmunitario. El hecho de que GAL-3 sea altamente promiscua, de que su localización en el microambiente tisular pueda ser extracelular o intracelular citoplasmática o nuclear, y el que tenga una habilidad dependiente de concentración para estar en forma de monómero o formar oligómeros, le aporta una gran flexibilidad para ser un regulador específico de muchos sistemas biológicos (Henderson y Sethi, 2009).

GAL-3 está implicada en muchos procesos durante la respuesta inflamatoria aguda, como la adhesión y activación de neutrófilos, quimiotaxis para monocitos y macrófagos, opsonización de neutrófilos apoptóticos o activación de mastocitos. Tiene un papel importante en la defensa del hospedador contra microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* o *Candida albicans* (Farnworth *et al.*, 2008; Kohatsu *et al.*, 2006; Jouault *et al.*, 2009). Sin embargo, si el daño inicial es repetitivo, GAL-3 parece estar íntimamente implicada en la transición a la inflamación crónica, facilitando el aislamiento del tejido dañado mediante fibrogénesis y formación de cicatrices (Dumic *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2006).

1.4. Monocitos-macrófagos.

El sistema monocito-macrófago está compuesto por células que presentan capacidad fagocítica y pertenecen a una estirpe común. Estas células se originan en la médula ósea, circulan por la sangre y se diferencian en diversos tejidos. El primer tipo celular que entra en la sangre después de abandonar la médula ósea, no está diferenciado por completo y se llama **monocito**. Una vez que han penetrado en los tejidos, estas células se diferencian y se convierten en **macrófagos** (Fig. 1.6), que pueden recibir nombres especiales para designar su ubicación específica, como por ejemplo los macrófagos del hígado, que se denominan células de Kupffer.

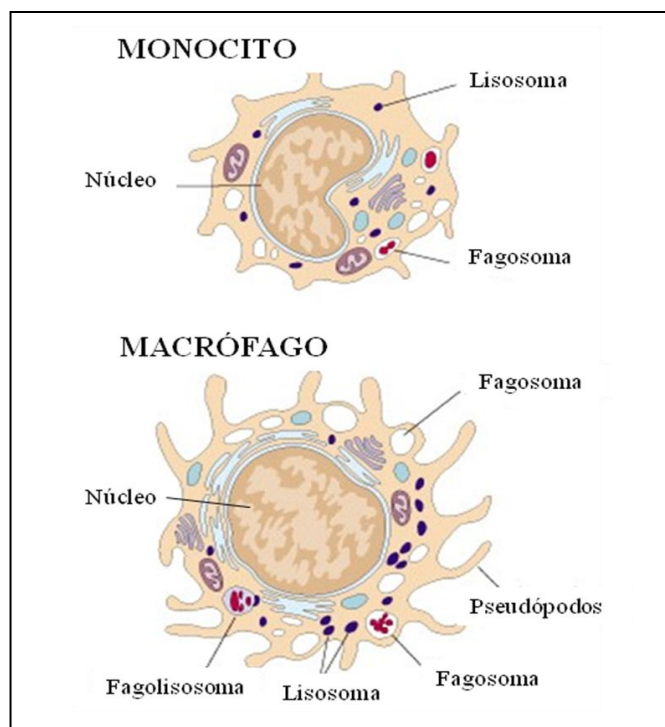


Fig. 1.6. Morfología típica de un monocito y un macrófago. Los macrófagos son de 5 a 10 veces más grandes que los monocitos y contienen más organelas, especialmente lisosomas.

Los macrófagos intervienen de manera importante en las interacciones bidireccionales entre la inmunidad innata y adaptativa. En la innata, sus principales funciones consisten en la fagocitosis de partículas extrañas (que pueden estar cubiertas por proteínas del complemento), la producción de enzimas, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, para eliminar y controlar la diseminación de las infecciones; además producen citocinas que sirven para reclutar otras células inflamatorias como los neutrófilos a los focos de infección, así como factores de crecimiento para los fibroblastos y células endoteliales que ponen en marcha la reparación de los tejidos dañados. En la inmunidad adaptativa, los macrófagos presentan una importante función como células presentadoras de antígeno, procesando y mostrando en su superficie antígenos extraños para que sean reconocidos por los linfocitos T; además, fagocitan antígenos extraños recubiertos de anticuerpos y producen citocinas que estimulan la proliferación y diferenciación de estos linfocitos (Sharif *et al.*, 2007).

Estas células presentan una remarcable plasticidad y pueden cambiar su fisiología en respuesta a estímulos ambientales. Los cambios en la fisiología de los macrófagos pueden estar marcadamente alterados, tanto por el sistema inmunitario innato como por el adaptativo. Basado en su heterogeneidad y versatilidad, los macrófagos ejercen

Introducción

múltiples funciones, ocasionalmente opuestas, lo que revela la existencia de diferentes tipos de macrófagos en los estados maduros (Geissman *et al.*, 2010). Así podemos agrupar la población de macrófagos basándonos en tres actividades homeostáticas diferentes: defensa del hospedador, reparación tisular y regulación inmunitaria (revisado por Mosser y Edwards, 2008; Zimmermann *et al.*, 2012; Abbas *et al.*, 2012).

1.4.1. Macrófagos de defensa del hospedador.

Corresponden a la población conocida como M1 o macrófagos activados clásicamente (Fig. 1.7). Éstos hacen referencia a los macrófagos efectores que se producen durante la respuesta inmunitaria mediada por células. La combinación de dos señales IFN- γ y TNF- α , da lugar a una población de macrófagos que presenta aumentada la capacidad microbicida y secreta altos niveles de citocinas y mediadores pro-inflamatorios.

La fuente temprana innata de la citocina IFN- γ son las células NK, liberada en respuesta al estrés e infecciones, que induce a los macrófagos a secretar citocinas pro-inflamatorias, producir grandes cantidades de aniones superóxido y radicales de oxígeno y nitrógeno para incrementar su habilidad microbicida. Sin embargo la producción de esta citocina por las células NK es transitoria, por lo que no puede proporcionar una población permanente de macrófagos defensores del hospedador. En consecuencia, se necesita de una respuesta inmunitaria adaptativa, mediada por los linfocitos Th1 para continuar la producción de IFN- γ y mantener estos macrófagos activos, confirmando así una defensa estable del hospedador contra muchos microorganismos intracelulares.

En resumen, los macrófagos de defensa del hospedador son producto de una respuesta inmunitaria mediada por células, pero también pueden generarse transitoriamente en respuesta a un estímulo innato como el estrés o infecciones virales, convirtiéndose así en un componente vital para la defensa del hospedador.

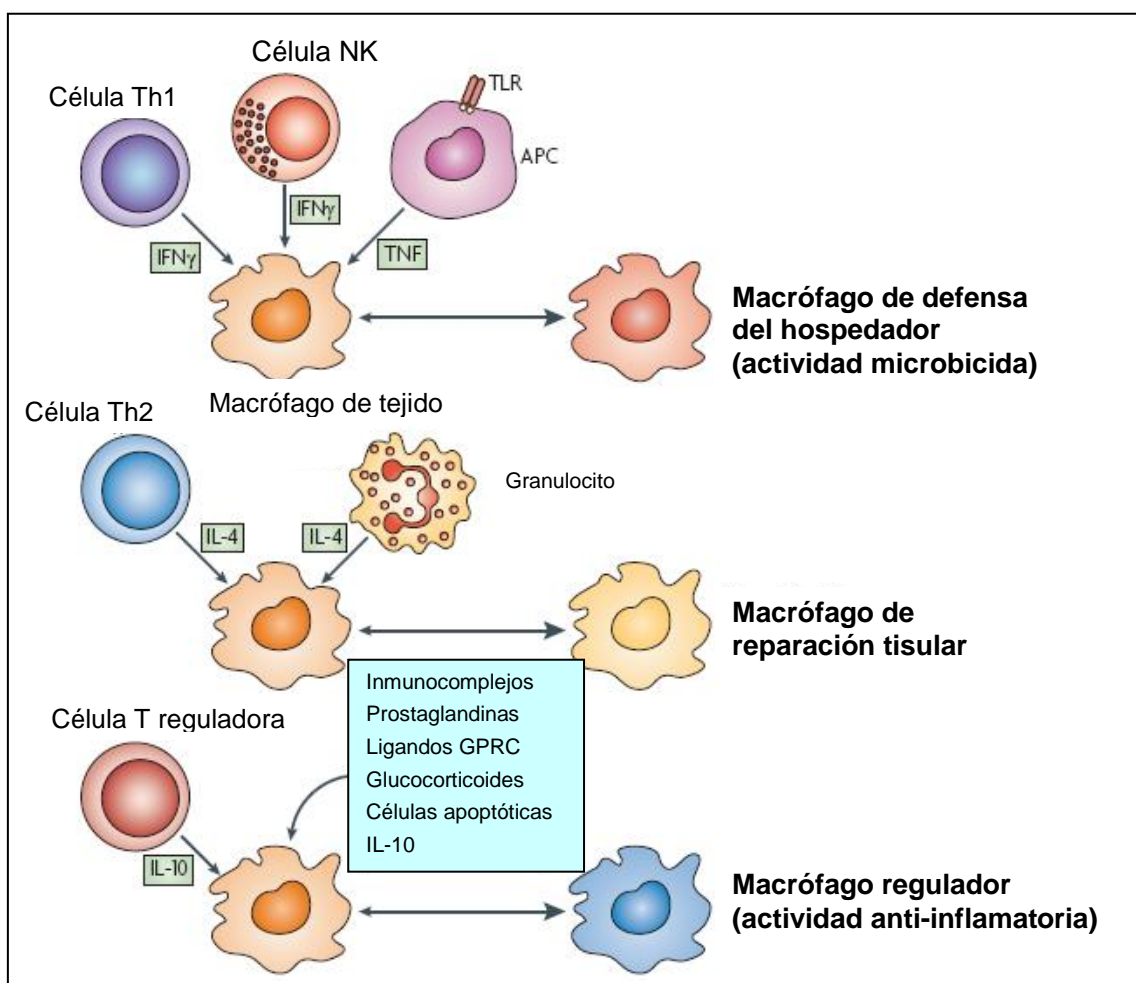


Fig. 1.7. Distintas poblaciones de macrófagos en función de la producción de citocinas por células del sistema inmunitario. (Adaptado de Mosser y Edwards, 2008).

1.4.2. Macrófagos de reparación tisular.

Corresponden a la población conocida como M2a de los macrófagos activados alternativamente (Fig. 1.7). Pueden promover la inmunidad humoral y procesos de reparación tisular. Participan en fagocitosis, secreción de citocinas como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β y factores de crecimiento y remodelación de la matriz celular (Novak y Koh, 2013). Este fenotipo *in vitro* es producido por exposición a IL-4 o IL-13 que actúan a través del receptor común IL-4R α que incrementa la expresión de arginasa, CD206 (del inglés *Cluster of Differentiation* 206) y TGF- β . El estímulo de la actividad arginasa en macrófagos, permite convertir la arginina en ornitina, un precursor de poliaminas que son importantes en la proliferación celular, y colágeno, contribuyendo así a la producción de matriz extracelular. El incremento en la expresión de manosa (CD206) está implicado en el proceso de fagocitosis, eliminando

Introducción

así células necrotizadas permitiéndose la regeneración. TGF- β , es un potente estimulador de la producción de colágeno y de la proliferación de fibroblastos.

En presencia de daño tisular, los basófilos, mastocitos y otros granulocitos producen IL-4. La producción primaria de IL-4 convierte a los macrófagos residentes en una población de células que están programadas para promover la reparación y regeneración tisular.

Las respuestas inmunitarias adaptativas también pueden conducir a la producción de IL-4, y se piensa que es la primera vía para el desarrollo y mantenimiento de los macrófagos de reparación tisular. En respuesta a alteraciones en la mucosa, los linfocitos Th2 son los encargados de producir IL-4 y también IL-13.

Macrófagos tratados con IL-4 y/o IL-13 reducen su capacidad de presentación de antígenos a células T, producen mínimas cantidades de citocinas pro-inflamatorias y son menos eficientes que los macrófagos de defensa del hospedador en la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, y por tanto de eliminar patógenos intracelulares. Sin embargo, estas células secretan componentes de la matriz extracelular, teniendo como función primaria la reparación tisular. Estos macrófagos también pueden ejercer efectos reguladores indirectos en la respuesta inmunitaria, puesto que las poliaminas que producen pueden influenciar la producción de citocinas y suprimir la expansión clonal de los linfocitos vecinos.

1.4.3. Macrófagos reguladores.

Corresponden a la población conocida como M2b o c del grupo de macrófagos activados alternativamente (Fig. 1.7). El estrés provoca la activación de la inmunidad innata. Los glucocorticoides liberados por las células adrenales en respuesta al estrés inhiben la defensa del hospedador mediada por macrófagos. Las funciones inflamatorias y antimicrobianas se reducen por inhibición de la transcripción y la estabilidad del RNA mensajero (mRNA) de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias, dando lugar a una población de macrófagos reguladores. Además las células presentadoras de antígeno tratadas con glucocorticoides dejan de poder presentar antígenos a las células T, induciendo respuestas Th2 o el desarrollo de células Treg que pueden inhibir la respuesta inmunitaria. Sin embargo no todas las funciones de los macrófagos se ven adversamente afectadas en presencia de glucocorticoides, ya que la fagocitosis de células apoptóticas parece permanecer intacta. La producción de la citocina reguladora

TGF- β por macrófagos que fagocitan células apoptóticas en presencia de estímulos pro-inflamatorios, puede también contribuir a funciones inmunorreguladoras de estos macrófagos.

Los macrófagos reguladores también pueden surgir cuando la respuesta inmunitaria adaptativa se mantiene largos periodos de tiempo y su función principal parece ser apagar la respuesta inmunitaria y limitar la inflamación.

Una de las características de este tipo de macrófagos, es la necesidad de dos estímulos para inducir su actividad anti-inflamatoria. La primera señal (por ejemplo inmunocomplejos, células apoptóticas, prostaglandinas, etc) generalmente tiene poca o ninguna función estimuladora, pero cuando combinamos con un segundo estímulo como un ligando de TLR (del inglés, *Toll-like receptor*), las dos señales reprograman los macrófagos para producir altos niveles de la citocina inmunosupresora IL-10. La producción de IL-10 es la más importante y fiable característica de los macrófagos reguladores. En adición a la producción de IL-10, los macrófagos también disminuyen la producción de IL-12, por lo que la producción de ambas citocinas es excluyente; si se produce una, disminuye la producción de la otra y viceversa.

Este tipo de macrófagos son potentes inhibidores de la inflamación porque la IL-10 que producen puede inhibir la producción y actividad de varias citocinas pro-inflamatorias. No contribuyen a la producción de matriz extracelular, pero muchos de ellos expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras y pueden presentar antígenos a las células T.

Las poblaciones de macrófagos son heterogéneas y son reguladas de manera temporal *in vivo*, no existiendo los fenotipos tan marcados que encontramos *in vitro*. Así los macrófagos pueden adoptar variedad de fenotipos en respuesta a diferentes estímulos (Novak y Koh, 2013).

Si el proceso de diferenciación no está correctamente regulado puede tener consecuencias peligrosas. Por ejemplo las citocinas y mediadores producidos por los macrófagos de defensa del hospedador pueden causar daño a los propios tejidos, los implicados en la reparación tisular pueden promover fibrosis y los reguladores pueden predisponer al hospedador a sufrir infección por inhibición de la respuesta inmunitaria debido a la producción de altos niveles de la citocinas anti-inflamatoria IL-10 (Mosser y Edwards, 2008).

1.5. Receptores implicados en la detección de patógenos y daño tisular expresados en macrófagos.

La principal función fisiológica del sistema inmunitario es protegernos frente a los microorganismos patógenos y otras moléculas extrañas, y para ello necesita en primer lugar reconocerlos, para así proceder a su control y eliminación.

Las células del sistema inmunitario innato presentan un número limitado de receptores que sirven para el reconocimiento de múltiples patógenos, denominados **PRRs** (*PAMP-Recognition Receptors*). Gracias a estos receptores las células pueden reconocer moléculas conservadas y/o esenciales para la supervivencia de los patógenos denominadas **PAMPs** (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), desarrollando así una defensa genérica inmediata que previene rápidamente la división de los patógenos dentro del hospedador. También el sistema inmunitario innato reconoce moléculas endógenas, como el ATP (adenosina trifosfato), producidas o liberadas por células dañadas o en proceso de muerte denominadas **DAMPs** (*Damage-Associated Molecular Patterns*) que pueden producirse como resultado del daño celular causado por infecciones o bien por una lesión estéril de la célula causada por otra razón como por ejemplo toxinas químicas (Abbas *et al.*, 2012).

Cuando los PAMPs o DAMPs se unen a los PRRs, activan la ruta de transducción de señales que promueven la función antimicrobiana y pro-inflamatoria de las células en las que se expresan. Estos receptores no tienen limitada su expresión a la MP, sino que pueden encontrarse en el espacio extracelular (son secretados), en membranas endosómicas o en el citoplasma de estas células (Fig. 1.8). Diferentes PRRs reconocen y unen diferentes PAMPs y contribuyen a la generación de diferentes respuestas frente al microorganismo (Janeway y Medzhitov, 2002). Nos vamos a centrar en los siguientes PRRs: TLRs y receptores tipo NOD.

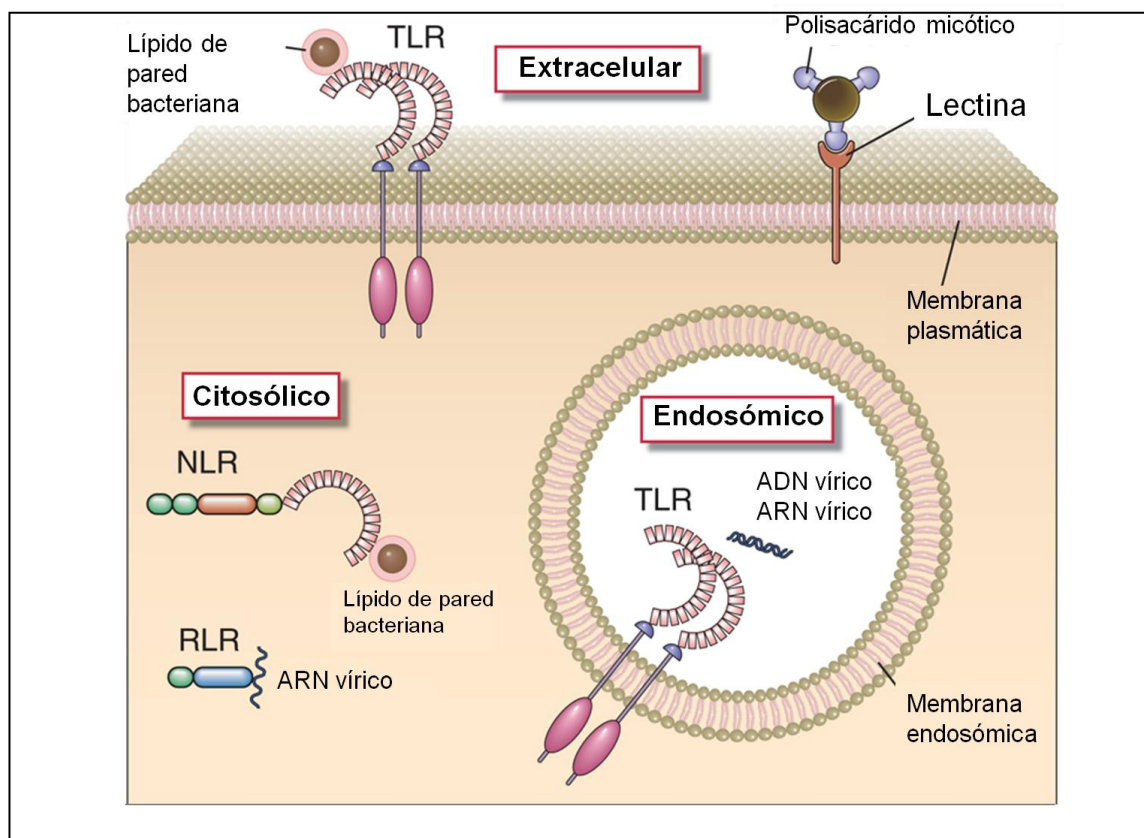


Fig. 1.8. Localizaciones celulares de los PRRs. Algunos miembros de la familia de los TLR se expresan en la superficie celular, donde pueden unirse a PAMPs asociados a microorganismos patógenos extracelulares. Otros se expresan en membranas endosómicas y reconocen ácidos nucleicos de microorganismos que han sido fagocitados por células. Las células también contienen detectores citoplasmáticos de la infección microbiana, como la familia de proteínas NLR (*NOD like receptor*), que reconocen peptidoglucanos bacterianos, los receptores del tipo RLR (*RIG-like receptor*), que se unen al RNA vírico, y receptores de MP del tipo lectina, que reconocen glucanos micóticos (adaptado de Abbas *et al.*, 2012).

1.5.1. Receptores tipo Toll (TLR).

Toll se identificó como un gen de *Drosophila* implicado en la embriogenia, pero después se descubrió que la proteína Toll también mediaba las respuestas inflamatorias antimicrobianas de estos organismos. En mamíferos se han identificado homólogos de Toll y se han denominado receptores tipo Toll.

Los **TLR** son glucoproteínas integrales de membrana de tipo I que contienen repeticiones ricas en leucina, flanqueadas por estructuras ricas en cisteína en sus regiones extracelulares, que participan en la unión a ligando, y un dominio TIR en sus colas citoplasmáticas, que es esencial para la producción de señales intracelulares.

Introducción

Se expresan en la membrana plasmática o las membranas endosómicas siendo capaces de reconocer patógenos en diferentes localizaciones celulares, así como moléculas endógenas indicativas de daño celular. Existen 11 TLRs en humanos, los TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11 se expresan en la MP, donde reconocen PAMPs en el ambiente extracelular; mientras que los TLR3, 7, 8 y 9 se expresan sobre todo dentro de las células, en el retículo endoplasmático y en la membrana de los endosomas (Fig. 1.8). Su reconocimiento inicia una respuesta inmunitaria temprana que constituye la primera línea de defensa del hospedador dedicada a la eliminación del patógeno mientras se produce la organización de la respuesta adaptativa. Los TLRs están expresados primariamente en células fagocíticas como macrófagos, y algunos también en células dendríticas, mastocitos y células B y se organizan en monómeros, homodímeros o heterodímeros (Imler y Hoffmann, 2001).

La activación de los TLRs en los fagocitos participa en la inducción de la respuesta inmunitaria adaptativa, ya que induce un aumento de expresión de moléculas coestimuladoras, que favorecen su actividad presentadora de antígeno y activadora de las células T. La unión del ligando al TLR en los fagocitos, actúa por tanto como una señal de peligro, aumentando la actividad microbicida y coestimuladora.

TLR4 participa en el reconocimiento del lipopolisacárido (**LPS**), componente principal de la membrana de bacterias Gram negativas. El LPS se une a la proteína de membrana CD14 expresada en macrófagos, a través de la proteína plasmática de unión a LPS, e interacciona con el TLR4 por medio de la proteína MD2 para iniciar la transducción de señales (Fig. 1.9). Los monocitos y macrófagos del sistema inmunitario innato son capaces de detectar bajos niveles de LPS, induciendo señalización intracelular que activa factores de transcripción, que ponen en marcha genes que codifican mediadores inflamatorios.

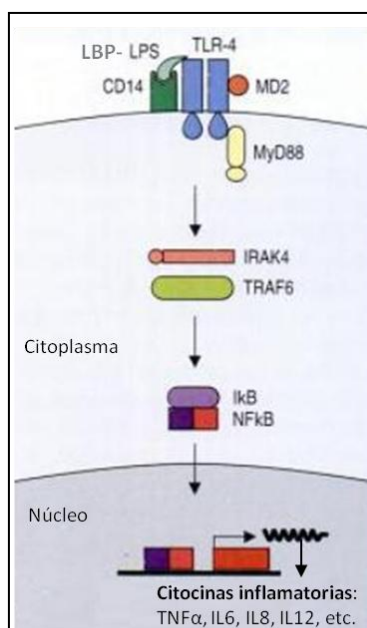


Fig. 1.9. Reconocimiento y activación de macrófagos por LPS de bacterias Gram negativas (Findlay y Hancock, 2004).

TLR2, 4 y 6 están implicados en el reconocimiento de *Candida albicans*. Este microorganismo es un hongo que habita en la cavidad oral, tracto gastrointestinal y urogenital, como comensal en una parte significativa de la población. En condiciones que alteran las defensas del hospedador es capaz de convertirse en patogénico, diseminándose a órganos internos donde produce infecciones denominadas candidiasis, que pueden ser de enorme gravedad. Los PAMPs específicos de *C. albicans* son principalmente componentes de la pared celular de la levadura (Fig. 1.10), tales como glucanos y quitina (presentes en los estratos más profundos de la pared celular) o fracciones de mananos y glicolípidos, como el fosfolipomanano (expresados en la superficie de la pared celular) (Poulain y Jouault, 2004; Pietrella *et al.*, 2006).

La señalización celular inducida por los TLR es necesaria para la fagocitosis y la lisis de *C. albicans*. Tras el reconocimiento de las levaduras, se pueden producir tanto citocinas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias dependiendo de los PAMPs expresados, conduciendo a la eliminación del patógeno o a la persistencia de la infección (Jouault *et al.*, 2009).

Introducción

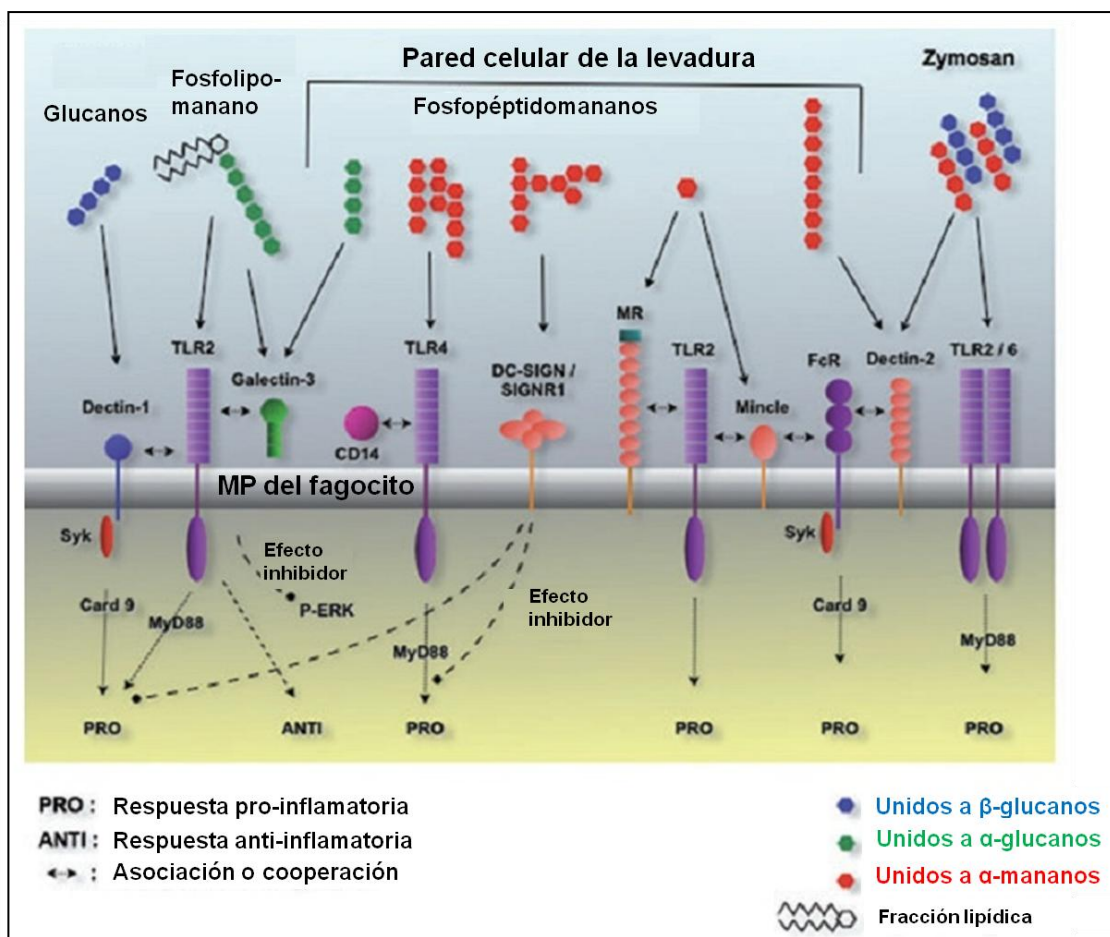


Fig. 1.10. Receptores y señalización implicada en la interacción de los fagocitos con *C. albicans*. (Adaptado de Jouault *et al.*, 2009).

TLR9 es el responsable del reconocimiento del **DNA bacteriano**. A diferencia del DNA de los vertebrados, el DNA bacteriano contiene múltiples series de dinucleótidos no metilados (denominados motivos CpG, que son regiones del DNA ricas en citosina y guanina) que a través del TLR9 se convierten en importantes activadores de las células del sistema inmunitario innato (Krieg, 2002).

1.5.2. Receptores tipo NOD (NLR).

Esta familia de proteínas se llama así por NOD (del inglés, *Nucleotide Oligomerization Domain-containing protein*). Los receptores tipo NOD (**NLR**, del inglés *NOD-like receptors*) son proteínas citosólicas capaces de detectar la presencia de PAMPs y DAMPs en el citoplasma y reclutar otras proteínas para formar complejos transmisores de señales que promueven la inflamación, llamados **inflamomas** (Fig. 1.11). Estos NLRs contienen al menos tres dominios diferentes con estructuras y funciones distintas. Entre ellos un dominio rico en leucinas (LRR) que detecta la

presencia del ligando, similar a las repeticiones de leucina de los TLRs, un dominio NACHT que tiene actividad ATPasa, y permite al NLR unirse a otro y formar oligómeros, y un dominio efector, que recluta otras proteínas para formar complejos transmisores de señales.

Atendiendo al dominio efector este puede ser un dominio pirina (PYD), un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD), o un dominio BIR (dominio de repeticiones IAP de *Baculovirus*), donde IAP significa proteína inhibidora de apoptosis.

Normalmente, los NLRs están presentes en el citoplasma en una conformación inactiva o auto-reprimida. Tras reconocimiento de un PAMP o DAMP, la NLR inactiva cambia su conformación exponiendo el dominio de oligomerización NACHT. A través de la oligomerización, las proteínas NLR forman hexámeros o heptámeros, mientras que los dominios efectores PYD o CARD, se vuelven accesibles para formar interacciones homofílicas con otros dominios PYD o CARD de otras moléculas efectoras, incluyendo proteínas adaptadoras, caspasas o quinasas, formando el complejo inflammasoma (Zhang y Mosser, 2008).

La subfamilia NLRP (NLR con dominio efector PYD), en concreto NLRP3, tras unirse a un ligando, se unen para formar un oligómero, donde cada NLRP3 individual es capaz de unirse a una proteína adaptadora llamada ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*). Los adaptadores se unen posteriormente a un precursor inactivo de la enzima CASP1, a través de interacciones con dominios CARD situados en ambas proteínas. La CASP1 es una proteasa que se activa solo tras el reclutamiento del complejo inflammasoma, y su función principal es escindir el precursor citoplasmático inactivo de IL-1 β para dar lugar a la forma activa de esta citocina, que será secretada para llevar a cabo su función pro-inflamatoria (Fig. 1.11) (Hoque *et al.*, 2013).

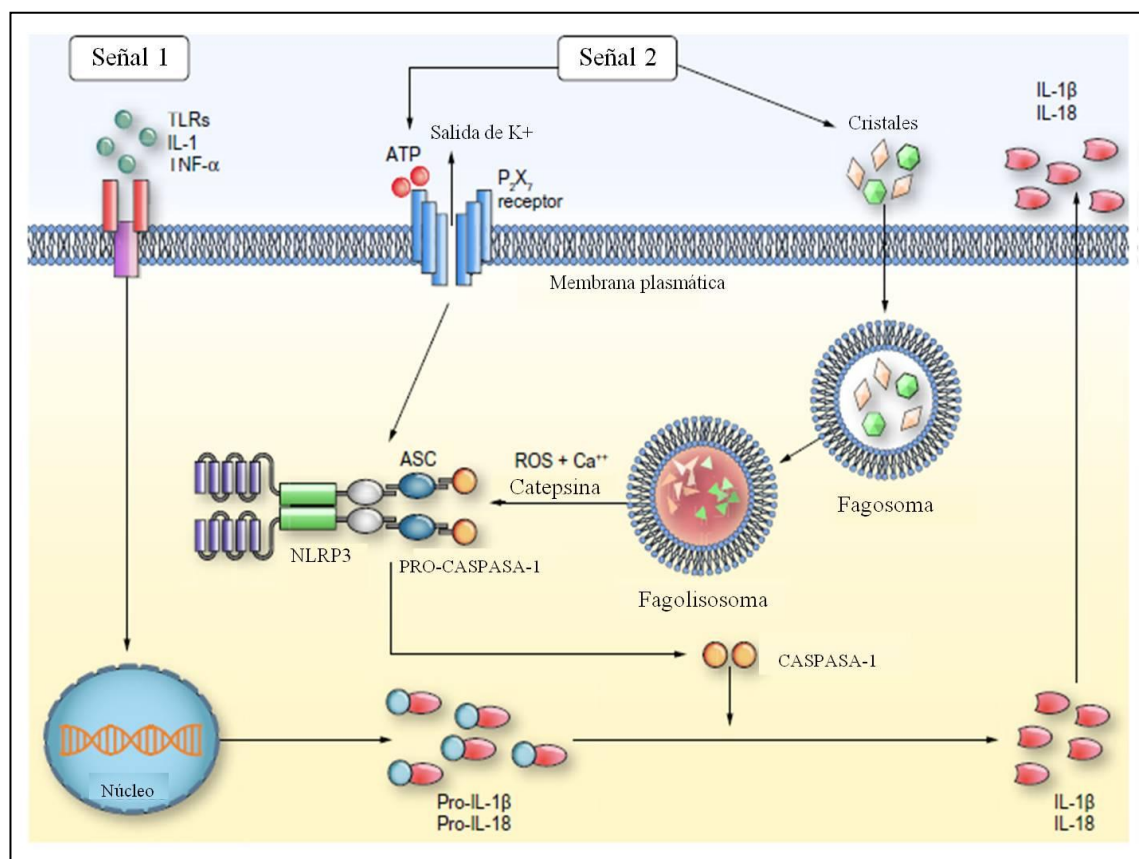


Fig. 1.11. Mecanismo de activación del inflamasoma. Se requieren dos tipos de señales para la activación del inflamasoma y producción de IL-1β. La primera señal es resultado de la producción de pro-IL-1β a través de la interacción de varios DAMPs/PAMPs y citocinas con sus receptores. La segunda señal conduce a la activación del inflamasoma a través de múltiples rutas de señalización, que activan la CASP1, que hidroliza la pro-IL-1β, liberando la forma madura y activa de IL-1β (adaptado de Hoque *et al.*, 2013).

1.6. Transducción de la señal mediada por receptores de PAMPs y DAMPs.

Tras el reconocimiento de un patógeno, los PRRs inician las respuestas inductoras de señales, lo que provoca una cascada de transducción de la señal a través de la célula que ha sido conservada evolutivamente. Estos receptores, al unirse a sus ligandos, sufren cambios conformacionales que promueven las interacciones con otras moléculas transductoras de señales que se activan, produciendo efectos como la adición enzimática de un fosfato en un tirosina, serina o cadena lateral de treonina mediante proteína quinasas. Finalmente se produce la activación de factores de transcripción, que tras su entrada al núcleo celular ponen en marcha la transcripción de genes específicos. Para cada tipo de fosforilación, hay una enzima fosfatasa específica que puede eliminar esos

fosfatos y así modificar las señales, desempeñando importantes funciones, habitualmente inhibitoras, en la transducción de señales.

1.6.1. Señalización vía MAPK.

Las MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) son un grupo de proteínas serina/treonina quinasas altamente conservados en eucariotas, que juegan importantes papeles en una amplia variedad de procesos celulares como proliferación, diferenciación, respuesta al estrés, apoptosis y defensa inmunitaria. En estas últimas, las MAPKs son críticas para la síntesis de numerosas citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios que movilizan al sistema inmunitario. Existen tres subfamilias de MAPKs bien definidas: ERK, JNK y p38 (Fig. 1.12). La ruta MAPK es activada a través de una cascada de fosforilaciones en cadena, donde MAPK quinasa quinasa (MAPKKK/MAP3K/MEKK/MKKK) fosforila a MAPK quinasa (MAPKK/MAP2K/MEK/MKK), que fosforila a MAPK, que puede fosforilar un amplio rango de dianas aguas abajo, o bien puede traslocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción como AP-1 o NF- κ B, influenciando la transcripción de genes (Abbas *et al.*, 2012). Estas MAPKs son activadas por fosforilaciones duales en motivos tripéptidos Thr-Xaa-Tyr, que son diferentes para cada grupo de MAPK: ERK (Thr-Glu-Tyr); p38 (Thr-Gly-Tyr); y JNK (Thr-Pro-Tyr).

ERK (*Extracellular signal-regulated Kinase*) constituye el módulo de señalización mejor conservado a través de la evolución y el más ampliamente estudiado, y es activado en células de mamíferos vía estimulación de receptores tirosina quinasas, receptores acoplados a proteínas G e integrinas. Esta señal de superficie celular converge hacia la activación de varias proteínas, que finalmente fosforilan ERK, que una vez activada, fosforila numerosos sustratos situados en todos los compartimentos de la célula. La activación de ERK es esencial para el crecimiento celular y proporciona una respuesta integrada, activando mediante factores de transcripción como NF- κ B y c-Fos, la transcripción de muchos genes. ERK1 y ERK2 constituyen los componentes centrales de esta cascada y se expresan ubicuamente. Son muy similares y presentan la misma especificidad de sustrato; sin embargo, en ratones se ha visto que la ausencia de ERK2 produce muerte durante el desarrollo embrionario, mientras que la ausencia de ERK1 da lugar a ratones viables y fértiles, por lo que ERK2 puede estar supliendo la función de ambas (Abbas, 2012).

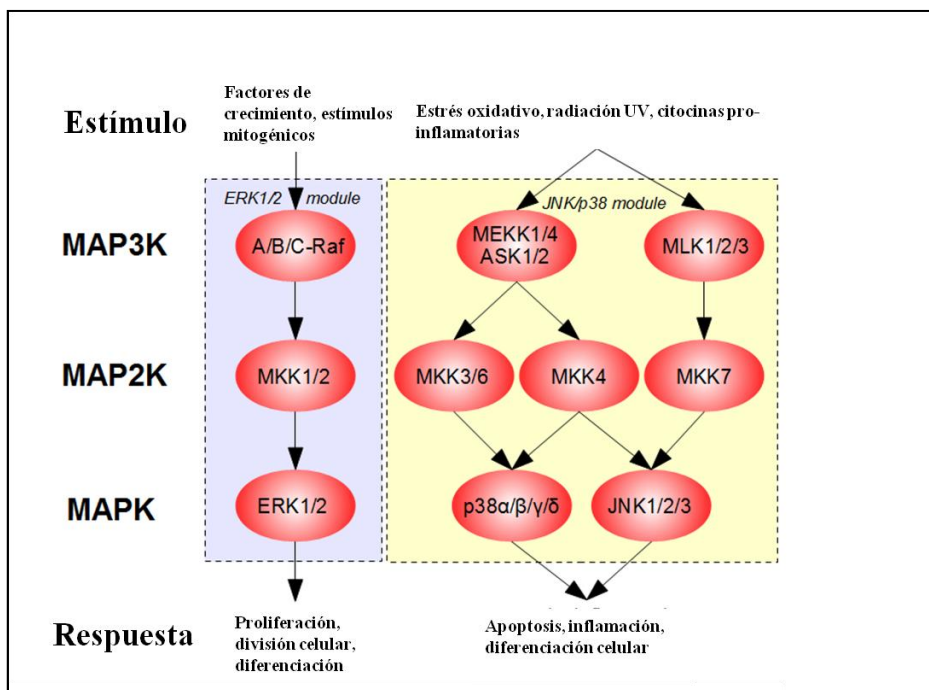


Fig. 1.12. Vista simplificada de la cascada de señalización intracelular MAPK. (Adaptado de www.cellsignal.com/pathways/map-kinase).

JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) forma parte de una ruta de transducción de señales también conservada evolutivamente. Se activa principalmente por citocinas como IL-1, TNF- α y TFG- β , exposición al estrés ambiental, y por activación de TLRs. La activación de JNK por receptores de citocinas es mediada por proteínas adaptadoras denominadas TRAF (*TNF Receptor-Associated Factor*). Su mayor diana en la ruta de señalización, es el factor de transcripción AP-1, que es activado por la fosforilación de c-Jun, c-Fos y moléculas relacionadas, y también STAT1. JNK está implicada en la activación de la ruta apoptótica mitocondrial, mediante activación de varios miembros pro-apoptóticos e inhibición de proteínas anti-apoptóticas. (Abbas, 2012).

p38 MAPK fue descubierta y clonada estudiando las rutas de señalización intracelular de respuesta inflamatoria y de estrés. Se activa entre otros, por estrés ambiental, LPS y citocinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- α . Una vez activada fosforila proteína quinasas aguas abajo y factores de transcripción como ATF (*Activating Transcription Factor*), STAT1, conduciendo a la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8. La fosforilación de los sustratos de p38 es esencial para ejecutar sus funciones biológicas, como la regulación del ciclo celular, desarrollo y diferenciación celular, senescencia, tumorigénesis, apoptosis y respuesta inmunitaria (Cook *et al.*, 2007).

1.6.2. Señalización vía PI3K/Akt.

La **proteína quinasa B**, también denominada **Akt (PKB/Akt)**, es una serina/treonina quinasa, cuya cascada de señalización se ve activada por receptores tirosina quinasa, integrinas, receptores de citocinas, receptores acoplados a proteínas G, numerosos factores de crecimiento e insulina entre otros. Tras producirse la unión ligando-receptor, la enzima PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato a fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato que actúa como segundo mensajero de la ruta (Fig. 1.13). Akt es una proteína citosólica soluble que es reclutada a la MP para unirse a estos lípidos con alta afinidad; es fosforilada por PDK1 (*Phosphoinositide-dependent Kinase 1*) y tras ser activada, se disocia de la MP y fosforila varios sustratos en el citoplasma y el núcleo (Fig. 1.13) (Sale y Sale, 2008). Existen 3 isoformas de Akt que están altamente conservadas en eucariotas superiores y juegan un papel central en la regulación del metabolismo, apoptosis, transcripción y ciclo celular. Akt es el mayor mediador de la supervivencia celular, a través de la inhibición directa de señales pro-apoptóticas. (Vivanco y Sawyers, 2002).

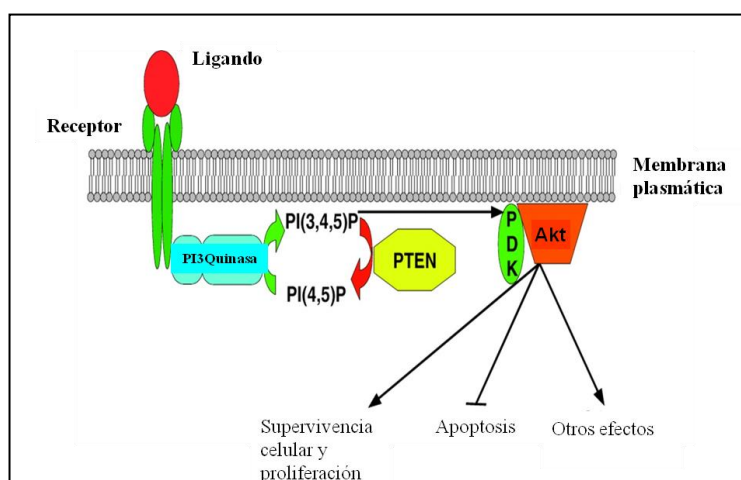


Fig. 1.13. Ruta PKB/Akt (adaptado de Planchon *et al.*, 2008).

1.6.3. Factores de transcripción.

NF-κB es un factor de transcripción implicado en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, supervivencia celular, proliferación y diferenciación. Su activación tiene consecuencias normalmente pro-inflamatorias y anti-apoptóticas. Entre los activadores de NF-κB tenemos LPS, virus, citocinas pro-inflamatorias y daño en el DNA. Este

Introducción

factor de transcripción adquiere una elevada importancia en diversas enfermedades donde su actividad se presenta desregulada. NF- κ B es un heterodímero formado por dos subunidades denominadas p50 y p65. En células no estimuladas, este factor de transcripción se encuentra en el citoplasma de manera inactivo mediante una molécula inhibidora de κ B (I κ B). Cuando existe estimulación, se produce la fosforilación de I κ B por el complejo de la quinasa I κ B (IKK) marcándola para su degradación por la ruta ubiquitina/proteasoma, permitiéndose así la liberación de NF- κ B, que es traslocado al núcleo de la célula, donde regula la transcripción de genes diana (Fig. 1.14). IKK juega un papel extremadamente importante en la activación de NF- κ B (Perkins, 2007).

AP-1 es un factor de transcripción implicado en la regulación de la diferenciación, proliferación y muerte celular. Está formado por homodímeros o heterodímeros compuestos por proteínas pertenecientes a las familias c-Jun, c-Fos y ATF, que regulan la expresión de genes relacionados con la respuesta a varios estímulos como citocinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones virales y bacterianas. La cascada de señalización de las MAPKs es su mediador intracelular más importante (Mandrekar y Szabo, 2009) y conlleva a la activación de la transcripción de citocinas pro-inflamatorias.

STAT. La ruta JAK/STAT está implicada en la proliferación celular, diferenciación, respuesta inmune, migración y apoptosis. Esta ruta constituye un mecanismo principal de señalización ante la llegada de citocinas y factores de crecimiento a sus receptores. La activación del receptor, activa JAKs (*Janus Kinases*), que se autofosforilan permitiendo el reclutamiento de diferentes tipos de factores de transcripción STAT., los cuales serán fosforilados, dimerizarán y serán traslocados al núcleo donde se unirán al DNA promoviendo la transcripción de genes que responden a estos factores de transcripción (Rawlings *et al.*, 2004).

En el proceso de transducción de la señal a través de TLRs están implicadas proteínas adaptadoras como el factor MyD88 (*Myeloid Differentiation 88 factor*) que contienen el dominio TIR, lo que facilita el reclutamiento y la activación de las MAPKs y lleva a la activación de diferentes factores de transcripción NF- κ B y AP-1. MAPKs como ERK, JNK y p38, pueden jugar un papel crucial en la producción de citocinas pro-inflamatorias por aumento de transcripción génica vía factores de transcripción AP-

1 y NF-κB, así como por incremento de la estabilidad de los mRNAs de los genes que codifican esas citocinas (Fig. 1.14) (Zhang y Mosser, 2008).

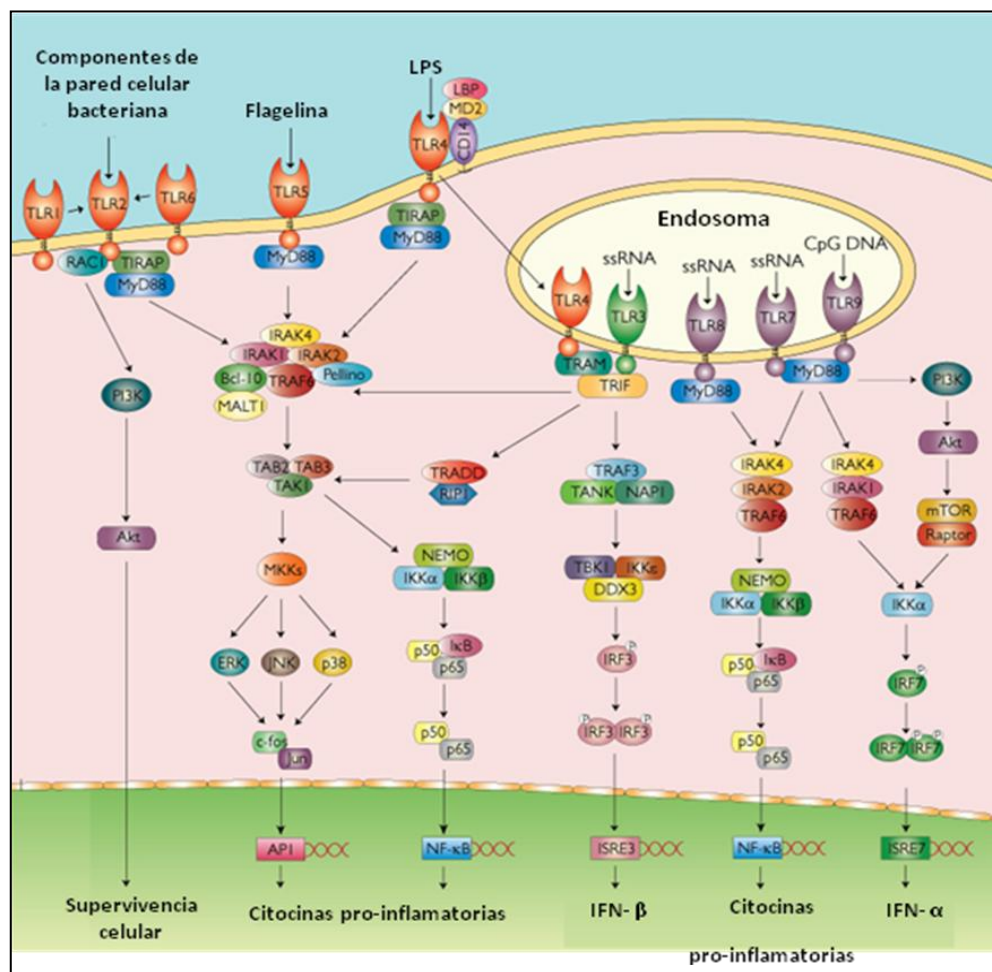


Fig. 1.14. Diagrama de las rutas de señalización iniciadas en los TLRs por componentes microbianos. La unión de estos ligandos a los TLRs provoca cambios conformacionales que conducen al reclutamiento de IRAK (*Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase*) y TRAF-6 mediado por las proteínas MyD88 y TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*). TRAF-6 puede activar tanto la ruta NF-κB como la de MAPK. NF-κB es crítico para la transcripción de genes de respuesta inflamatoria. Las MAPKs ERK, JNK, y p38 también regulan la expresión de varios genes inflamatorios, incrementando la transcripción génica, y p38 en particular, la estabilidad del mRNA. (Recuperado de <http://www.ibiantech.com/ligandos-especificos-para-tlrs>).

1.7. Patologías relacionadas con la inflamación.

La respuesta inmunitaria, como todos los sistemas biológicos, debe estar sometida a mecanismos de control. Estos restablecen el sistema inmunitario a un estado de reposo en el momento en que ya no se necesita una respuesta frente a un antígeno determinado.

Introducción

Como hemos explicado, las funciones de las citocinas sobre sus células diana están implicadas en múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis. Por tanto la habilidad de las citocinas de señalizar y activar diferentes tipos celulares debe estar fuertemente controlada, ya que la señalización descoordinada de citocinas correlaciona con diferentes estados patofisiológicos, que incluyen enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, desórdenes neoplásicos, cáncer o enfermedades autoinmunes.

La inflamación parece estar implicada en la mayoría de las enfermedades crónicas por lo que se están dedicando grandes esfuerzos y recursos al desarrollo de fármacos anti-inflamatorios. Sin embargo, debido a su naturaleza, la inflamación crónica representa un reto para la intervención terapéutica ya que se necesitan fármacos que sean efectivos, con pocos efectos secundarios y que puedan ser empleados durante un largo periodo de tiempo. De esta manera, existe una gran actividad dedicada a la búsqueda de nuevas dianas para el desarrollo de fármacos específicos, potentes y sin efectos secundarios. En este sentido, se está avanzando en el tratamiento dirigido a neutralizar la actividad de las citocinas y sus receptores, mediante anticuerpos monoclonales y antagonistas (Braddock y Quinn., 2004; Dinarello, 2011). Estudios recientes muestran que los inhibidores de algunas moléculas de las rutas de señalización intracelular implicadas en el inicio y mantenimiento de la inflamación, como ERK, JNK, p38 MAPK o IKK β presentan actividad anti-inflamatoria y se están empleando en estudios preclínicos y clínicos para algunas patologías como artritis reumatoide o enfermedad pulmonar crónica obstructiva (Karin, 2005; Lukey *et al.*, 2012).

1.8. Cirrosis hepática.

La cirrosis hepática es una patología del hígado que surge como estadio final de las enfermedades hepáticas crónicas progresivas. Cursa de forma subclínica durante un largo periodo de tiempo y está causada principalmente por una ingesta excesiva y prolongada de alcohol o por infecciones virales como las causadas por el Virus de la Hepatitis C (HCV) (Mas *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2008). Según la Organización Mundial de la Salud, la cirrosis es responsable aproximadamente de un millón de muertes anuales en todo el mundo constituyendo un problema de salud a nivel mundial de primer orden. En España, la prevalencia de esta enfermedad oscila entre el 1-2% de la población, de ellos, aproximadamente un 40% de los casos de cirrosis se

deben al HCV y un 50% se deben al alcoholismo, afectando a 2.5 hombres por cada mujer (García-Buey *et al.*, 2012). La toxicidad hepática del alcohol tiene lugar por un complejo mecanismo que va desde la hepatotoxicidad directa del acetaldehído, hasta procesos de fibrogénesis mediados por citocinas. El desarrollo de cirrosis hepática también puede estar ocasionado por otras enfermedades víricas como las producidas por el virus de la hepatitis B, por enfermedades metabólicas congénitas del hígado como la hemocromatosis, por la enfermedad de Wilson, la hepatitis autoinmune, o la esteatohepatitis no alcohólica asociada a diabetes o dislipemia (Iredale, 2003). Todas ellas pueden producir daño tisular, inflamación, apoptosis y necrosis hepatocitaria.

La inflamación, es el proceso normal por el que el hígado responde al daño, en un intento de restaurar la estructura y función original, permitiendo el mantenimiento de la homeostasis tisular. En ocasiones, la lesión es demasiado intensa o persistente, y el propio proceso inflamatorio compromete la integridad estructural del órgano a través de procesos como la fibrosis, en el que se reemplazan las estructuras dañadas por tejido anormal fibrótico. El tipo de reparación celular que predomine, regeneración o fibrosis, determinará que el tejido hepático se recupere, o bien que la fibrosis progrese, y esta regeneración tisular anormal conduzca a la cirrosis (Fig. 1.15).

Los macrófagos, células pertenecientes al sistema inmunitario innato, juegan un papel crucial en el desarrollo de la fibrosis del hígado. La liberación de las citocinas; IL-1 β y TNF- α por estos macrófagos hepáticos produce un aumento de la supervivencia de los miofibroblastos y de las células hepáticas estrelladas (HSCs) a través de una profunda activación del factor de transcripción NF- κ B, promoviendo así la fibrosis (Pradere *et al.*, 2013). Las HSCs están consideradas como el principal tipo celular fibrogénico del hígado, y son responsables de la producción de varios tipos de matriz extracelular (Fig. 1.15). Éstas células HSCs experimentan un proceso de activación bien caracterizado durante el cual pierden sus compartimentos característicos de almacén de lípidos y vitamina A, hacia un fenotipo miofibroblástico (Bataller y Brenner, 2005; Friedman, 2008).

La acumulación de fibras delimita nódulos, que aíslan áreas de tejido hepático, produciéndose como consecuencia una alteración de la arquitectura del hígado que dificulta la relación entre los hepatocitos y los vasos sanguíneos (Fig. 1.15, Fig. 1.16) De esta manera se ven alteradas muchas de las funciones llevadas a cabo por este órgano, tales como la degradación de toxinas y fármacos, la regulación del metabolismo

Introducción

de carbohidratos, lípidos y proteínas y/o la síntesis de proteínas y otras moléculas, entre otras (Terai *et al.*, 2006).

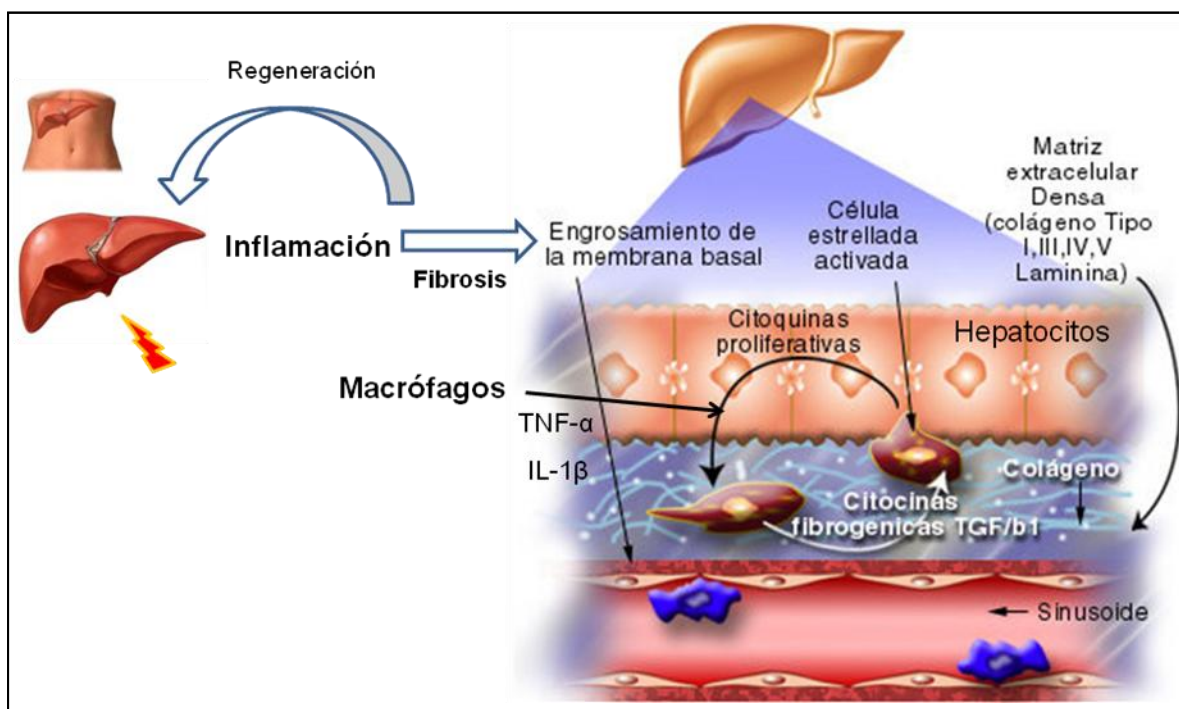


Fig.1.15. Esquema del proceso de generación de fibrosis hepática. Al iniciarse el proceso fibrótico, la formación de fibras compromete la estructura original del órgano, aislando las células hepáticas de los sinusoides sanguíneos, dando lugar a una función anómala del hígado. Parte de la figura ha sido adaptada de Dasarathy, 2008.

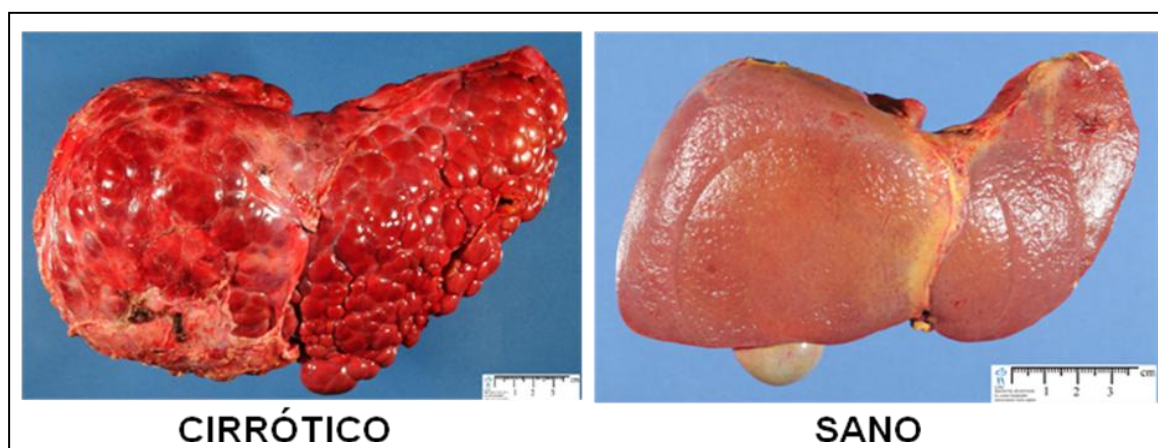


Fig. 1.16. Imagen comparativa de un hígado cirrótico y un hígado sano. Imágenes obtenidas de www.humpath.com.

La cirrosis conlleva a la destrucción hepática y en algunos casos la muerte, dado que las opciones terapéuticas son limitadas (Fig. 1.16). Sin embargo, la tradicional visión de la enfermedad hepática como un proceso irreversible ha quedado obsoleta,

debido a que existen evidencias de que la fibrosis hepática es un proceso dinámico y potencialmente bidireccional (Pellicoro *et al.*, 2012). El tratamiento definitivo para lo que se describe actualmente como fibrosis irreversible es el trasplante hepático, que se realiza solamente en los pacientes en que se estima una supervivencia menor de dos años a consecuencia de la cirrosis, y en los que no existe contraindicación para realizarlo por otros motivos. El incremento en la mortalidad se atribuye directamente a dos factores: pérdida de la funcionalidad del hígado (insuficiencia hepatocelular) e hipertensión portal (aumento de la tensión normal de la vena porta) que cursa con ascitis, varices y sangrado (De Franchis y Dell'Era, 2007) (Fig. 1.17).

En la evolución de la enfermedad, podemos distinguir dos fases: la cirrosis compensada y la descompensada. Esta diferenciación tiene en cuenta que los pacientes hayan o no desarrollado las complicaciones propias de la enfermedad. De hecho, es habitual que la cirrosis curse con un período asintomático u oligosintomático, cuya duración es variable y suele conocerse como fase compensada de la enfermedad. En cuanto a la cirrosis descompensada, las complicaciones paradigmáticas que la definen son: **ascitis** (acumulación de líquido en la cavidad abdominal que puede infectarse ocasionando peritonitis bacteriana espontánea), **encefalopatía hepática** (deterioro de la función neurológica debido al paso desde la circulación portal de sustancias no depuradas por el hígado que resultan tóxicas), **hemorragia digestiva** (por la aparición de varices esofágicas), e **ictericia** (tinte amarillento de la piel y las mucosas a consecuencia de la acumulación de bilirrubina). Además de las complicaciones descritas, la enfermedad va acompañada de fallo cardíaco y renal, y destaca el riesgo aumentado que tienen los pacientes con cirrosis hepática de desarrollar **hepatocarcinoma** (Fig.1.17).

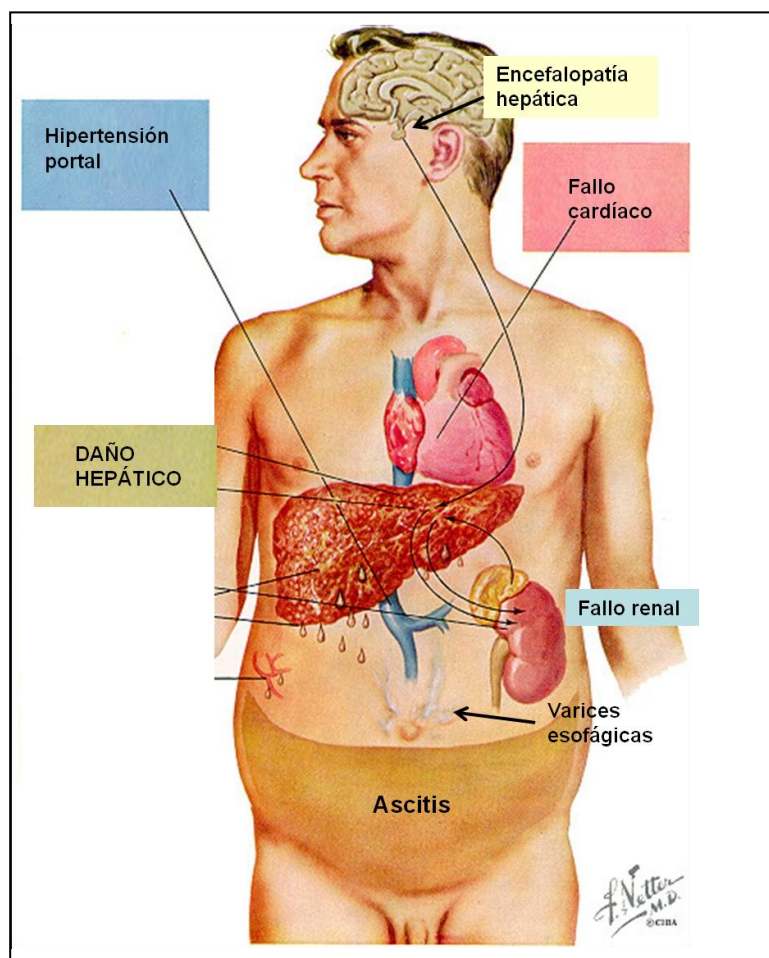


Fig. 1.17. Esquema de las principales complicaciones durante la cirrosis hepática descompensada.

En medicina, la **escala o clasificación de Child-Pugh** se usa para evaluar el pronóstico de una enfermedad hepática crónica, principalmente la cirrosis (Tabla 1.II). La clasificación Child-Pugh se realiza de acuerdo al grado de ascitis, las concentraciones plasmáticas de bilirrubina y albúmina, el tiempo de protrombina, y el grado de encefalopatía; clasificándose en A, B, o C según el daño hepático empleándose la sumatoria de la puntuación de la escala (Child y Turcotte, 1964; Pugh *et al.*, 1973).

Tabla 1.II. Clasificación Child-Pugh y grado de supervivencia en pacientes con cirrosis hepática.

Puntos	Clase	Supervivencia al cabo de 1 año	Supervivencia al cabo de 2 años
5-6	A	100%	85%
7-9	B	81%	57%
10-15	C	45%	35%

1.9. Ascitis.

La aparición de ascitis o líquido ascítico (AF, del inglés, *Ascitic Fluid*) es la complicación más frecuente que ocurre en pacientes con cirrosis hepática, desarrollándose en el 50% de los casos en un periodo de diez años tras la diagnosis inicial. Consiste en la acumulación patológica de líquido seroso en la cavidad abdominal.

La cirrosis es responsable en el 80% de los casos de la aparición de ascitis, marcando un punto decisivo en el pronóstico de pacientes con cirrosis, indicando una tasa de mortalidad del 50% entre los dos y cinco años posteriores a su primera aparición (Kuiper *et al.*, 2007).

La principal causa que induce la aparición de ascitis es la hipertensión portal (presiones superiores a 12 mmHg), y específicamente la hipertensión sinusoidal, consecuencia de la cirrosis hepática alcohólica y la cirrosis por hepatitis crónicas víricas de larga evolución, como las causadas por el HCV o el virus de la hepatitis B.

La hipertensión portal causa vasodilatación esplácnica principalmente debido a un incremento de la producción local de óxido nítrico, creando así una circulación hiperdinámica. Esto resulta en un incremento en la presión y permeabilidad capilar y una disminución del volumen de sangre arterial efectivo. Los mecanismos de acomodación para esta reducción del volumen de sangre arterial son el aumento del volumen plasmático y del gasto cardíaco. La activación del sistema nervioso simpático y del sistema renina-angiotensina-aldosterona conlleva a una retención de agua y sodio por los riñones, facilitando la formación de ascitis (Kuiper *et al.*, 2007), en el que por acción mecánica se puede detectar la presencia de diversos tipos de células sanguíneas. El médico puede practicar una paracentesis (Fig. 1.18) con el fin de obtener una pequeña muestra de AF para su análisis o para extraer un exceso del mismo retirando varios litros para aliviar la distensión abdominal (paracentesis evacuadora).

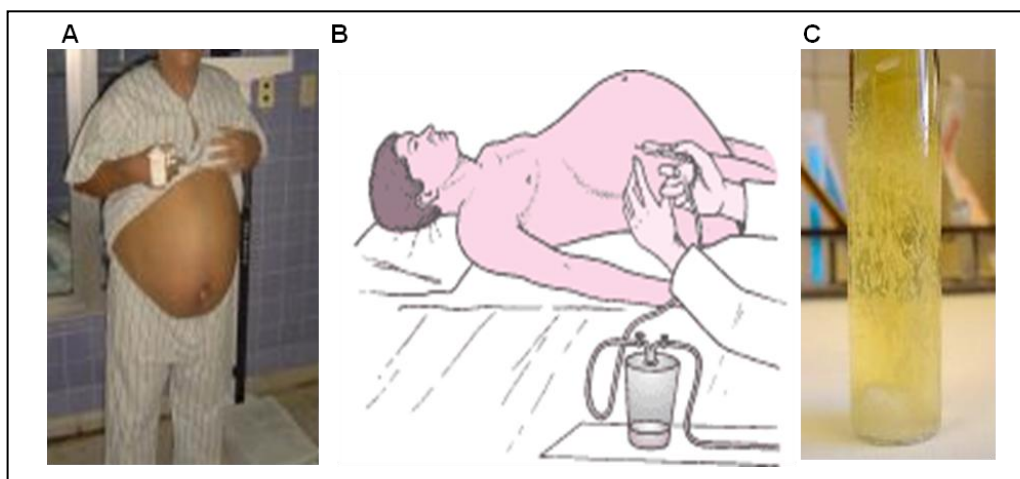


Fig. 1.18. A) Imagen de un paciente con cirrosis hepática y ascitis. B) Esquema de la realización de una paracentesis evacuadora y C) Imagen de una muestra de AF.

1.10. Traslocación bacteriana y peritonitis bacteriana espontánea.

Las infecciones bacterianas son una complicación frecuente y grave en los pacientes con cirrosis y ascitis, con una incidencia del 32%, convirtiéndose en un agravante en la evolución de los pacientes con cirrosis (Riordan y Williams, 2006).

La traslocación bacteriana (BT) consiste en el paso de bacterias viables desde el tracto gastrointestinal hacia los ganglios linfáticos mesentéricos y de allí hacia la circulación sanguínea y otros órganos como hígado, bazo y riñón. Se estima que la incidencia de BT en pacientes con cirrosis y ascitis es aproximadamente del 30-40%. Los mecanismos que influyen en la patogenia de la BT son fundamentalmente: disrupción del equilibrio ecológico que permite un sobrecrecimiento bacteriano intestinal, incremento de la permeabilidad de la barrera intestinal, y alteraciones del sistema inmunológico local y sistémico (Bellot *et al.*, 2008; Berg, 1992). Estos mecanismos pueden actuar de forma conjunta para promover sinérgicamente la propagación sistémica de la BT causando sepsis letal.

El **sobrecrecimiento bacteriano intestinal** hace referencia a un incremento de la flora bacteriana intestinal, el cual es más frecuente en los pacientes cirróticos que en los controles (Casafont *et al.*, 1996), debido principalmente a un enlentecimiento del tránsito intestinal por un aumento en la síntesis de óxido nítrico (Chang *et al.*, 1998) y del estrés oxidativo de la pared intestinal (Bellot *et al.*, 2008), así como por una respuesta inmunitaria local de IgA alterada (Such y Runyon, 1998).

Para mantener la homeostasis en la mucosa intestinal, se necesita mantener un equilibrio entre la tolerancia y la respuesta de las poblaciones bacterianas residentes en esta zona. Los factores protectores consisten en la mucina secretada por las propias células de la mucosa intestinal, la estrecha unión existente entre estas células y también otros factores que controlan la densidad de estos microorganismos como son los péptidos antimicrobianos y los neutrófilos, así como las secreciones biliares que inhiben el sobrecrecimiento bacteriano (Lorenzo-Zúñiga *et al.*, 2003) dificultando la BT. En la mucosa intestinal de pacientes con cirrosis y ascitis, se producen alteraciones estructurales (incremento del espacio intraepitelial de las células) y funcionales que podrían **aumentar la permeabilidad intestinal** a bacterias y a sus productos como la endotoxina (Such *et al.*, 2002).

Se deben producir **alteraciones en la inmunidad** para que la BT sea clínicamente relevante, ya que pacientes inmunocompetentes no sufren este problema porque las bacterias que se traslocan a los ganglios linfáticos mesentéricos o sangre portal son rápidamente fagocitados y neutralizados, no llegando a ser patológicos. El tracto digestivo contiene el tejido linfoide asociado al intestino, conformado por cuatro compartimentos linfoides: las placas de Peyer, los linfocitos de la lámina propia, los linfocitos intraepiteliales y los ganglios linfáticos mesentéricos que intervienen en la respuesta innata y adaptativa.

En modelos de cirrosis hepática inducida por administración intragástrica de tetracloruro de carbono y fenobarbital en ratas, se detecta BT a los nódulos mesentéricos donde se produce una activación polarizada a células Th1 y macrófagos activados clásicamente, que producen IFN- γ y TNF- α respectivamente y se expanden a sangre periférica, provocando una inflamación sistémica (Muñoz *et al.*, 2005).

La liberación de productos bacterianos durante la BT produce una respuesta inflamatoria a través de liberación de quimiocinas, citocinas e incremento de la liberación de óxido nítrico que se mantiene en la cirrosis descompensada y que empeora las alteraciones hemodinámicas de la cirrosis, sobre todo la vasodilatación esplácnica y el síndrome hiperdinámico (Bellot *et al.*, 2008), así como la disfunción hepática y la encefalopatía (Riordan y Williams, 2006).

Introducción

La síntesis de óxido nítrico, citocinas, especialmente TNF- α e interleucinas agrava el daño oxidativo de la mucosa intestinal (Unno *et al.*, 1997), lo que aumenta la permeabilidad intestinal favoreciendo la BT.

La peritonitis bacteriana espontánea (SBP), es la complicación más frecuente y clínicamente relevante en pacientes con cirrosis y ascitis, dado que su presencia compromete la supervivencia del paciente (Such y Runyon, 1998). Se produce como manifestación del desorden de la función hepática y consiste en la infección del líquido ascítico, normalmente con una única especie bacteriana, en ausencia de foco infeccioso intra-abdominal. Un 70% de las SBPs están causadas por bacilos aerobios Gram negativos de tipo entérico como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y en un 25% por cocos anaerobios facultativos Gram positivos como *Streptococcus sp.* y *Staphylococcus sp.* que proceden de la propia flora intestinal del paciente. Se considera que está presente en más de un 23% de pacientes cirróticos con ascitis que necesitan paracentesis (Riordan y Williams, 2006).

Los factores de predisposición para la SBP según Such y Runyon (1998) son: deficiencia de la actividad bactericida, severidad de la enfermedad hepática (el 70% de los casos ocurre en pacientes con Child-Pugh de clase C), nivel de bilirrubina total en suero mayor a 2.5 mg/dL, sangrado intestinal, sobrecrecimiento bacteriano intestinal y episodio previo de SBP, dado a que tienden a ser recurrentes.

El diagnóstico se realiza mediante el análisis del líquido ascítico obtenido por paracentesis, donde en ausencia de un foco identificable de infección, se considera SBP: i) cuando el conteo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en el líquido ascítico es superior o igual a 250 células/mm³; ii) cuando los niveles de albúmina en suero y ascitis para el cálculo del gradiente de albúmina suero-ascitis, que permite determinar con una precisión del 100% la presencia de hipertensión portal, son superiores o iguales a 1.1 g/L; y iii) cuando se determina el crecimiento de bacterias de un inóculo de líquido ascítico en botes estériles de hemocultivo.

El tratamiento preventivo de la SBP se realiza con antibióticos como la norfloxacina, que se emplea como profilaxis continua en pacientes de alto riesgo. Con este antibiótico se obtiene la resolución de más del 80% de los episodios de SBP y una supervivencia hospitalaria del 70-80% (Ginés *et al.*, 1990).

El concepto de BT se amplía para incluir no sólo el paso de bacterias viables, sino también a sus componentes, como el DNA bacteriano y la endotoxina o LPS, entre los más estudiados. Estos no son sólo marcadores inertes, ya que también provocan una activación sostenida del sistema inmunitario que agravan las alteraciones hemodinámicas presentes en pacientes con cirrosis. Pacientes con DNA bacteriano en el líquido ascítico y el plasma, presentan un peor pronóstico que los pacientes sin presencia de DNA bacteriano. La principal causa de mortalidad de estos pacientes parece ser la insuficiencia hepática, no habiendo diferencias en la prevalencia de SBP entre ambos grupos (Zapater *et al.*, 2008; Bellot *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

Los macrófagos, células pertenecientes al sistema inmunitario innato, conforman la primera línea de defensa del hospedador. Tienen un papel clave en el inicio, desarrollo y resolución de diversas patologías como la cirrosis hepática. Se necesita una comprensión más completa de los mecanismos moleculares implicados en la activación de macrófagos en este escenario patológico dirigidas al diseño de futuras dianas terapéuticas que permitan reducir la respuesta inflamatoria asociada al daño hepático.

Por ello el trabajo experimental desarrollado en la presente Memoria, se ha realizado atendiendo a los siguientes objetivos:

1. Analizar el estado de activación de los macrófagos peritoneales obtenidos de un escenario patológico y poco estudiado como la ascitis, de pacientes con cirrosis hepática descompensada.
2. Identificar las diferencias funcionales en el perfil inflamatorio de macrófagos procedentes de pacientes con cirrosis descompensada con diferente etiología (alcoholismo o HCV).
3. Explorar la importancia relativa de las rutas de la MAPK y PI3K-Akt en la liberación de citocinas pro- y anti-inflamatorias en macrófagos obtenidos de ascitis de pacientes con cirrosis hepática.
4. Estudiar la expresión de GAL-3 en macrófagos humanos peritoneales obtenidos de la ascitis de pacientes con cirrosis hepática y comparar con una población de referencia de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de donantes sanos.
5. Generación de un modelo de sobreexpresión de GAL-3 para el estudio de su función en macrófagos, mediante transducción con lentivirus en líneas celulares humanas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Pacientes.

Los pacientes admitidos en el estudio procedieron de la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante o de la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. La cirrosis fue diagnosticada por hallazgos histológicos, clínicos, de laboratorio y/o ultrasonográficos. Estos pacientes presentaban cirrosis hepática descompensada y fueron sometidos a paracentesis evacuadora debido al elevado volumen de ascitis (AF) presente en la cavidad abdominal (Fig. 3.1).



Fig. 3.1. Imagen de un paciente con cirrosis hepática y ascitis (izquierda). Imagen del AF en la cavidad peritoneal (derecha).

Los criterios de exclusión del estudio fueron: presencia de cultivos positivos en sangre o AF, niveles detectables de LPS en el AF, un recuento de PMN en AF igual o superior a $250/\mu\text{L}$ (Albillos *et al.*, 1990), signos o síntomas del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Rangel-Frausto *et al.*, 1995), hemorragia gastrointestinal, hepatocarcinoma celular según los criterios de Milán (Mazzaferro *et al.*, 1996) y/o trombosis portal, trasplante hepático previo, derivación porto-sistémica transyugular intrahepática, tratamiento con norfloxacina como profilaxis de SBP, edad superior a 80 o inferior a 18 años, otra etiología distinta a la ingesta alcohólica o infección por HCV y renuncia a participar en el estudio. Los comités éticos (Comité Ético de Investigación Clínica, del Hospital General de Alicante, Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia) aprobaron el protocolo de estudio y todos los pacientes fueron informados y consintieron ser incluidos en el estudio.

3.2. Muestras de ascitis y sangre.

El AF se obtuvo en condiciones asépticas mediante paracentesis evacuadora (Runyon, 1986) y se recolectó en bolsas Conveen (Coloplast, España). La extracción de este líquido se realizó por indicación clínica, y en ningún caso para obtener muestras de estudio. Todos los pacientes recibieron albúmina intravenosa tras la paracentesis (8 g/L ascitis) como protocolo a seguir, si el volumen de ascitis evacuado era mayor de 5 L. Se realizaron análisis bioquímicos de rutina y de recuento celular a las muestras de ascitis. Se recogieron muestras de sangre de los pacientes bajo condiciones asépticas en tubos estériles Vacutainer SST II tubes (BD Diagnostics, Bélgica), que nunca fueron expuestos al aire libre. En las muestras de sangre se realizó estudio hematológico de rutina, bioquímico y de coagulación. Tanto muestras de sangre como de ascitis fueron inoculadas en frascos de cultivo de sangre aeróbicos y anaeróbicos con un volumen final de 10 mL cada uno (Runyon *et al.*, 1988) para detectar posible crecimiento bacteriano. Además se evaluó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) la presencia de DNA bacteriano utilizando cebadores específicos para el gen 16SrRNA (RNA ribosómico) (Such *et al.*, 2002).

3.3. Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM).

3.3.1. Obtención de M-DM peritoneales del AF.

El contenido celular del AF se obtuvo mediante centrifugación del mismo a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos (min) a 4 °C en botes de capacidad de 600 mL cada uno. Las células obtenidas fueron lavadas y resuspendidas en tampón fosfato salino (PBS 5X= 40 g NaCl, 1 g KCl, 0.6 g KH₂PO₄, 1.55 g Na₂HPO₄, pH 7.2 diluido en 1 L de agua destilada). Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm a 4 °C y las células se resuspendieron en medio DMEM con glutaMAX (GIBCO Invitrogen, Paisley, Reino Unido), suplementado con un 10 % de suero de ternera fetal, previamente descomplementado por calentamiento a 56 °C durante 30 min, y con 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomicina (Flow Laboratories, Irvine, Reino Unido). Nos referiremos a este medio de cultivo completo como CCM en adelante.

Se contó el número de células y la proporción de los M-DM en la suspensión celular se determinó mediante criterios de tamaño, morfología y expresión de marcadores de superficie específicos por citometría de flujo (explicado en el apartado

3.4 de Materiales y Métodos). Se empleó el anticuerpo de ratón anti- CD14 humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD14-FITC (eBioscience, San Diego, CA, EEUU) y el anticuepo de ratón IgG1-FITC como isotipo control (BD-Pharmiguen, NJ, EEUU). Una vez conocido el porcentaje de monocitos/macrófagos peritoneales presentes en la muestra, estos fueron sembrados a la concentración requerida en función del análisis a realizar. Tras incubación durante la noche a 37 °C en CCM, las células fueron lavadas con CCM para eliminar aquellas células no adherentes, quedándonos así sólo con la fracción de M-DM que crecen adheridos al fondo del pocillo. La pureza de M-DM en los cultivos celulares fue evaluada posteriormente mediante citometría de flujo y resultó mayor del 95 %.

3.3.2. Obtención de M-DM de sangre periférica.

Los M-DM procedentes de sangre periférica de donantes sanos se usaron como patrón de referencia con el que comparar los resultados obtenidos en M-DM de AF. Además, se emplearon como control de los ensayos de dosis-respuesta de los estímulos empleados en este trabajo, debido a su disponibilidad.

Las muestras de sangre de voluntarios sanos se obtuvieron del Centro de Hemodonación de la Región de Murcia. La extracción de sangre no se realizó en ningún caso para la obtención de muestras de estudio. Las muestras de sangre, que originariamente se extraen para donación, y que no pueden ser empleadas en transfusiones debido a que no alcanzan o exceden el peso óptimo, son cedidas a la investigación.

Para llevar a cabo la separación de la porción linfo-monocítica de la sangre, se diluyó la misma con PBS estéril, en proporción 1:1 y se depositaron 35 mL de esta mezcla sobre 15 mL de Ficoll (Axis-Shield PoC As Oslo, Noruega) en tubos Falcon. La separación en gradiente de Ficoll se realizó mediante centrifugación a temperatura ambiente a 2000 rpm durante 20 min, sin emplear el freno al descender la velocidad para no deshacer el gradiente. Tras obtener la porción linfo-monocítica se procedió al lavado de las células con CCM y al recuento celular. Se empleó una alícuota de esta suspensión celular para determinar la pureza de los macrófagos de la muestra por citometría de flujo mediante criterios de tamaño, morfología y expresión de marcadores de superficie celular de M-DM, al igual que en el apartado anterior.

Una vez conocido el porcentaje de M-DM presentes en la muestra, las células fueron sembradas a diferentes concentraciones en placas de cultivo, en función del ensayo a realizar. Tras incubación durante 24 horas (h), las células fueron lavadas con CCM para eliminar aquellas células no adherentes, quedándonos así sólo con la fracción de M-DM adheridos al fondo del pocillo. La pureza de M-DM evaluada por citometría de flujo en los cultivos celulares fue mayor del 95 %.

3.3.3. Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares humanas: **THP-1**, procedente de una leucemia monocítica aguda obtenida de la sangre periférica de un varón de un año de edad; **HL-60**, procedente de una leucemia promielocítica aguda obtenida de la sangre periférica de una mujer de 36 años de edad; **U937**, procedente de un linfoma histiocítico obtenido de la pleura de un hombre de 37 años de edad; y **HEK293T**, línea celular epitelial procedente de un riñón embrionario humano. Para su conservación, las células se mantuvieron en CCM con 20 % de suero de ternera fetal y 10 % de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU), congeladas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido.

Las líneas celulares THP-1, HL-60 y U937 se cultivaron en suspensión en frascos para cultivos ventilados de 25 o 75 cm³ (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania), en una estufa de cultivos celulares a 37 °C con un 5 % de CO₂. El medio de cultivo empleado, CCM fue igual que el descrito anteriormente, sustituyendo el DMEM por RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen, Paisley, Reino Unido). De forma rutinaria se mantuvieron las células en cultivo, refrescando el mismo cada dos días. Para realizar un nuevo subcultivo, se retiró el medio con las células en suspensión del frasco de cultivo, se centrifugaron a 1200-1500 rpm, 5 min a 4 °C y fueron resuspendidas en CCM fresco. Tras el recuento celular en hemocitómetro, se comenzó el nuevo subcultivo con una concentración de 0.1×10^6 cél/mL para las tres líneas celulares.

Para llevar a cabo la diferenciación a M-DM de las líneas celulares THP-1, HL-60 y U937, se sembraron 2×10^6 cél/pocillo en placas de cultivo celular de 6 pocillos en CCM y se incubaron durante 24 h con forbol 12-miristato 14-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) a concentración de 10 ng/mL. Esta sustancia es un análogo al activador natural de la enzima proteína quinasa C, el diacilglicerol, que juega un papel crucial en la activación de cascadas de transducción de señales como

regulador de la transcripción, mediador de la respuesta inmune y regulador del crecimiento celular, entre otros. Durante las 24 h de incubación, las células que estaban en suspensión, se adhirieron al fondo del pocillo adquiriendo la morfología característica de los macrófagos (Fig. 3.2). Posteriormente, se eliminó el medio con el PMA, se adicionó CCM fresco y se dejó descansar el cultivo durante un periodo de 24 h. Transcurrido este tiempo los M-DM diferenciados procedentes de las líneas celulares descritas anteriormente fueron empleados para los ensayos pertinentes.

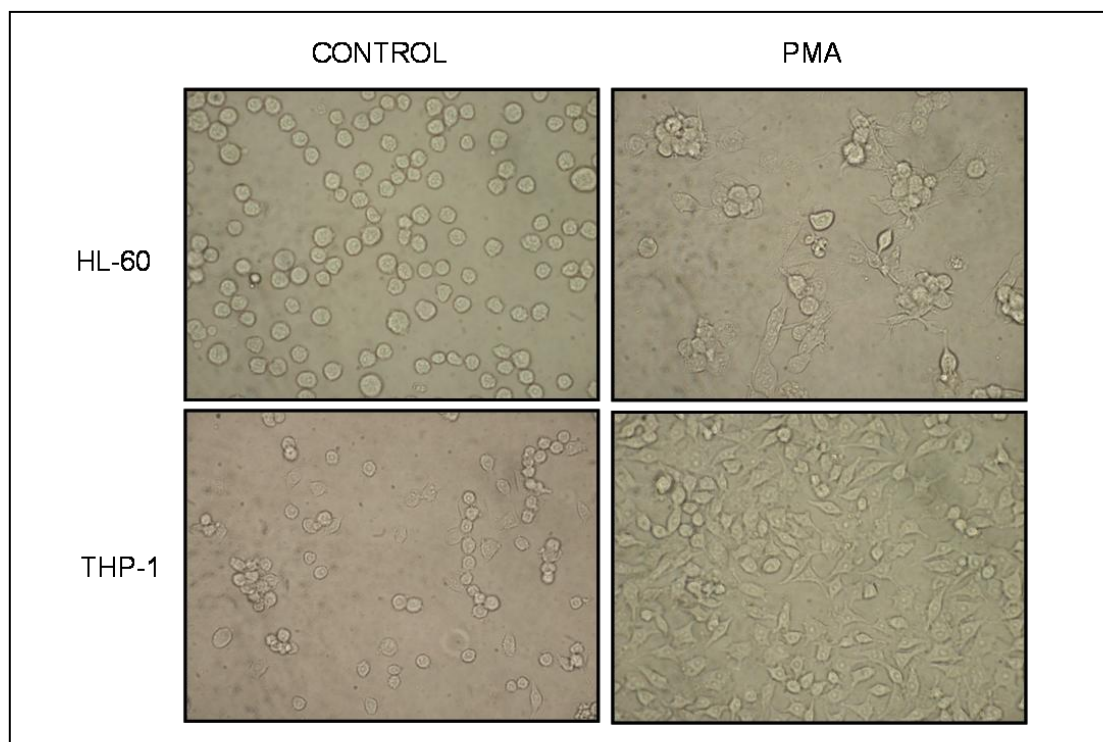


Fig. 3.2. Morfología típica de las líneas celulares THP-1 y HL-60 tras la diferenciación con PMA. Las fotografías fueron obtenidas mediante el acoplamiento de una cámara digital Olympus 4.1 Megapixel al microscopio óptico Olympus IX70 con un objetivo de 20X.

Las células de la línea HEK293T se cultivaron en CCM a 37°C y 10% de CO₂ en placas de 10 cm de diámetro para células adherentes hasta alcanzar una confluencia del 90%, para ser empleadas en ensayos de transfección, o bien fueron despegadas con Triplex (Triple Express 12601, GIBCO, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) para realizar un nuevo subcultivo.

3.4. Tinción de células. Análisis por citometría de flujo.

Para determinar el porcentaje de M-DM en el AF de pacientes con cirrosis o en sangre periférica procedente de donantes sanos, las células fueron teñidas con anticuerpos monoclonales y analizadas por citometría de flujo. El anticuerpo empleado para tinción directa fue de ratón específico para CD14 humano, CD14-FITC (BD-Pharmingen, NJ, EEUU).

La identificación de las poblaciones de los diferentes tipos celulares de los M-DM de ascitis representada en la Fig. 4.1 de la sección de Resultados fue realizada por la Dra. Hernández-Caselles. Para ello se emplearon los siguientes anticuerpos: anticuerpo de ratón CD14-FITC (eBioscience, San Diego, CA, EEUU), CD3-FITC, CD19 marcado con ficoeritrina (PE) y Cyano dye 5 (Cy5), CD19-PE-Cy5, CD14-PE y CD16-PE-Cy5, CD54-PE, CD86-PE, HLA-DR-FITC (BD-Pharmingen, NJ, EEUU). Los anticuerpos de ratón específicos para IgG1-FITC, IgG1-PE Cy5, IgG2b-FITC e IgG2b-PE humanos, fueron usados como isotipos control (BD-Pharmingen, NJ, EEUU).

Para determinar la expresión en superficie de GAL-3 en los M-DM, se realizó tinción indirecta mediante el uso del anticuerpo de rata específico para GAL-3 humana del hibridoma TIB 166 donado por la doctora Jerka Dümic de la Universidad de Zagreb, Croacia, y el anticuerpo de pollo específico para IgG de rata marcado con Alexa Fluór 488 nm (Molecular Probes, EEUU).

El marcaje se realizó en placas microtiter de 96 pocillos de fondo en V (Microtiter plate Bioster SPA) empleando 0.3×10^6 cél/pocillo en un volumen de 100 μ L. Para llevar a cabo la tinción, las células fueron lavadas con PBS + 2% suero de ternera fetal, centrifugándolas a 4 °C, 5 min a 1200 rpm. Manteniendo la placa en hielo y en oscuridad, se adicionaron 5 μ L del correspondiente anticuerpo monoclonal. Tras incubar 15 min en frío y oscuridad, se lavaron las células en la placa 2 veces como se ha indicado anteriormente, para eliminar el exceso de anticuerpo. Cuando la tinción fue indirecta, se adicionó 1 μ L del anticuerpo secundario. Tras incubar 15 min en frío y oscuridad, se lavaron las células en la placa 2 veces como se ha indicado anteriormente, para eliminar el exceso de anticuerpo. Una vez finalizados los lavados, se adquirieron las muestras directamente en el citómetro o se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) al 0.4 % pH 7.2 preparado en PBS y se

mantuvieron a 4 °C y oscuridad hasta el momento de su adquisición, que se realizó como máximo 24 h después.

En el momento de adquirir las muestras en el citómetro, las células procesadas fueron resuspendidas en PBS y transferidas a un tubo de propileno (Aulabor, España). La adquisición y el análisis de las muestras se realizaron en un citómetro de flujo Epics XL (Beckman Coulter) de tres colores usando para el análisis el software de Cytomics RXP. El número de leucocitos adquiridos y analizados osciló entre 50000 y 100000. La población de leucocitos fue seleccionada mediante parámetros FCS (tamaño) y SSC (granularidad o complejidad celular), representados en escala lineal (Fig. 3.3). Posteriormente, las subpoblaciones de leucocitos fueron seleccionadas en base a su morfología y fenotipo CD14⁺ para M-DM, CD3⁺ para linfocitos T, CD19⁺ para linfocitos B y CD14⁻ CD3⁻ CD19⁻ y CD16⁺ para células NK.

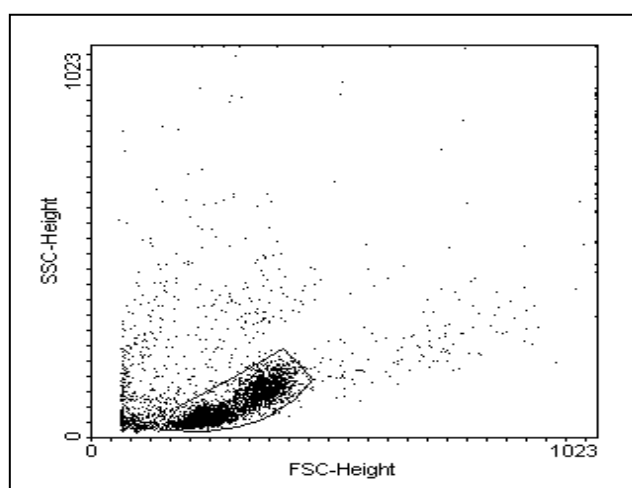


Fig. 3.3. Ejemplo de selección de población linfo-monocítica atendiendo al tamaño (SSC) y complejidad (FSC) en diagrama de puntos, obtenido mediante citómetro de flujo.

3.5. Estimulación de M-DM.

Para el estudio de la producción de citocinas mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) se sembraron 0.2×10^6 M-DM/pocillo en placas de 96 pocillos y se estimularon durante 24 h con LPS (*E. coli* serotype 0111.B4, Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) a una concentración de 0.1 µg/mL; con *C. albicans* inactivada por calor (*heat killed*) mediante tratamiento 20 min a 100 °C, de la cepa SC5314 a un ratio 1:5 (es decir, 5 levaduras por cada M-DM presente en el pocillo); o con oligodeoxinucleótidos sintéticos (ODN) a 1 µg/mL: PD-ODN (oligodeoxinucleótido

Materiales y Métodos

fosfodiéster) y PS-ODN (oligodeoxinucleótido fósforotioato), cuya secuencia fue 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3' (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA, EEUU). Así mismo se emplearon a una concentración de 50 µM, el inhibidor Ac-YVAD-AOM (inhibidor IV de CASP1, Calbiochem, Gibbstown, NJ, EEUU) y los inhibidores de moléculas de señalización intracelular, PD98059 (inhibidor de MEK1, quinasa encargada de fosforilar ERK), SB203580 (inhibidor de p38 MAPK), SP600125 (inhibidor de JNK) y Ly294002 (inhibidor de PI3K), todos ellos obtenidos de Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, MO, EEUU). Posteriormente se procedió a la recogida de los sobrenadantes de cultivo, que se congelaron a -20 °C hasta su análisis.

Para el estudio de la señalización intracelular mediante Western blot, se sembraron 1-2 x 10⁶ M-DM/pocillo en placa de 6 pocillos que fueron sometidos a condiciones de privación de suero (2 % suero de ternera fetal) durante un periodo de 3 h previamente a su estimulación, con el objetivo de disminuir la actividad celular basal. Posteriormente fueron estimuladas durante 15 min con LPS (5 µg/mL) o *C. albicans* muerta por calor (ratio 1:5). El tratamiento con inhibidores de señalización intracelular se realizó 30 min antes de la adición de LPS o *C. albicans*, permitiendo con ello el bloqueo de la ruta de interés antes de adicionar el estímulo en cuestión.

Para el análisis de la expresión proteica mediante Western blot y génica mediante qRT-PCR de GAL-3, IL-1β y CASP1, se sembraron 1-2 x 10⁶ M-DM/pocillo en placa de 6 pocillos, que fueron estimulados con LPS a concentración 0.1 µg/mL o *C. albicans* muerta por calor a ratio 1:5 durante 6, 24 o 48 h, en presencia o ausencia inhibidores de señalización intracelular a una concentración de 50 µM.

3.6. Determinación de viabilidad celular.

La viabilidad celular se determinó rutinariamente por dos técnicas:

3.6.1. Exclusión con azul tripán.

Para determinar la viabilidad celular de las muestras biológicas mediante la técnica de exclusión con azul tripán, se mezcló en una proporción 1:1 (v:v) la suspensión celular y una disolución de azul tripán (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU). Para ello. El recuento celular se llevó a cabo mediante el uso de un hemocitómetro Neubauer, según la ecuación:

$$C = 10^4 \times A \times D$$

C es la concentración expresada en cél/mL. A es la medida del número de células determinadas en las cuadrículas del hemocitómetro y D el factor de dilución empleado.

Las células muertas, con la membrana deteriorada, permiten el paso del colorante y se tiñen intensamente. El número de células vivas de la muestra se calculó contabilizando el número de células no teñidas.

3.6.2. Método de MTT.

El ensayo con MTT se emplea para valorar la viabilidad y estado de proliferación de las células. El MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU], es un compuesto que se incorpora a las células y es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, generando un producto metabólico denominado azul de formazán que precipita al ser insoluble. Las células en estado proliferativo necesitan mayor cantidad de ATP para llevar a cabo la replicación de su material genético. Por tanto, cuanto más elevado sea el estado metabólico de la célula, mayor número de cristales de formazán obtendremos, asumiendo que la intensidad del color será proporcional al número de células viables y en estado proliferativo.

Para determinar la viabilidad de nuestros cultivos celulares, una vez retirado los sobrenadantes para el posterior análisis de producción de citocinas, se adicionaron 50 µL/pocillo de MTT a una concentración de 2 mg/mL a las células adheridas al fondo de los pocillos de la placa de 96 y se incubó en estufa a 37 °C durante aproximadamente 4 h. Este compuesto debe adicionarse en oscuridad debido a que es fotosensible. Tras el tiempo de incubación se solubilizaron los cristales de azul de formazán con 100-150 µL de: isopropanol (Probus, Barcelona), HCl (Probus, Barcelona) a 0.04 N y Tween-20 (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) al 0.1%. Esto rompe las membranas y disuelve los cristales, coloreando el medio, cuya intensidad se mide calculando la absorbancia a una longitud de onda (DO) de 550 nm y se corrige a 690 nm en un lector de placas de ELISA (ASYS Hitech GmbH Jupiter, Austria). A mayor intensidad de color, mayor actividad metabólica y mayor número de células vivas. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado por Denizot y Lang en 1986.

3.7. Análisis de la producción de citocinas mediante ELISA.

La cuantificación de citocinas en los AF de los pacientes o en los sobrenadantes de cultivos de los M-DM se llevó a cabo mediante ELISA, utilizando kits específicos comerciales de R&D Systems (Minneapolis, EEUU) y eBioscience (San Diego, CA, EEUU)], para IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α . Los ensayos se realizaron por triplicado siguiendo las instrucciones del fabricante.

En primer lugar se tapizó la placa con anticuerpo primario o anticuerpo de captura a una dilución 1/250 en PBS y se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se tomó la placa y se eliminó mediante lavados con PBS-T (PBS y Tween-20 al 0.05%) el anticuerpo de captura que no hubiera quedado adherido. Posteriormente se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo del kit comercial, para asegurar que el pocillo queda cubierto de proteínas y evitar una posible unión inespecífica posterior de otras proteínas. Tras eliminar el tampón de bloqueo de los pocillos, se añadieron los estándares para realizar la recta de calibrado y las muestras problema. Los estándares se prepararon mediante diluciones seriadas a partir del más concentrado.

Tras incubación durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó con PBS-T. En esta ocasión los 2 primeros lavados se realizaron eliminando el contenido de cada pocillo con una punta independiente para evitar contaminaciones, y los 3 posteriores mediante inversión rápida de la placa y secado sobre papel.

Posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario también denominado anticuerpo de detección. El kit de R&D, proporciona el anticuerpo secundario unido a la peroxidasa y se incubó 1 h a temperatura ambiente. El kit de eBioscience que proporciona el anticuerpo unido a estreptavidina, se empleó a una dilución 1/250 en tampón de bloqueo y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con PBS-T, y se añadió la peroxidasa conjugada a la avidina a dilución 1/250, incubando 30 min a temperatura ambiente.

Transcurrido este periodo de tiempo se lavó la placa con PBS-T 5 veces, se añadió el sustrato (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina) e incubó 15 min en oscuridad, ya que este sustrato es fotosensible. La reacción se detuvo adicionando ácido sulfúrico 2N (Panreac Química S.A., Barcelona, España).

La absorbancia de cada pocillo se midió directamente en un espectrofotómetro lector de placas de ELISA, a una DO de 450 nm y corregida a 570 nm. Con los datos de concentración y absorbancia obtenidos con estos estándares, se realizó una recta de calibrado de la que se extrapolaron los valores de concentración de las muestras problema. En la Fig. 3.4, se muestra un ejemplo de la recta de calibrado obtenida para el ELISA específico de TNF- α .

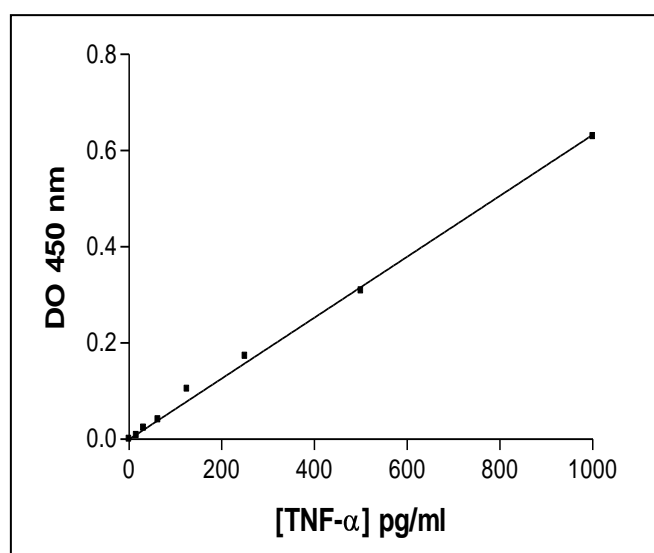


Fig. 3.4. Recta de calibrado para TNF- α . En el eje X, se representa la concentración en pg/mL de la citocina TNF- α , y en el eje Y, la absorbancia a 450 nm correspondiente para cada concentración de TNF- α empleada.

3.8. Análisis de señalización intracelular mediante Western blot.

3.8.1. Obtención de extractos celulares.

Trascurrido el periodo de incubación indicado anteriormente, los M-DM se lavaron con PBS frío, colocando la placa sobre hielo para ralentizar el metabolismo de las células durante el proceso de lavado. Se retiró el PBS de los pocillos y se solubilizaron las células empleando un tampón de lisis comercial (Tris-HCl a 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Tritón 1 %, pirofosfato de sodio 2.5 mM, b-glicerofosfato 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, leupeptina 1 mg/mL; Cell Signaling Technology® Boston, EEUU) y 1 mM del inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU). Se adicionaron 100 μ L de tampón de lisis por pocillo y la ruptura de las células se facilitó mediante el empleo de un raspador celular (SARSTEDT, Nümbrecht, Alemania).

Materiales y Métodos

El extracto celular obtenido se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 13000 rpm, y se descartó el precipitado. Los extractos celulares fueron empleados inmediatamente o bien congelados a -20 °C para posteriores ensayos.

3.8.2. Determinación de la concentración proteica y preparación de las muestras.

La determinación de la cantidad de proteína presente en las muestras se realizó mediante el ensayo Bradford (Bradford, 1976). Para ello se elaboró una recta patrón con albúmina de suero bovino (BSA) (Pierce Biotechnology, IL, EEUU) a concentraciones conocidas en un volumen final de 50 μ L y se añadieron 950 μ L de reactivo Bradford (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU). Las muestras problema se analizaron empleando una cantidad de 2-4 μ L de muestra en cada eppendorf, completando hasta 50 μ L con agua destilada y 950 μ L de reactivo Bradford. La medida de absorbancia en el espectrofotómetro se realizó a 595 nm (6715 UV spectrophotometer, Jenway, Reino Unido). Como blanco se empleó una muestra con 950 μ L de reactivo de Bradford y 50 μ L de agua destilada. En la Fig. 3.5, se muestra un ejemplo de la recta de calibrado obtenida.

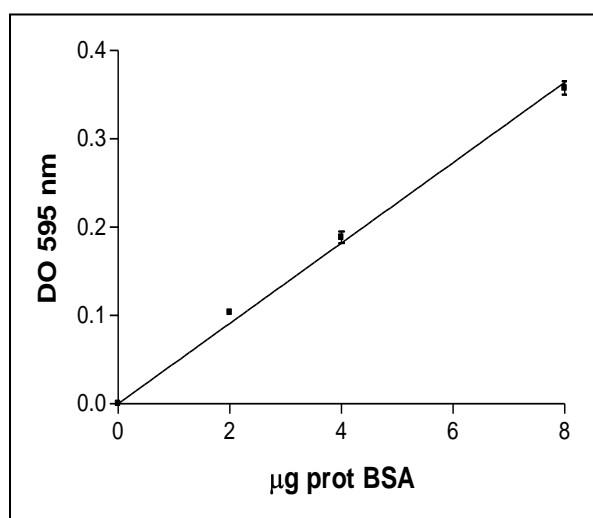


Fig. 3.5. Recta patrón de BSA para cuantificación de proteínas. Se utilizó BSA a las concentraciones de 2, 4 y 8 mg/mL realizando el ensayo por triplicado. La absorbancia para cada concentración de BSA se representa en el eje Y, y fue medida a 595 nm.

3.8.3. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético.

Esta técnica se usó en aquellos casos donde fue necesario concentrar proteínas a partir de sobrenadantes de cultivo de M-DM. Para ello se tomaron 400 μ L de sobrenadante de cultivo y se resuspendió en ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich Co,

Saint Louis, MO, EEUU) al volumen necesario para obtener una concentración final entre el 7.5-10 %. Las muestras fueron incubadas entre 30 min y 2 h en hielo y posteriormente se centrifugaron a 15000 rpm 15-30 min a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet obtenido resuspendido en 400 µL de acetona helada (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) dejándolo 30 min en hielo para disolverlo. Se centrifugó a 15000 rpm a 4 °C durante 5-15 min y tras descartar el sobrenadante se dejó secar el pellet para eliminar la acetona al completo. Se resuspendió en tampón de lisis comercial junto con tampón de carga [250 mM de Tris-HCl pH 6.8, 0.04 % de azul de bromofenol, 40 % de glicerol, 8 % de dodecil sulfato sódico (SDS) y 20 % de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU)] y se calentaron 5 min a 95 °C, dejando así las muestras preparadas para ser cargadas en el gel.

3.8.4. Electroforesis.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis reductora en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE acrónimo en inglés de *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Para ello se utilizó una cubeta de electroforesis vertical Mini-PROTEAN II (BioRad, Richmond, CA, EEUU). Se preparó y depositó el gel separador en el espacio que queda entre los cristales de la cubeta montados con separadores de 1 mm de espesor. Una vez polimerizado el gel separador, se preparó el gel concentrador y se dispuso sobre el gel separador y rápidamente se introdujo el peine de espesor idéntico al de los separadores, que da forma a los pocillos donde se colocarán las muestras a separar. Como agentes inductores de polimerización se usaron persulfato amónico al 10 % y tetrametiletilendiamina (TEMED) ambos de BioRad (Richmond, CA, EEUU).

La composición de los geles separador y concentrador se especifica a continuación:

Gel separador. El gel separador se preparó al 12% de acrilamida.

- Acrilamida-bisacrilamida al 30 % (BioRad, EEUU)	2 mL
- Tris -HCl 1M, pH 8.8 (Sigma, EEUU)	1.875 mL
- SDS 20 % (Sigma, EEUU)	25 µL
- Agua destilada	1.050 mL
- Persulfato amónico 10 %	50 µL
- TEMED	4 µL

Materiales y Métodos

Gel concentrador. Se preparó al 4 % de acrilamida.

- Acrilamida-bisacrilamida al 30 %	0.415 mL
- Tris-HCl 1M, pH 6.8	0.315 mL
- Agua destilada	1.730 mL
- Persulfato amónico 10 %	25 μ L
- TEMED	2 μ L

Seguidamente se montó la cubeta de los geles y se vertió el tampón de recorrido [30 g de Tris HCl 50 mM, 144 g de glicina 384 mM (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) y SDS al 0.2 % en un volumen de 1 L de agua destilada] hasta la marca indicada en la cubeta según el número de geles preparados.

Se prepararon las muestras a la misma concentración de proteína para que los resultados obtenidos fueran comparables. La cantidad de proteína cargada por calle osciló entre 10-15 μ g. A las muestras se les añadió el tampón de carga necesario y se calentaron 5 min a 95 °C, para permitir la desnaturalización de las proteínas.

A continuación se depositaron los estándares de peso molecular marcados con color (Dual Color Precision Plus Protein Standards, BioRad, Richmond, CA, EEUU) y las muestras en los pocillos (10-30 μ L por pocillo). Los electrodos se conectaron a una fuente eléctrica y se separaron las muestras a voltaje constante (90 V) hasta que abandonaron el gel concentrador y entraron en el gel separador, aumentando entonces el voltaje (120 V) para una óptima separación de las muestras. La separación se detuvo en el momento que el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel.

3.8.5. Transferencia de proteínas y detección inmunoquímica.

Tras su separación en gel, las muestras se transfirieron mediante un sistema húmedo a membranas de MilliporeTM de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (0.45 μ m de Millipore Corporation, Bedford, MA, EEUU), previamente humedecidas y activadas en metanol durante 5 min (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) y posteriormente lavadas en agua destilada. La transferencia se realizó en frío, a 90 V durante 90 min en una cubeta de transferencia Mini Trans-Blot de BioRad, utilizando un tampón de transferencia preparado de la siguiente forma para 700 mL: 490 mL de agua destilada, 140 mL de metanol (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) y 70 mL de tampón de transferencia 10X (30,3 g de Tris-HCl y 136,75 g de glicina en 1 L de agua destilada).

Una vez concluida la transferencia se procedió al bloqueo de la membrana durante 1 h a temperatura ambiente en PBS-T con un 3 % de BSA y en agitación. Finalizado el bloqueo se incubó la membrana con el primer anticuerpo a la concentración adecuada en PBS-T + BSA al 2 % a 4 °C durante la noche en agitación. Los **anticuerpos primarios** utilizados fueron:

- **IgG policlonal de conejo** que reconoce específicamente las proteínas humanas: **ERK 1/2** fosforilado en los residuos Thr202/Tyr204; **NF-κB** subunidad **p65** fosforilado en el residuo Ser536; **PKB-Akt** fosforilado en el residuo Ser473; **p38 MAPK** fosforilado en los residuos Thr180/Tyr 182; y sus correspondientes totales, **ERK 2**, **NF-κB p65**, **PKB-Akt** y **p38 MAPK**; **IL-1β** en los aminoácidos 117-269, capaz de detectar el precursor de IL-1β de 31kDa y la IL-1β madura de 17kDa (todos ellos de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EEUU); **caspara-1/ICE** en los aminoácidos 129-149, que reconoce el fragmento de 20kDa y la pro-enzima completa de 45kDa (Invitrogen Co, Frederick, MD, EEUU) y **β-actina** (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU).

- **IgG monoclonal de ratón** que reconoce específicamente las proteínas humanas: **c-Jun** fosforilado en la Ser63; **ATF-2** fosforilado en el residuo Thr 71; **GAL-3** contra la molécula completa (clon A3A12) o los 18 primeros aminoácidos de la proteína (clon B2C10) (todos ellos de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EEUU).

- **IgG monoclonal de rata** que reconoce específicamente **GAL-3** humana (hibridoma TIB166).

Tras incubación con el primer anticuerpo, se realizaron tres lavados con PBS-T en agitación, a temperatura ambiente, durante 5 min cada uno. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario específico anti-conejo o anti-ratón según el caso, conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EEUU), o bien anti-rata conjugado con Alexa flúor 488 nm, y se incubaron durante 1 h en tampón de bloqueo. En la Tabla 3.I, se especifican las diluciones de trabajo para todos los anticuerpos empleados en Western blot. Posteriormente se lavó con PBS-T, 5 veces durante 8 min cada lavado. Finalmente, la presencia de la proteína se reveló adicionando un sustrato que en presencia de la peroxidasa, genera un producto quimioluminiscente, mediante el Kit Enhanced ChemiLuminescence system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EEUU) empleando 1 mL de reactivo

Materiales y Métodos

para cada membrana. La quimioluminiscencia se registró en una película de autorradiografía Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). Para su revelado se emplearon los líquidos de revelado y fijado de AGFA (AGFA photo GmbH Leverkusen, Alemania) en cámara oscura. Para la detección de la fluorescencia generada por el anticuerpo secundario marcado con Alexa flúor 488 nm se usó el equipo Typhoon 9410 (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ, EEUU).

Tabla 3.I. Anticuerpos utilizados en ensayos de Western blot.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
α-p-ERK1/2	1:1000	α -conejo-HRP	1:10000
α-ERK 2	1:1000	α -conejo-HRP	1:10000
α-NFκB p65	1:1000	α -conejo-HRP	1:5000
α- (PKB)-Akt	1:1000	α -conejo-HRP	1:5000
α-p-p38 MAPK	1:1000	α -conejo-HRP	1:5000
α-IκBα	1:1000	α -conejo-HRP	1:10000
α-CD33	1:1000	α -conejo-HRP	1:10000
α-IL-1β	1:1000	α -conejo-HRP	1:10000
α-caspasa-1	1:5000	α -conejo-HRP	1:20000
α-p-c-Jun	1:1000	α -ratón-HRP	1:5000
α-ATF-2	1:1000	α -ratón-HRP	1:5000
α-galectina-3 (A3A12)	1:1000	α -ratón-HRP	1:10000
α-galectina-3 (B2C10)	1:1000	α -ratón-HRP	1:10000
α-galectina-3 (TIB166)	1:1000	α -rata-Alexa488nm	1:10000
α-β-actina	1:5000	α -conejo-HRP	1:20000

Las bandas de proteínas obtenidas fueron cuantificadas mediante densitometría usando el software Scion Image (Scion Inc., EEUU). Como control de carga se empleó β -actina o la proteína de señalización total (fosforilada y sin fosforilar), por lo que el resultado se expresa en relación a ellas.

3.9. Bases de datos y herramientas bioinformáticas.

Para la realización de este trabajo se han empleado las siguientes bases de datos y herramientas bioinformáticas:

- PubMed (*NCBI*, *National Center for Biotechnology Information*, National Library of Medicine, National Institutes of Health, USA.): motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos bibliográfica MEDLINE de artículos de investigación biomédica. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- GenBank (*NCBI*): Base de datos de secuencias genéticas (Benson et al., 1993). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Ensemble (*EMBL-EBI*, *European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute*): Base de datos de secuencias genómicas de organismos eucariotas. <http://www.ensembl.org/index.html>.
- UniProtKB (*EMBL-EBI*): Base de datos de secuencias proteicas <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>.
- Programas de BLAST (BLASTn y BLASTp): Accesibles en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> y utilizados para determinar el grado de similitud de las secuencias de ADN o proteína depositadas en las distintas bases de datos.
- Primer-BLAST (*NCBI*): Herramienta bioinformática utilizada para comprobar la especificidad de los cebadores diseñados. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Oligocalc: Herramienta online para calcular las propiedades de las secuencias de los cebadores (Kibbe, 2007). <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>
- Primer Bank Harvard: Herramienta para el diseño de cebadores para PCR cuantitativa. <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>

3.10. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR.

3.10.1. Extracción, Purificación y Cuantificación de DNA genómico.

Las células fueron lavadas en PBS y centrifugadas a 2000 rpm 5 min. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado celular se añadieron 500 μ L de tampón SNET (Tris 10 mM pH 8.0, 0.1 M EDTA y 0.5% SDS) conteniendo proteinasa K a una concentración final de 100 μ g/mL para degradar las proteínas de la muestra. Se incubó a 55 °C toda la noche. Al día siguiente, la proteinasa K fue inactivada calentando las muestras durante 2 min a 96 °C. Posteriormente para eliminar el RNA se añadió RNAasa H a concentración final de 50 μ g/ml (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) y se incubó 2 h a 60 °C en agitación a 400 rpm. Entonces, las proteínas fueron eliminadas con 500 μ L de fenol (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) mediante agitación durante 30 segundos (s) y centrifugación a 12000 rpm 15 min a 4 °C. La fase acuosa obtenida fue recogida y se dispuso en tubos Phase Lock Gel tube de 2 mL (5 Prime, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockfort, IL, EEUU). El resto de proteínas fueron eliminadas añadiendo a estos tubos 500 μ L de una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1. Se agitó 30 s y se centrifugaron las muestras a 12000 rpm 5 min a 4 °C. Se recogió la fase acuosa obtenida y se depositó en tubo eppendorf donde se adicionó isopropanol (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) al mismo volumen que la fase acuosa obtenida, para permitir el precipitado del DNA. Se centrifugó a 12000 rpm 15 min a temperatura ambiente. Se eliminó el isopropanol y se adicionó 1 mL de etanol (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) al 70 %, centrifugándose 5 min a 12000 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente, el etanol fue descartado y las muestras se dejaron secar para eliminar los posibles restos del mismo. El pellet obtenido, que contiene el DNA celular, fue resuspendido en 100 μ L de agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) dejándose 2 h para la completa resuspensión del mismo. Se midió la concentración de DNA en la muestra en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EEUU). a 260 nm (donde un valor de absorbancia de 1 equivale una concentración de DNA de 50 ng \times μ l⁻¹).

3.10.2. Extracción, Purificación y Cuantificación de RNA.

La extracción de RNA se realizó mediante el Kit GenElute mammalian total RNA Miniprep (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU), de acuerdo a las instrucciones

del fabricante. Se trató las células en suspensión o adheridas en placa con 250 μL de solución de lisis y 2.5 μL de 2-mercaptoetanol dejándolo actuar durante 2 min. Posteriormente, el lisado se diluyó con etanol 70 % en proporción 1:1. Esta mezcla se pasó a columnas de retención de sílice y se centrifugó durante 15 s a 15000 rpm. Se eliminó el filtrado y se pasaron por el filtro 500 μL de solución de lavado 1 que proporciona el kit, centrifugando durante 15 s, a 15000 rpm. La misma operación se repitió dos veces con la solución de lavado 2 (centrifugando la segunda vez 2 min). Para la elución del RNA retenido en la columna se pasaron entre 30-50 μL de tampón de elución, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 min a 15000 rpm. La disolución de RNA se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tras la determinación de su concentración. Para ello se dispuso 1 μL del extracto de RNA y se determinó la concentración mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm (un valor de absorbancia de 1 equivale a una concentración de RNA de $40\text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$) en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c. La pureza del RNA se determinó mediante la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm.

3.10.3. Síntesis de cDNA. Retrotranscripción (RT).

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó con el Kit First-Strand cDNA Synthesis Using Superscript II RT (Invitrogen Co, Frederick, MD, EEUU) en un volumen final de 20 μL , según las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó a partir de 0.25-1 μg de RNA obtenido como se indica en el apartado anterior, al que se le añadió 1 μL de OligodT 100 μM , 1 μL de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) Mix 10 mM y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 12 μL . La mezcla resultante se incubó durante 5 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la desnaturalización del RNA. A continuación se incubó en hielo y a la mezcla anterior se le añadieron 4 μL de tampón First-Strand 5X, 2 μL de ditioneitol (DTT) 0.1 M y 1 μL de RNAsa Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor 40 U/ μL . La mezcla de reacción se incubó a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 min y posteriormente se adicionó 1 μL de la enzima SuperScript II RT. Entonces se incubó en un termociclador (Mastercycler personal thermal cycler, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) 50 min a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la reacción se mantuvo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la retirada del tubo del mismo. El cDNA obtenido se empleó inmediatamente en reacciones de amplificación mediante PCR o se congeló a -20°C .

3.10.4. PCR cuantitativa (qPCR) o PCR a tiempo real.

El análisis de la expresión génica mediante qPCR, se realizó con el cDNA obtenido en el apartado anterior. Se diseñaron cebadores específicos en función de las secuencias publicadas en la base de datos NCBI Gene para los genes *IL1 β* , *CASP1*, *LGALS3* y *GAPDH*, con número de acceso 3553, 834, 3958 y 2597 respectivamente. Los cebadores, con un tamaño entre 20-22 nucleótidos, se diseñaron para que hibridaran en regiones génicas situadas entre dos exones para evitar la amplificación de un posible DNA genómico contaminante, y amplificaran secuencias de aproximadamente 100 pares de bases (pb). En el caso de *LGALS3* se diseñaron cebadores para amplificar los cDNA sintetizados a partir de dos mRNA generados por maduración alternativa, que codificarían dos isoformas diferentes, *GAL-3.1* y *GAL-3.2*. El alineamiento de los cebadores con la secuencia génica depositada en la base de datos NCBI Gene se verificó empleando el programa Primer-BLAST (NCBI), y las posibles estructuras secundarias se estudiaron con el programa Oligocalc.

La secuencia de los cebadores utilizados (Biolegio, Holanda) fueron las siguientes:

- Cebador directo para *CASP1*, 5'-TTTCCGCAAGGTTTCGATTTTCA-3'
- Cebador reverso de *CASP1*, 5'-GGCATCTGCGCTCTACCATC-3'
- Cebador directo de *IL-1 β* , 5'-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3'
- Cebador reverso de *IL-1 β* , 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3'
- Cebador directo de *GAPDH*, 5'-CATGTTCCAATATGATTCCACC-3'
- Cebador reverso de *GAPDH*, 5'-CCTGGAAGATGGTGATGG-3'
- Cebador directo de *GAL-3.1* y *GAL-3.2*, 5'-GTGAAGCCCAATGCAAACAGA-3'
- Cebador reverso de *GAL-3.1*, 5'-CCCAGTTATTATCCAGCTTTGT-3'
- Cebador reverso de *GAL-3.2*, 5'-AGTGAACATGAAACCTTTACACA-3'

Así mismo, se realizó qPCR en el DNA genómico obtenido de líneas celulares transducidas para comprobar la inserción del vector viral con *GAL-3.1* (ver más adelante). Los cebadores usados para ello fueron (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU):

- Cebador directo de *GAL-3* para comprobación de las transducciones, 5'-GTGAAGCCCAATGCAAACAGA-3'

-Cebador reverso de *GAL-3* para comprobación de las transducciones, 5'-AGCGTGGGTAAAGTGGAAGG-3'

La reacción de qPCR se llevó a cabo adicionando en cada uno de los pocillos de una placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) 10 μ L de Power SYBR Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), 1 μ L de cada uno de los cebadores directo y reverso 1 μ M y entre 1-8 μ L de cDNA según la concentración de RNA de partida a una dilución variable según el gen objeto de estudio. El volumen de reacción se llevó a 20 μ L añadiendo agua libre de nucleasas. La qPCR se realizó en un equipo 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Los ciclos de PCR consistieron en una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C seguida de una repetición de 40 ciclos con dos pasos, desnaturalización durante 15 s a 95 °C, e hibridación y elongación durante 1 min a 60 °C. El SYBR Green se unió a la doble cadena de DNA en cada ciclo de amplificación, generando una señal fluorescente que aumentaba con el incremento del número de copias de DNA original. Esta cualidad permitió la generación de curvas de amplificación que, mediante el programa de análisis y recogida de datos 7500 System SDS Software v2.05 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), proporciona los valores a los cuales cada muestra sobrepasa el umbral de fluorescencia (Ct).

Para calcular la eficiencia de la amplificación con los diferentes cebadores, se estudió la variación de Ct con la concentración de molde presente en las muestras. Para ello se realizó una qPCR partiendo de cDNA obtenido de M-DM de AF (Figura 3.6) y de donantes de sangre (datos no mostrados) en condiciones basales a una dilución 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000, y se amplificó por triplicado. Se representó gráficamente los μ g de RNA total empleados en cada dilución frente a los valores de Ct obtenidos para cada uno de los genes estudiados. La eficiencia de la amplificación se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente}) - 1}$$

Una pendiente de -3.3 en la recta resultante, se corresponde con una eficiencia de amplificación del 100 % donde en cada ciclo de PCR se duplica el DNA presente en la muestra.

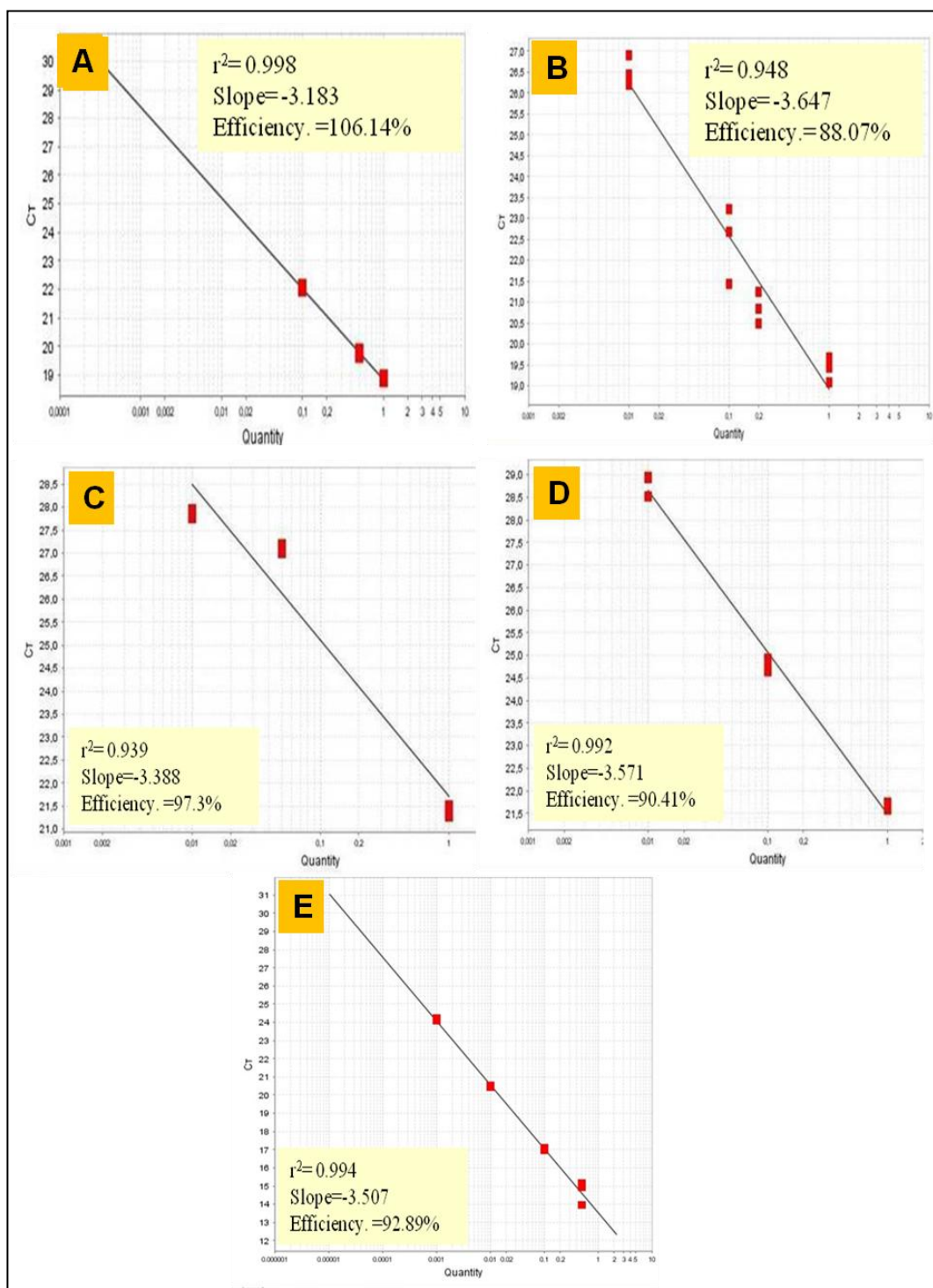


Fig. 3.6. Eficiencia de amplificación para los genes *IL-1 β* , *CASPI*, *LGALS3* y *GAPDH* con los cebadores diseñados. Se sintetizó cDNA a partir de 1 μ g de RNA obtenido de M-DM peritoneales y se emplearon diferentes diluciones para amplificar las secuencias de *GAL-3.1* (A), *GAL-3.2* (B), *IL-1 β* (C), *CASPI* (D) *GAPDH* (E). La recta se representó por regresión lineal mediante ajuste por mínimos cuadrados. Cada medida se realizó por triplicado. Las eficiencias de amplificación se calcularon mediante la fórmula. $E=10^{[-1/slope]-1}$.

Para determinar los niveles de expresión génica se utilizó el método comparativo de Ct conocido como método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak KJ y Schmittgen TD, 2001). La medida de los niveles de expresión de los genes de interés se realizó en referencia a los valores de un gen de expresión constante (control endógeno) para cada una de las muestras, que en este trabajo fue *GAPDH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Para que el cálculo de los $\Delta\Delta C_t$ sea válido, es necesario que las eficiencias de amplificación del gen diana y la del control endógeno sean similares. Para validar el método en nuestras muestras, se representó el logaritmo de los μg de RNA total empleados frente a ΔC_t (C_t gen de interés- C_t *GAPDH*) y se calculó el valor de la pendiente, que es cero cuando las eficiencias de amplificación son idénticas para el gen objetivo y el control endógeno. Se validó el método de cuantificación para todos los genes de interés.

La especificidad de los cebadores fue confirmada realizando una curva de disociación (Fig. 3.7), donde la existencia de un solo pico en esta curva excluye la posibilidad de la amplificación inespecífica de otros productos con distinta temperatura de fusión.

Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los productos de qRT-PCR para confirmar la presencia de un único amplicón del tamaño esperado. Para ello, las muestras de cDNA amplificadas anteriormente se mezclaron en una proporción 5:1 con loading dye 6x (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockfort, IL, EEUU) para visualizar el frente de electroforesis y aumentar la densidad de la muestra. El gel se preparó al 1% de agarosa en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM/EDTA 1mM, pH 8,0) y la separación de los fragmentos se produjo al aplicar un voltaje constante de 90 V en una cubeta horizontal de electroforesis que contenía el mismo tampón TAE. Se dispuso una calle con un marcador de 100 pb (GeneRuler 100 pb DNA ladder, Invitrogen Co, Frederick, MD, EEUU). Para visualizar el resultado de la electroforesis se bañó el gel en una disolución de bromuro de etidio (40 μL de bromuro de etidio a 10 mg/mL en 100 mL agua destilada) durante 5 min. Luego se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomó una fotografía (BioRad Gel Doc 1000, Richmond, CA, EEUU).

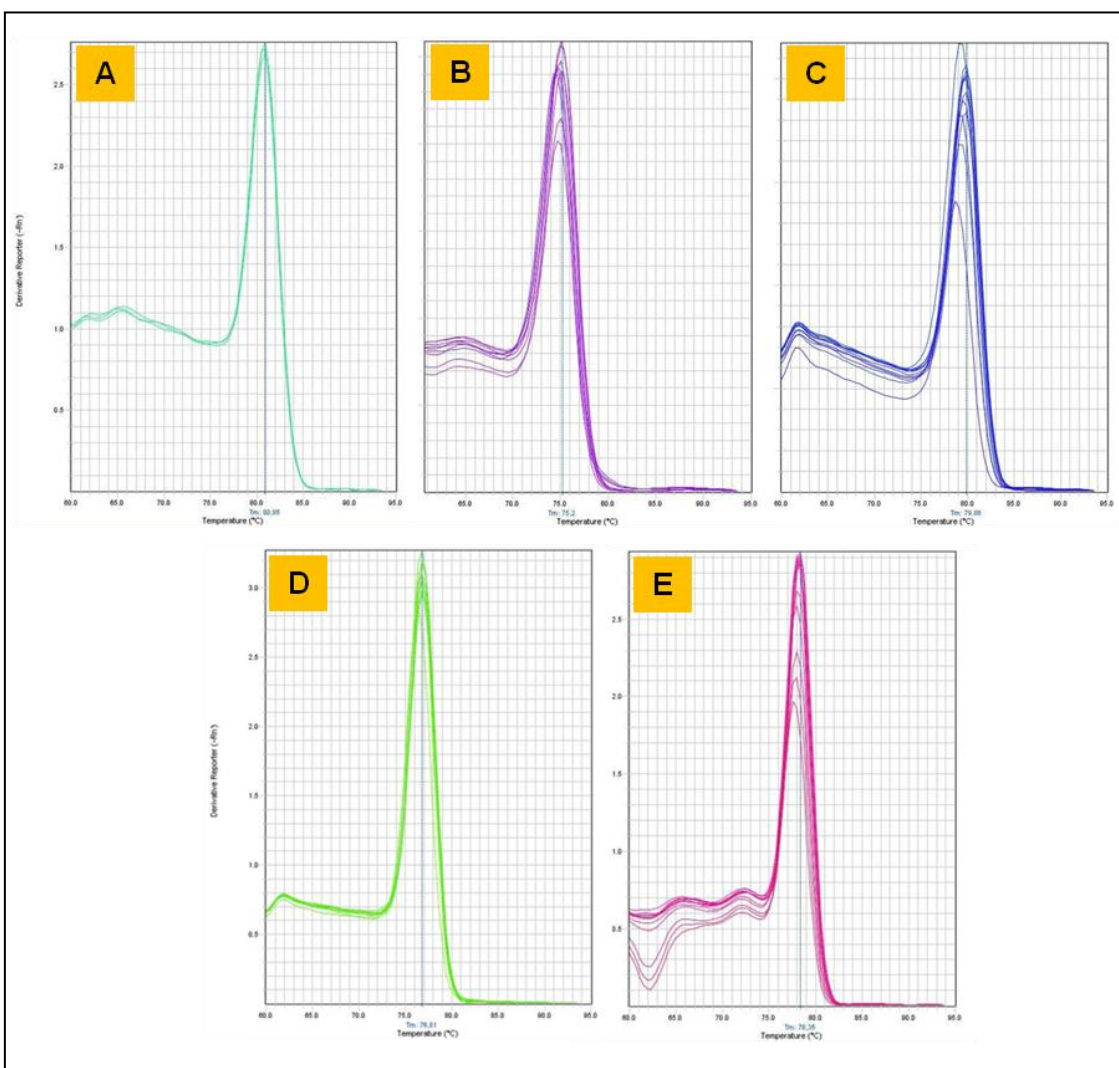


Fig. 3.7. Curvas de disociación para los fragmentos amplificados por qRT-PCR. Se representaron las curvas de disociación para *IL1β* (A), *CASPI* (B), *GAPDH* (C), *GAL-3.1* (D) y *GAL-3.2* (E). Las temperaturas de fusión fueron de 80.85 °C para *IL1β*, 75.2 °C para *CASPI*, 79.88°C para *GAPDH*, 76.81 °C para *GAL-3.1*, y 78.35 °C para *GAL-3.2*.

3.11. Subclonación de *GAL-3.1* en el vector pHR´SINcppt-SEWP.

El vector lentiviral pHR´SINcppt-SEWP que presenta resistencia a ampicilina, abreviado como SEWP (Fig. 3.8), fue proporcionado por el doctor Francisco Martín Molina del Centro de Investigación de Genómica y Oncología de la Junta de Andalucía (Genyo) en Granada. Este vector contiene el promotor del virus SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*), que conduce a la expresión del *cassette* eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), que le aporta fluorescencia verde.

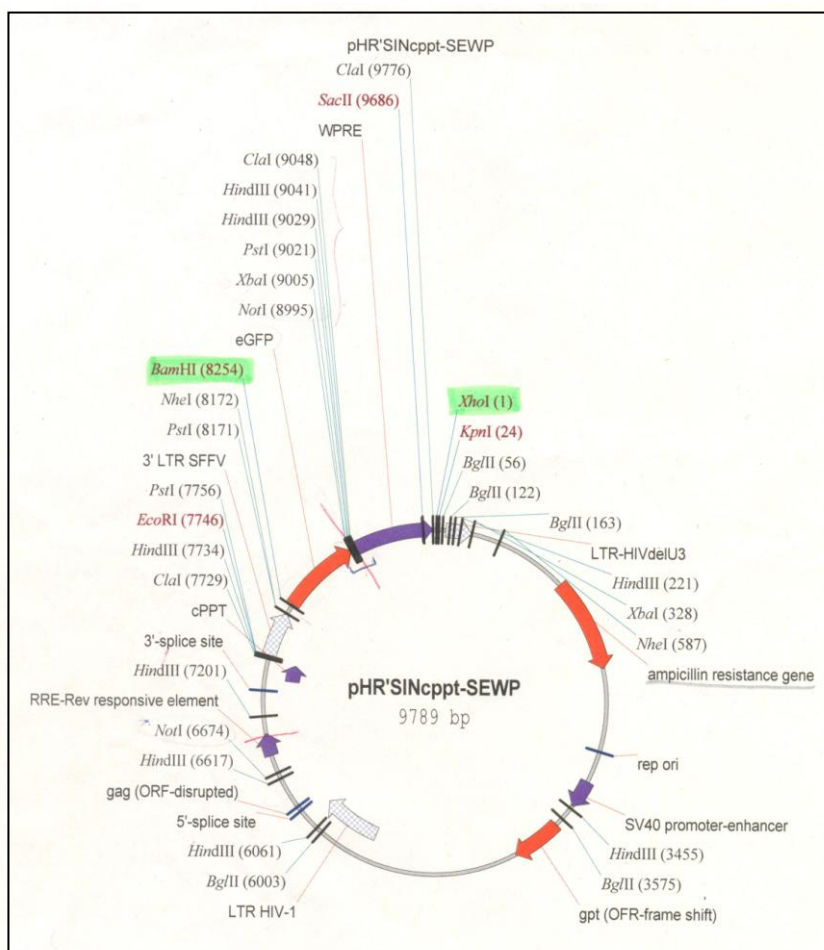


Fig. 3.8. Esquema del vector lentiviral pHR'SINcppt-SEWP.

3.11.1. Amplificación y purificación de la secuencia de GAL-3.1.

Partimos del plásmido pcDNA3 (Fig. 3.9) con el inserto de la secuencia de cDNA de *GAL-3.1*, realizado y disponible en nuestro laboratorio. Para amplificar la secuencia de *GAL-3.1* mediante PCR y poder insertarlo posteriormente en el vector lentiviral SEWP, se diseñaron los cebadores complementarios a regiones del plásmido pcDNA3 y del inserto de *GAL-3.1*, con las secuencias de corte (subrayado en la secuencia) específicas para las enzimas de restricción BamHI en el cebador directo, 5'-CAAGGATCCGAAAATGGCAGA-3', y XhoI en el cebador reverso 5'-GCAGACTCGAGATTATATCATG-3'. Estas enzimas de restricción fueron seleccionadas por ser compatibles para la posterior introducción del inserto de *GAL-3.1* amplificado en el vector SEWP.

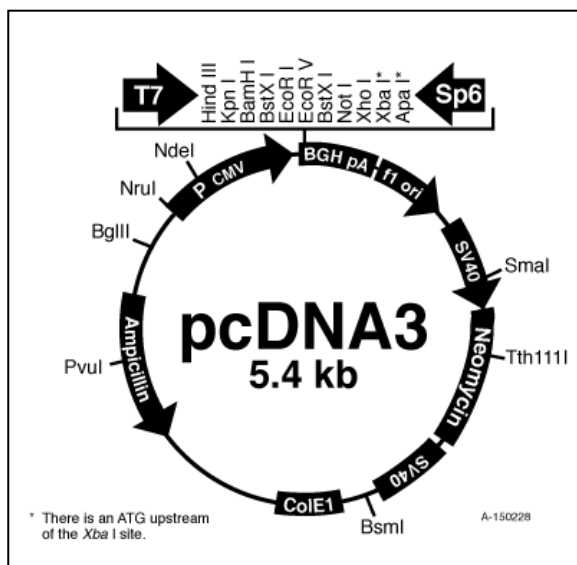


Fig. 3.9. Esquema plásmido pcDNA3.

Se utilizaron 50 ng del plásmido pcDNA3 con el inserto de *GAL-3.1* con 1 μ L de cada cebador a 1 μ M, 1 μ L de dNTP 10 mM, 5 μ L del tampón 10X (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EEUU) y 1.5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM completando con agua libre de nucleasas hasta 50 μ L y 1 μ L de la polimerasa Taq (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EEUU) que presenta una velocidad de copia de 1000 pb/min. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes: 3 min a 94 $^{\circ}$ C para estabilizar las muestras, seguido de 30 ciclos compuestos de: 1 min para la desnaturalización a 94 $^{\circ}$ C, 1 min para el alineamiento a 54 $^{\circ}$ C y 1 min y medio para la extensión a 72 $^{\circ}$ C. Posteriormente, 10 min a 72 $^{\circ}$ C para la fase de elongación y mantenimiento en frío a 4 $^{\circ}$ C.

El producto de la PCR se purificó usando el Kit DNA Clean and Concentrator (Zymo Research Corp. Irvine, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. En la columna proporcionada por el kit se dispuso el producto de PCR y el tampón de unión de DNA en proporción 1:5, se centrifugó a 10000 x g durante 30 s y se descartó el eluido. Posteriormente se adicionaron 200 μ L del tampón de lavado que contiene etanol y se centrifugó a 10000 x g 30 s repitiendo este procedimiento 2 veces y descartando el eluido. Por último se eluyó con agua libre de nucleasas centrifugando a 10000 x g durante 1 min.

3.11.2. Generación de extremos cohesivos en *GAL-3.1* y SEWP.

Para subclonar *GAL-3.1* en el vector lentiviral SEWP se trataron tanto inserto como vector con enzimas de restricción adecuadas para generar extremos cohesivos que permitieran el posterior ensamblaje de la secuencia de *GAL-3.1*. Estos fueron BamHI (secuencia de corte G'GATCC) y XhoI (secuencia de corte C'TCGAG).

Para realizar el corte combinado con ambas enzimas en las condiciones óptimas, se utilizó el programa Double Digest de la casa comercial Fermentas. El proceso de digestión se realizó durante 2 h a 37 °C, poniendo 0.5 µg del vector lentiviral o 15 µL de cDNA de *GAL-3.1* obtenida de la PCR del paso anterior, con 1 µL de la enzima BamHI, 2 µL de la enzima XhoI, y 2 µL del tampón de BamHI. En el proceso de corte se perdieron las secuencias de *eGFP* y de *WPRE* (estabilizador transcripcional del mRNA) contenidas en el vector lentiviral.

Para su purificación, las muestras se corrieron en gel de agarosa al 1 % con tampón TAE y se revelaron con bromuro de etidio durante solo 1 min para evitar posibles mutaciones en el DNA. Se escindió del gel de agarosa la banda correspondiente al vector lentiviral y la banda de *GAL-3.1* y seguimos los pasos indicados por el Kit GeneClean (MP Biomedicals, Francia). Se pesó cada banda y se adicionaron 3 veces su peso en volumen de la solución de NaI incubando 5 min a 55 °C para fundir la agarosa. En segundo lugar, se adicionó entre 5-10 µL de un reactivo del kit denominado *glassmilk* donde quedaron atrapados nuestros DNAs y se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó en microfuga durante 10 s y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 500 µL de tampón de lavado que contiene etanol y volvimos a centrifugar en microfuga 10 s, repitiendo el lavado 2 veces. Se dejó secar el precipitado a 55 °C 10 min para la evaporación completa del etanol y por último se incubaron ambos DNAs a 55-60 °C 5 min y se eluyó en agua libre de nucleasas centrifugando a 14000 x g 30 s.

Para estimar la concentración del fragmento *GAL-3.1* y el vector, se realizó un gel de cuantificación al 1.2% de agarosa en tampón TAE, cargando una parte del DNA recuperado en el proceso anterior. Para este gel de cuantificación se usó el marcador denominado MassRuler DNA ladder (Invitrogen Co, Frederick, MD, EEUU) que nos permite cuantificar las bandas basándonos en su intensidad.

3.11.3. Ligación de GAL-3.1 en SEWP.

Para llevar a cabo el proceso de ligación se calculó la cantidad necesaria del vector (8250 pb) y del inserto (750 pb) para tener el mismo número de moléculas de ambos, sin sobrepasar los 100 ng de DNA, 1 μ L de la enzima ligasa (Invitrogen Frederick, MD, EEUU), 4 μ L del tampón 5X de esta enzima y agua libre de nucleasas hasta 20 μ L que es el volumen máximo de reacción. Se dejó incubar 3 h a temperatura ambiente.

3.11.4. Trasformación y purificación de SEWP-GAL-3.1.

Para llevar a cabo el proceso de transformación se usó la bacteria competente *E. coli* DH5 α de Invitrogen (Frederick, MD, EEUU). En tubos de cultivo de bacterias se adicionaron 10 ng del producto de ligación y 80 μ L de bacterias, dejándolo incubar 30 min en hielo. Posteriormente, se realizó choque térmico a 42 °C durante 45 s y 2 min en hielo. Se adicionaron 720 μ L de medio SOC (Invitrogen Co, Frederick, MD, EEUU) dejando a las bacterias 1 h recuperándose en agitación a 37 °C y 225 rpm. Entonces, las bacterias se sembraron en placa Petri en medio LB (Luria Broth)-agar (Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid, España) con ampicilina (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EEUU) (1 μ L ampicilina por 1 mL de medio de cultivo) y se incubó a 37 °C toda la noche.

Al día siguiente se seleccionaron 5 colonias diferentes aisladas y se pusieron en cultivo en tubos de bacterias con 5 mL de medio SOB (Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid, España) y 5 μ L de ampicilina como antibiótico de selección dejándolo en agitador a 37 °C y 280 rpm toda la noche.

La obtención del plásmido SEWP-GAL-3.1 de cada uno de los 5 cultivos, se realizó con el Kit GenElute HP Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por separado, se centrifugaron los cultivos a 12000 x g durante 1 min y se descartó el eluido. Al precipitado obtenido se adicionaron 200 μ L de la solución de resuspensión y se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea. En el siguiente paso se lisaron las células, no más de 5 min, con 200 μ L de tampón de lisis, homogeneizando mediante inversión del tubo unas 6-8 veces, hasta que la mezcla se volvió clara y viscosa. Los restos celulares, proteínas, lípidos y DNA cromosómico se precipitaron con 350 μ L de tampón de neutralización invirtiendo el tubo unas 4-6 veces y se centrifugaron a 12000 x g 10 min, quedándose en

el precipitado. A continuación, se usaron las columnas proporcionadas por el kit, previamente tratadas con 500 µL de tampón de preparación de la columna (lo que aumenta su capacidad de retención de DNA) y se centrifugaron a 12000 x g 1 min. Se transfirieron a la columna los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior, centrifugándose a 12000 x g 1 min. Se descartó el eluido y se añadieron a las columnas 750 µL de solución de lavado con etanol, centrifugando a 12000 x g 1 min, volviendo a descartar el sobrenadante. Entonces se centrifugó a la misma velocidad la columna durante 2 min para eliminar el exceso de etanol. Finalmente se eluyeron los DNAs retenidos en las columnas mediante el tampón de elución, incubándolos 3 min a 50 °C y posterior centrifugación a 1000 x g 5 min. Se realizó una segunda elución a 3000 x g 5 min para asegurar la máxima recuperación del plásmido. La determinación de la concentración de vector se realizó a 260 nm en Espectrofotómetro Nanodrop 2000c.

3.11.5. Confirmación de la subclonación de *GAL-3.1* en SEWP.

Para la verificación de la subclonación, el plásmido SEWP con *GAL-3.1* purificada en el apartado anterior de cada una de las 5 colonias se trató con las dos enzimas de restricción BamHI y XhoI durante 2 h a 37 °C y se corrió en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE (Fig. 3.10).

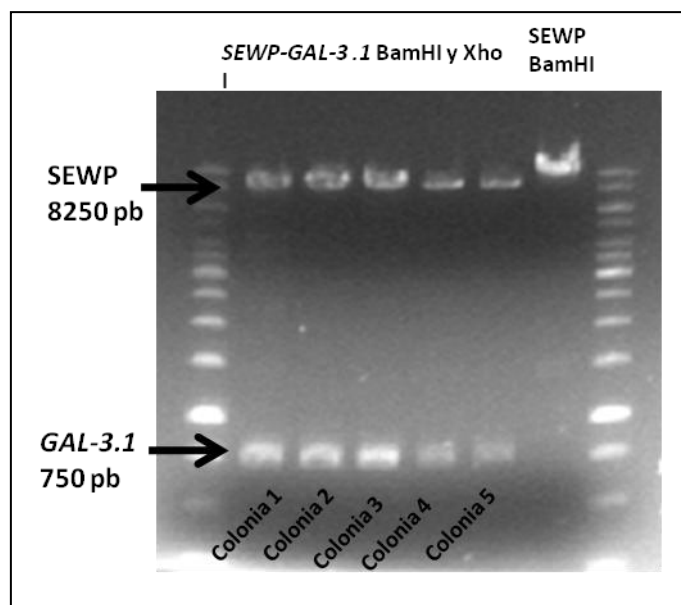


Fig. 3.10. Confirmación de la ligación de *GAL-3.1* en el vector SEWP en las 5 colonias obtenidas. Tras la digestión con BamHI y Xho I se observan dos bandas, una de mayor peso molecular que se corresponde con el plásmido SEWP y otra de bajo peso molecular correspondiente al inserto *GAL-3.1*. Como control se usó el vector SEWP sin inserto, tratándolo con la enzima de restricción BamHI.

Además, se secuenciaron en el Centro de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, los plásmidos de 3 de las 5 colonias, empleando cebadores específicos para *GAL-3.1*, para comprobar que la secuencia insertada dentro del vector lentiviral era correcta. La secuencia de *GAL-3.1* en las colonias 1 y 3 fue correcta para todos los nucleótidos; sin embargo en la colonia 2 encontramos una mutación puntual en la secuencia de *GAL-3.1*, con cambio de una guanina por una adenina.

3.12. Transducción con lentivirus.

Para sobreexpresar la proteína GAL-3 en las líneas celulares THP-1, HL-60 y U937 se procedió a la transducción con lentivirus.

3.12.1. Transfección de HEK293T con los vectores virales.

Para producir los viriones completos, también denominados unidades transductoras (TUs), se usó la línea celular HEK293T, que reciben el nombre de células empaquetadoras de virus. Estas células fueron sembradas en placas de 10 cm de diámetro hasta alcanzar una confluencia del 90 % y posteriormente se transfectaron con los tres vectores virales necesarios para formar los viriones completos usando el reactivo de transfección LipoD293 (Signagen Laboratories, MD, USA).

Los vectores virales utilizados fueron:

- Vector SEWP con la secuencia que codifica nuestra proteína de interés GAL-3, SEWP-*GAL3.1*. Como controles de transducción se emplearon: el vector SEWP que incorpora *eGFP* o bien otro vector idéntico a este cuyo promotor es el del CMV (citomegalovirus) en vez del SSFV.
- El plásmido del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) pCMVDR8.91 que incorpora los genes gag, pol, tat y rev que codifican la polimerasa viral y otras proteínas necesarias para la formación de la cápside, así como las secuencias que permiten la integración del virus en el genoma celular.
- El plásmido del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) -G pMD.G que codifica la envuelta viral. De ella depende la correcta interacción entre virus y célula puesto que es la primera línea de contacto entre ellas, y lo que va a permitir la infección.

Estos plásmidos pCMVDR8.91 y VSV-G fueron aportados por el doctor Francisco Martín Molina, y en su origen por el doctor Trono (Trono *et al.*, 1996).

Estos vectores se usaron a ratio 3:2:1, alcanzando una concentración máxima de 15 µg de DNA: 7.5 µg de SEWP-GAL3.1 (o SEWP control bajo promotor SFFV o CMV), 5 µg del vector pCMVDR8.91 y 2.5 µg del vector VSV-G. Se prepararon en 500 µL de CCM sin suero. La LipoD293 fue preparada previamente, adicionando 45 µL de la misma en 500 µL de CCM, y posteriormente se adicionó a la mezcla con los vectores, que se incubaron otros 15 min. Entonces, se adicionó a la placa con las células HEK293T y se incubó durante 5 h. Posteriormente se eliminó este medio y se añadió 15 mL de CCM a las células que se incubaron 48 h.

3.12.2. Obtención y concentración de los viriones.

Transcurridas las 48 h se recogieron los 15 mL de sobrenadante celular donde se encontraban las TUs producidas por las células HEK293T. Se adicionaron otros 15 mL de CCM a las células para realizar una segunda recolección de TUs. Para concentrar los viriones se usó el Kit Centrifugal Filter Units (Merck Millipore, MA, EEUU) con tamaño de filtro de 100 K que permitía retener las TUs en su interior. Manteniéndolo en frío, se llenó el filtro con el sobrenadante y se centrifugó a 2000 rpm durante 20 min a 4 °C. Finalmente, se resuspendieron los viriones obtenidos en 1.5 mL de CCM y para su conservación se mantuvieron a -80 °C.

3.12.3. Transducción de las líneas THP-1, HL-60 y U937.

Como control del proceso de transducción se emplearon los vectores SEWP que aportan fluorescencia en verde a las células que lo incorporan; uno bajo el promotor SFFV y otro bajo el promotor CMV para determinar la capacidad de expresión de GFP mediante citometría de flujo en las tres líneas celulares.

Se sembraron 0.1×10^6 cél/pocillo en placas de 24 pocillos. Por cada tipo celular se emplearon 3 pocillos a los que se les adicionaron 300, 100 o 30 µl del sobrenadante obtenido en el paso anterior que contiene las TUs con el vector SEWP-GAL-3.1, o bien 1, 10 o 100 µl de los vectores control. Se incubaron durante 6-8 h y se cambió el medio de cultivo esperando unos 2-3 días para que las células ya con el fragmento de DNA de interés insertado en su genoma, comenzasen su crecimiento de manera normal.

3.13. Tratamiento estadístico de los datos.

Para la representación gráfica de los resultados se empleó el programa GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EEUU, www.graphpad.com) y para el tratamiento estadístico de los datos el software de análisis estadístico SPSS 19.0 (Chicago, IL, EEUU).

Las variables categóricas se expresaron con frecuencias o porcentajes. Las variables continuas se expresaron de la siguiente manera: i) con la mediana y el rango intercuartílico (IQR) y se representaron gráficamente como diagramas de caja, donde la parte superior e inferior de la caja se corresponde con el percentil 25 y 75 respectivamente y la banda dentro de la caja se corresponde con el percentil 50, es decir, la mediana. Las líneas verticales que sobresalen de la caja, denominadas bigotes, se extienden respectivamente hasta el valor mínimo y máximo del conjunto de datos, siempre que estos valores no difieran en más de una vez y media del IQR. Los datos atípicos se mostraron como círculos fuera de las cajas; ii) mediante histogramas donde se representaron la media \pm el error estándar de la media (SEM).

Las diferencias estadísticas fueron analizadas usando test estadísticos no paramétricos, usando por un lado el Test de rangos de Wilcoxon si las muestras estaban relacionadas, o la U de Mann-Whitney si las muestras eran independientes. Todos los valores de probabilidad (p) fueron de dos colas y menores de 0.05 para considerarse estadísticamente significativos.

Este estudio cumple las directrices STROBE y EQUATOR sobre investigación en salud (Simera *et al.*, 2010).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CHAPTER 4.1

Peritoneal macrophage priming in cirrhosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion.

Bacterial infections are common complications arising in patients with cirrhosis and ascites, being SBP the most frequent and clinically relevant (Such and Runyon, 1998). The classical pathogenic theory of SBP suggests that bacteria of intestinal origin move across the intestinal wall (Berg, 1992), reaching the mesenteric lymph nodes and other organs in a process known as BT. Bacteria can then gain access to AF and a SBP episode may eventually develop if the local bactericidal mechanisms are insufficient to mount an adequate response (Runyon, 1988; Such *et al.*, 1988).

It has been extensively demonstrated that macrophages represent the primary line of defence in the peritoneal cavity (Turchyn *et al.*, 2007). Activation of macrophages by LPS plays a key role in the over-production of TNF- α and nitric oxide in experimental models of liver injury (Heller *et al.*, 2000; Riordan and Williams, 2006). It has been shown that BT is a dynamic process that can be identified through detection of transient immunogenic bacterial products in serum and AF (Francés *et al.*, 2008), promoting the release of several pro-inflammatory cytokines and nitric oxide (Francés *et al.*, 2004). These facts are related to a marked hemodynamic disorder that may lead to deadly complications such as hepatorenal syndrome. Moreover, nitric oxide values recorded at diagnosis of an infectious episode are related to the clinical evolution of patients and the rate of clinical complications and death (Such *et al.*, 2004; García-Tsao *et al.*, 1998). Increased TNF- α levels at admission have been observed in cirrhotic patients who subsequently developed SBP compared with those that remained uninfected during admission (Such *et al.*, 2001) and a more severe immune response in cirrhotic patients with SBP than in non-cirrhotic patients with sepsis has also been observed (Byl *et al.*, 1993).

These evidences suggest first, that patients who develop SBP have previously been in contact with microorganisms and, second, that probably a pre-activated status of monocyte-derived macrophages (M-DM) has been established and is maintained in these patients, even after the bacterial challenge has been resolved.

In this study we aimed to evaluate whether peritoneal macrophages from cirrhotic patients remain in a chronic primed status to better respond to subsequent BT episodes.

To assess this hypothesis we have studied intracellular signaling molecules activated in response to PAMPs and the associated cytokine production in peritoneal MDM obtained from AF in patients with decompensated cirrhosis in the absence of bacterial antigens.

4.1.1 Baseline clinical and analytical characteristics of patients.

Only patients with traces of LPS (0.34 ± 0.25 UE/mL) and without evidences of bacterial DNA translocation, as determined by broad-range PCR of the 16SrRNA gene (Such *et al.*, 2002, Francés *et al.*, 2004), were considered in this investigation. Other exclusion criteria have been exposed in materials and methods chapter. A consecutive series of 31 patients with ascites was studied until a group of 25 patients fulfilling the above clinical characteristics were recruited for this investigation. Causes of exclusion of the remaining 6 patients were episodes of gastrointestinal bleeding in the previous 2 weeks ($n=2$), and continuous use of norfloxacin as secondary prophylaxis of SBP ($n=4$).

Clinical and analytical characteristics of patients are detailed in Table 4.I. As required in inclusion criteria, blood and AF cultures were negative in all cases. None of the patients died during hospitalization or developed SBP.

Seventy-five per cent of patients ($n=19$) were included during their first episode of ascitic decompensation. Two patients had antecedents of upper gastrointestinal bleeding (2 and 3 months previously to inclusion in this investigation, respectively) due to rupture of esophageal varices and one patient had a history of previous episodes of encephalopathy. Four patients died during a 6-month period of follow-up due to SBP ($n=2$), hepatorenal syndrome ($n=1$) and sepsis of urinary origin ($n=1$).

Donors showed a mean age of 52 ± 12 years and the male/female ratio of 9/6, that were not significantly different when compared with the group of patients.

Table 4.I. Clinical and analytical characteristics of patients included in the study.

Variable	Patients with cirrhosis and culture-negative ascites (n=25)
Age Mean±SEM (Range)	60.05 ± 11.60 (35-78)
Male sex n (%)	15 (60.0)
Etiology n (%):	
Alcohol	18 (72.0)
HCV	5 (20.0)
Alcohol+HCV	2 (8.0)
Previous episodes of ascites n (%)	6 (24.0)
Child-Pugh mean score	9.6 ± 1.5
Child-Pugh (B/C) %	63.1 /36.8
Meld mean score	12.87 ± 4.5
Mean Arterial Pressure (mm Hg)	83.5 ± 15.9
Bilirubin (mg/dL)	3.3 ± 2.1
Albumin (g/dL)	2.8 ± 0.6
Quick (%)	61.2 ± 14.6
Serum creatinine (mg/dL)	0.8 ± 0.4
Serum sodium (mEq/L)	135.0 ± 5.1
Blood WBC/mm ³	5576.4 ± 2389.3
AF WBC/mm ³	285.0 ± 255.9
% AF PMNs	24.20 ± 17.73
AF Total protein (g/dL)	1.7± 0.8
AF albumin (g/dL)	0.7 ± 0.5
<i>WBC: white blood cells</i>	

4.1.2. Peritoneal M-DM status at baseline.

Peritoneal macrophages were selected by cell granularity and the fluorochrome conjugated monoclonal antibody CD14-FITC. Fig. 4.1 shows the activation state of peritoneal macrophages. A high expression of cell surface markers CD54 (72.2%), CD86 (62.2%) and HLA-DR (65.2%) was observed and median fluorescence intensities (MFI) in cells from patients with cirrhosis and ascites at baseline were significantly higher for all three cell-surface activation markers compared with blood monocytes from donors.

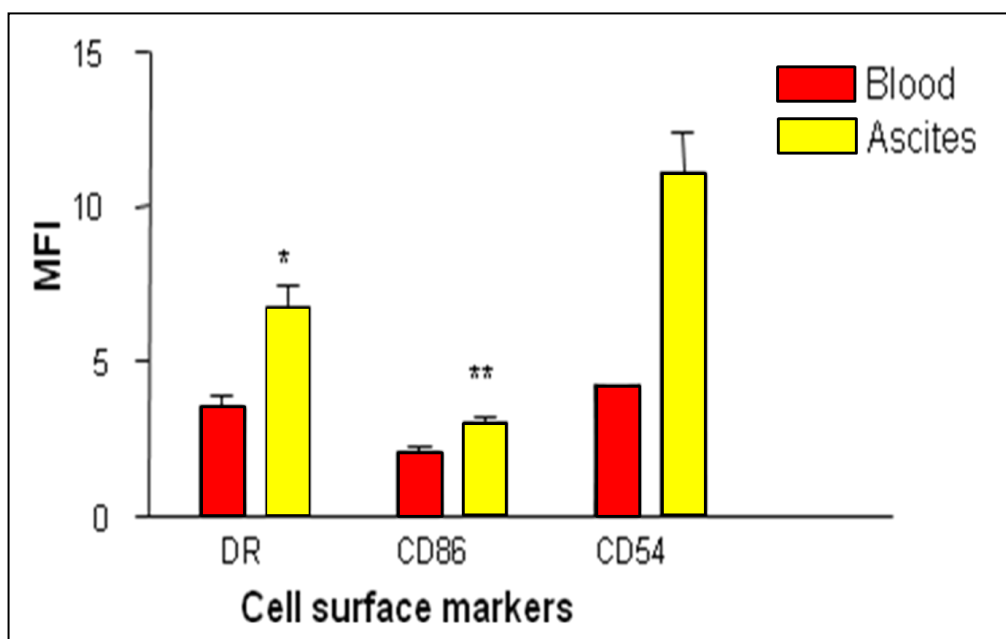
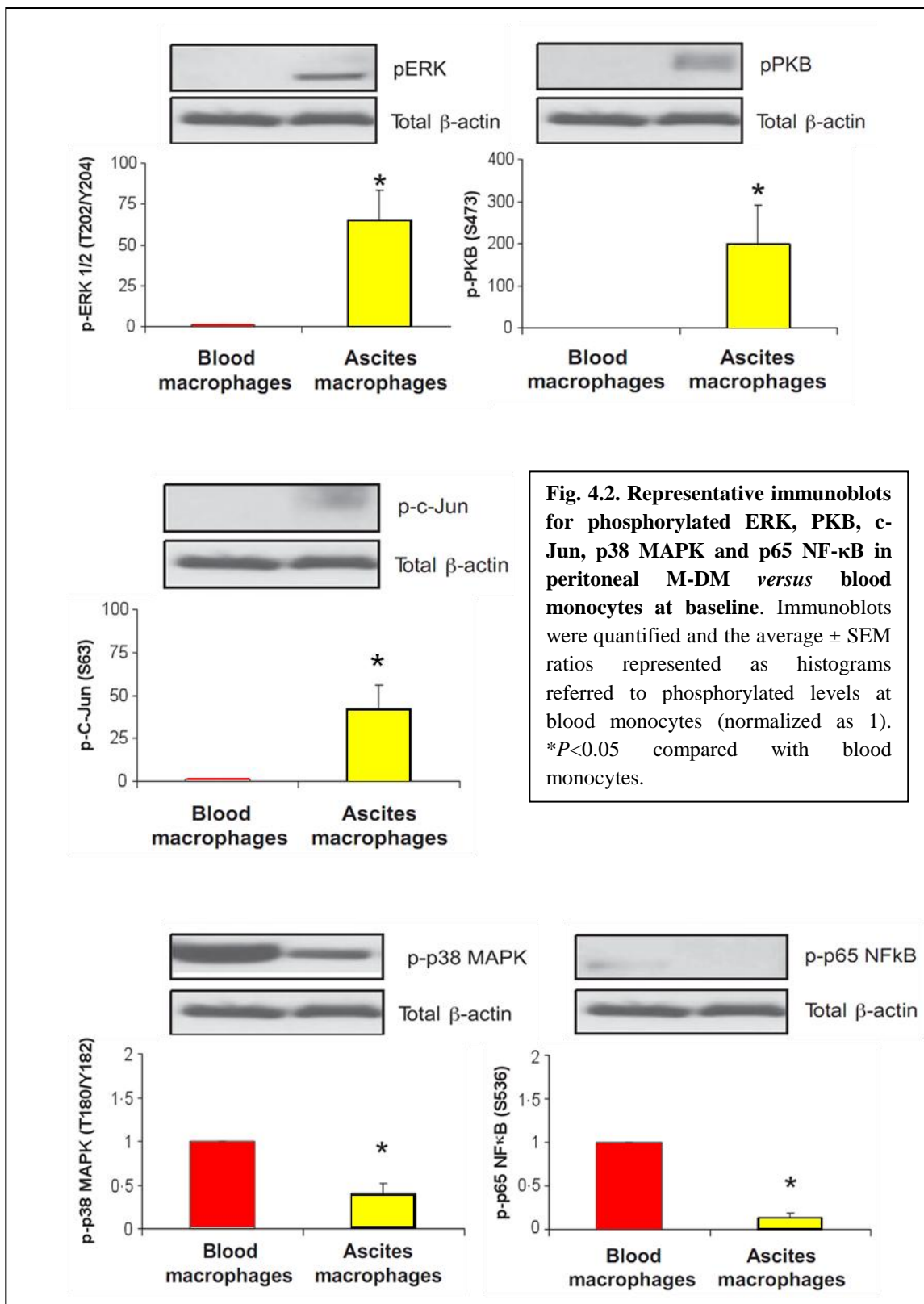


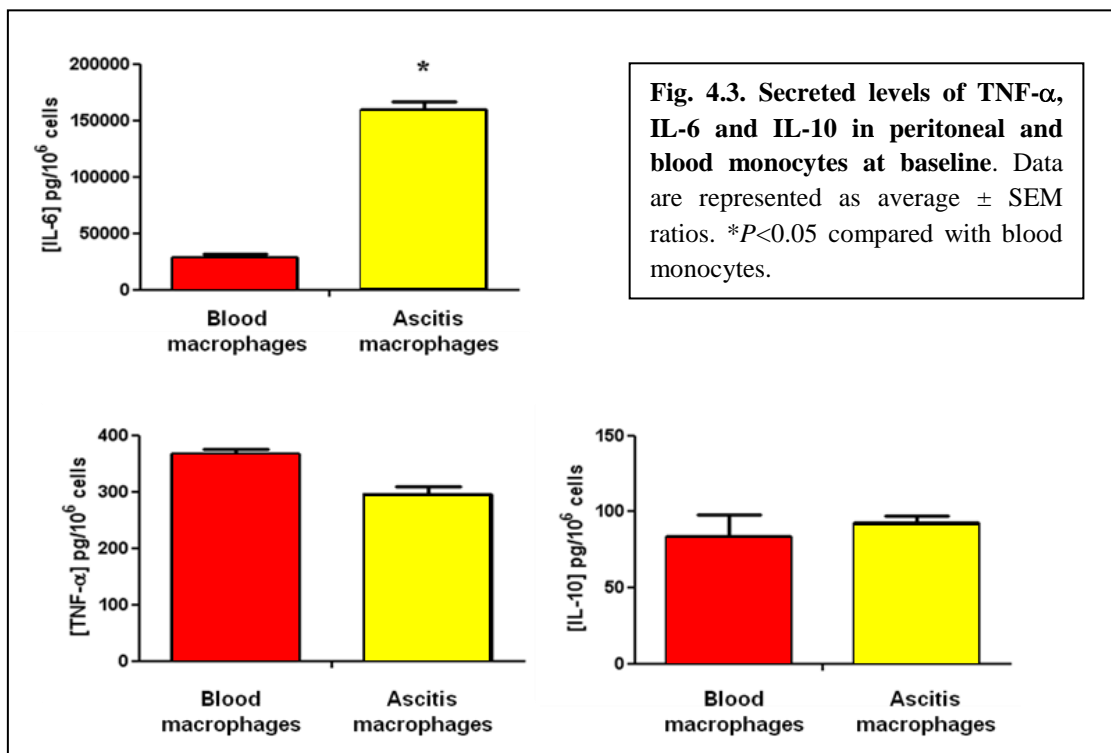
Fig. 4.1. Expression of cell surface activation markers in peritoneal M-DM obtained from patients with advanced cirrhosis and in blood monocytes from donors. * $P < 0.05$ compared with blood monocytes; ** $P < 0.01$ compared with blood monocytes.

Intracellular signaling analysis also showed increased phosphorylated levels of kinases ERK1/2, PKB and the transcriptional factor c-Jun in peritoneal M-DM at baseline, while p38 MAPK and p65 NF- κ B showed a lower pattern of activation (Fig. 4.2).

Furthermore, cytokine levels at baseline also showed differences between peritoneal and blood monocytes (Fig. 4.3). Thus, while IL-6 levels were significantly higher in peritoneal M-DM, TNF- α levels were very similar to those produced by blood monocytes. Accordingly, significant differences in the pathway's endpoint molecule NF- κ B between blood and peritoneal M-DM were not observed. Secretion of IL-10 was not significantly different between blood monocytes and peritoneal M-DM.

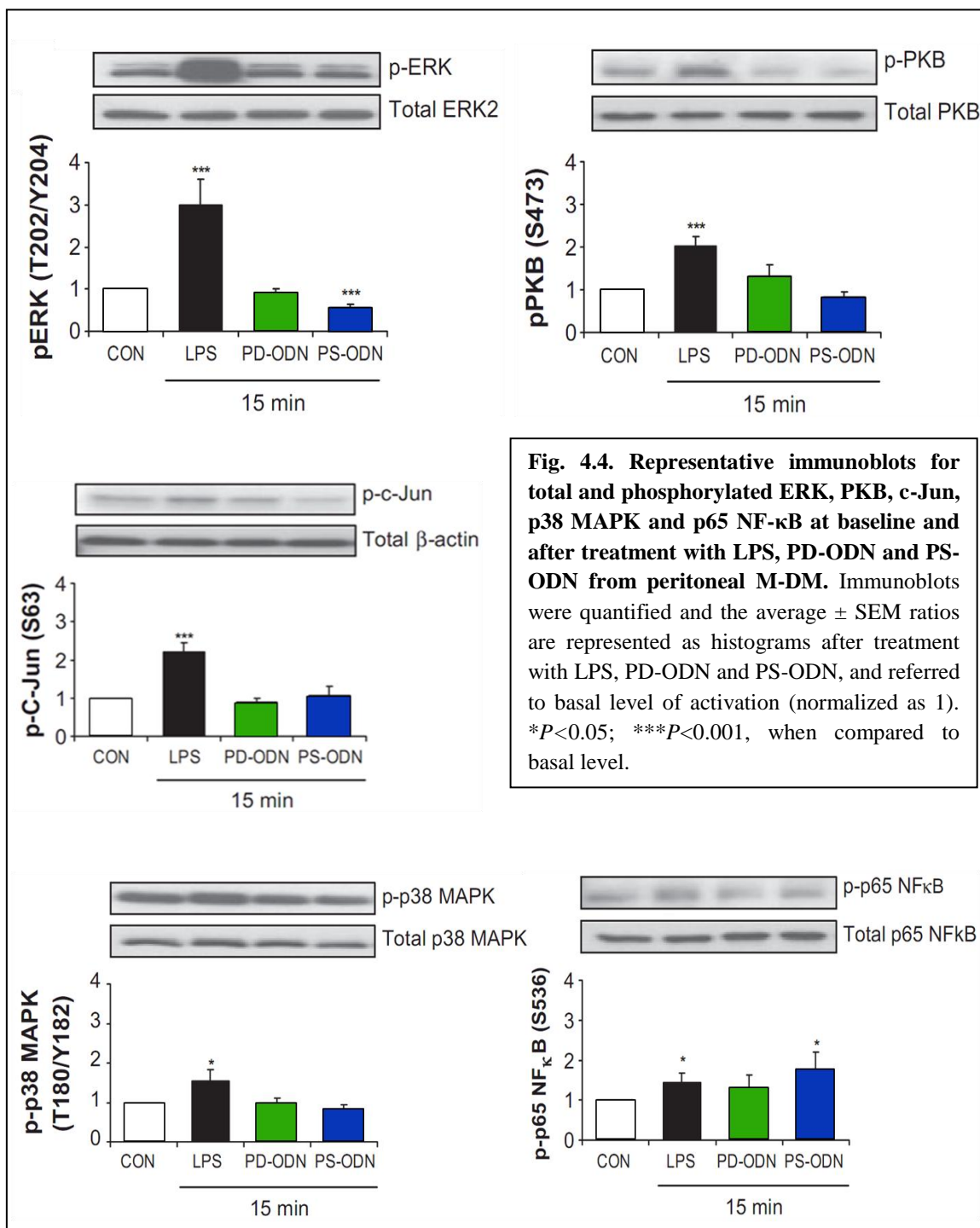
A positive correlation was established between basal IL-6 levels and ERK phosphorylation in peritoneal M-DM from patients with cirrhosis ($r = 0.9$; $p = 0.005$). The correlation was also almost achieved for c-Jun ($r = 0.8$; $p = 0.054$) but not for PKB, p38 or p65 NF- κ B phosphorylation ($p > 0.05$). No correlation was observed between TNF- α or IL-10 with any of the studied signaling molecules.



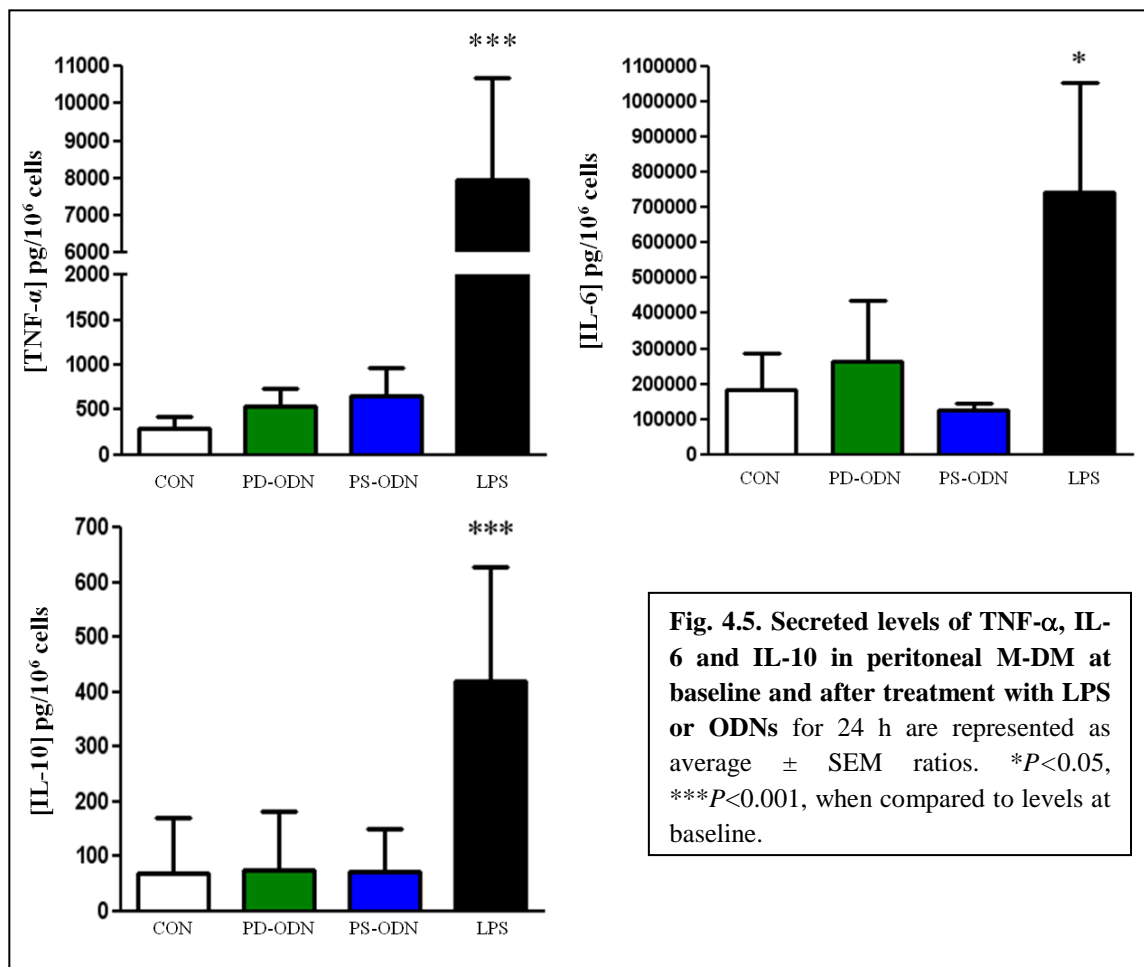


4.1.3. Peritoneal macrophage response to bacterial products.

M-DM from patients' AF responded differently to several bacterial products, as shown in Fig. 4.4. Phosphorylation levels of all studied signaling molecules were significantly further increased in response to LPS for 15 min, compared with levels at baseline (CON). Treatment with PD-ODN induced a not significant elevation of PKB/Akt and p65 NF- κ B phosphorylation, whereas PS-ODN was only able to further activate p65 NF- κ B in a statistically significant manner and, in fact, it significantly decreased the ERK phosphorylation compared with the control. Of interest, levels of phospho-ERK, phospho-PKB, phospho-c-Jun or phospho-p38 MAPK were not increased in response to both PS-ODN and PD-ODN. However, despite a higher activation of every pathway's intermediates by LPS, phosphorylated levels of p65 NF- κ B by synthetic ODNs were similar to those obtained after treatment with LPS. Time-point (15 min) and doses of LPS (5 μ g/mL), PD-ODN (100 μ g/mL) and PS-ODN (10 μ g/mL) were chosen after time-course and dose-response experiments on purified blood macrophages obtained from donors.



Production and release of cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 was measured in the supernatant of peritoneal M-DM cultures after treatment with optimum doses of LPS or ODNs for 24 h (Fig. 4.5). None of the ODNs used (PD-ODN and PS-ODN) induced a significant increase in TNF- α , IL-6 or IL-10 production in comparison with non-treated cells. Only addition of LPS significantly increased secretion of these mediators in peritoneal M-DM when compared with non-treated cells.



4.1.4. Discussion.

In this study, we demonstrate that peritoneal M-DM from patients with cirrhosis and non-infected ascites present a pre-activated immune status at baseline affecting their surface marker expression, intracellular signaling and IL-6 secretion profile. This fact probably indicates that repeated episodes of BT maintain a sustained immune response in these patients even in the temporal absence of bacterial antigens. This primed status would facilitate an IL-6-controlled fast response against repeated bacterial DNA translocation episodes.

Translocation of bacterial products can induce an inflammatory response, as severe as that caused by viable bacteria (Francés *et al.*, 2008) and it has been considered as a prognostic indicator in patients with cirrhosis and ascites (Zapater *et al.*, 2008). In these studies, though, a lack of a relationship between presence of bacterial DNA and likelihood of developing SBP has been reported. We hypothesized that, despite the

transient nature of bacterial DNA translocation episodes, the cell-mediated innate immune response holds on to an “alert” status that facilitates a fast reaction against subsequent BT episodes. Following this rationale, this study provides novel insights on primed peritoneal M-DM in patients with cirrhosis and ascites at three different levels, resumed in Fig. 4.1, 4.2 and 4.3. First, peritoneal M-DM, as selected by the pan marker CD14, show significant percentages of activation-related cell-surface markers. Second, signaling molecules ERK 1/2, PKB and c-Jun show significant phosphorylated levels in peritoneal M-DM at baseline. And third, cytokine secretion profile in peritoneal M-DM differs from that produced by blood monocytes. Notably, a clear increase in IL-6 levels is observed at baseline. This cytokine is involved in controlling mechanisms that contribute to inflammation and lead to chronic disease progression (Jones, 2005). A dual activity of IL-6 first, as an inducer of acute phase responses (Kishimoto *et al.*, 1995) and secondly, as protector of septic shock (Barton and Jackson, 1993; Diao and Kohanawa, 2005), has been reported. These counterbalanced activities bring IL-6 to the foreground of the inflammatory response that has even led to test anti-IL-6 or anti-IL-6 receptor antibodies in different clinical settings (Wendling *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 2004).

Despite differences observed in IL-6 levels, secreted TNF- α amounts in our series remain similar. In contrast, significant differences in NF- κ B between blood and peritoneal M-DM are observed. This suggests that the primed status of peritoneal M-DM allows maintaining an enhanced phosphorylated level of determined pathway's intermediates, while the down-stream molecule and, therefore, the final product of the pathway is not affected. Having increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines for a sustained period of time may be harmful for the patient and probably this mechanism is intended to prevent this situation. Inducing small amounts of anti-inflammatory cytokine IL-10 may counterbalance an excessive pro-inflammatory response in the AF. This assumption is supported by studies showing that IL-10 gene knock-out (KO) mice secrete higher amounts of TNF- α than wild-type after induction of liver injury (Louis *et al.*, 1998), or that higher colonic levels of TNF- α and IFN- γ are present in IL-10 KO mice compared with wild-type after induction of colitis (Arrieta *et al.*, 2009).

Despite inducing the activation of p65 NF- κ B, CpG-containing ODNs fail to further significantly induce the phosphorylation of MAPK p38, ERK and JNK substrate c-Jun, in comparison with LPS. A previous comparative study on macrophage

activation showed a higher immunomodulatory effect of *E. coli* DNA than several synthetic CpG-containing ODNs (Roberts *et al.*, 2005) and other investigations have reported differences in the TLR-ligand induced expression of MAPK signaling pathway molecules by other professional antigen-presenting cells (Dowling *et al.*, 2008). LPS activates both NF- κ B and c-Jun as a previous condition to induce cytokine production. However, PS-ODN activates NF- κ B but fails to activate c-Jun, providing an explanation for the lack of cytokine induction by this bacterial product. According to this, we can argue that regulation of cytokine production is dependent on activation of NF- κ B, but probably also on the activation of other molecules such as AP-1 (c-Fos/c-Jun).

Whether keeping a “switched-on” pro-inflammatory status on peritoneal M-DM of patients with decompensated cirrhosis, even in the absence of detectable antigens, has clinical consequences remains to be addressed. We postulate that an adequate level of priming might help in establishing a faster immune response against eventual bacterial insults. Results obtained in this study suggest that sustained phosphorylated ERK could be an important mediator of the cytokine balance in these patients through secretion of IL-6. These results are not necessarily related to the more differentiated status of resident peritoneal macrophages compared to blood monocytes in healthy conditions, since monocyte-differentiated macrophages stimulated with LPS produce less TNF- α (Daigneault *et al.*, 2010; Tudhope *et al.*, 2008) and IL-6 (Tudhope *et al.*, 2008) than peripheral blood monocytes, whilst lung macrophages produce similar levels of IL-6 after LPS stimulation than peripheral blood monocytes (Tudhope *et al.*, 2008).

In conclusion, this study shows that peritoneal M-DM from patients with decompensated cirrhosis are in a primed inflammatory status in the absence of detectable antigens, suggesting previous episodes of BT. Whereas this aspect is important, it has to be accepted that chronic inflammation in the liver (in the absence of any infection) might also be important and this could certainly also lead to observed immunostimulation of peritoneal macrophages. Results support our previous hypothesis of repeated and unadvertised episodes of translocation of bacterial products, and provide new insights on the apparently surprising lack of correlation between episodes of molecular translocation and development of SBP in a setting of increased mortality.

CHAPTER 4.2

The peritoneal macrophage inflammatory profile in cirrhosis depends on the alcoholic or hepatitis C viral etiology and is related to ERK phosphorylation.

Alcoholic liver disease (ALD) and HCV infection are the two major causes of chronic liver diseases in the developed world (Mas *et al.*, 2010). The development of ascites in a cirrhotic patient generally runs parallel with deterioration in clinical status and presages a poor prognosis. While the overall cirrhosis mortality rate has falling in the last three decades (Chen *et al.*, 2007), HCV mortality rates, closely associated with cirrhosis, have been increasing since the 1990s (Wise *et al.*, 2008). For the clinical management of cirrhosis, it is important to assess whether the differences in the outcomes of cirrhosis depend on the etiology. In this respect, the histopathology of alcohol-induced cirrhosis (ALC-C) and HCV-induced cirrhosis (HCV-C) is very similar and characteristic fibrosis patterns leading to cirrhosis can overlap in them (Uchimura *et al.*, 1995). Nonetheless, little is known regarding the differences and/or similarities between ALC-C (alcohol induced-cirrhosis) and HCV-C (HCV induced-cirrhosis) at the molecular level (Lederer *et al.*, 2006) and, to the best of our knowledge, no data on human peritoneal cells have been reported.

Global transcriptional profiling using oligonucleotide microarrays on liver biopsies from patients with cirrhosis showed that some genes are differentially expressed between ALC-C and HCV-C. Many of the gene expression changes specifically observed in HCV-induced cirrhotic livers were related to activation of the innate antiviral immune response, while differential mechanisms between chronic liver damage due to HCV or ethanol may be related to regulation of the lipid metabolism and macrophage activation resulting in the deposition of extracellular matrix components (Mas *et al.*, 2010, Lederer *et al.*, 2006). Additionally, several studies have demonstrated that alcohol exposure activates innate immunity and induces several pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , subsequently inducing hepatocellular damage. The activation of innate immunity also results in higher levels of hepatoprotective intermediaries, such as IL-6 (Gao, 2012), and anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, which play an important role in ameliorating alcoholic liver injury and inflammation (Miller *et al.*, 2011). However, chronic alcohol exposure attenuates the signaling pathways triggered by these cytokines, thereby limiting their anti-inflammatory and

hepatoprotective effects, and contributing to the development of ALD (McClain *et al.*, 2004).

M-DM play an important role as antigen-presenting cells of the innate immune response established against PAMPs, including bacterial DNA and LPS (Heller *et al.*, 2000). Moreover, bacterial DNA-activated cell-mediated immune response and nitric oxide overproduction through the inducible form of nitric oxide synthase in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites (Frances *et al.*, 2004) and, in the previous chapter we have shown the primed status of peritoneal M-DM from cirrhotic patients are related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion.

This study focuses on the inflammatory profile of ascites and peritoneal M-DM from patients with ALC-C or HCV-C to assess whether the immune status and inflammatory mechanisms leading to end-stage liver cirrhosis present a different pattern, depending on the agent that caused this pathology, and extrapolate out from previous studies performed in liver biopsies to immune cells in ascites.

4.2.1. Patient baseline characteristics.

A consecutive series of 61 patients with cirrhosis and ascites was initially recruited for the study. 16 patients were excluded due to episodes of gastrointestinal bleeding in the previous 2 weeks (n=2), culture-positive ascites (n=3), hepatocellular carcinoma (n=2), mixed alcoholic and viral etiology (n=4), hepatitis B virus infection etiology (n=1) or continuous use of norfloxacin as secondary prophylaxis of SBP (n=4). Finally 45 patients fulfilling all the inclusion criteria (see material and methods chapter) were included in the study, distributed according to disease etiology, HCV-C (n=15) or ALC-C (n=30). The clinical and analytical characteristics of patients are detailed in Table 4.II. Blood and ascites cultures were negative in all cases. None of the patients died during hospitalization or developed SBP.

As can be observed from Table 4.II, the absolute total number of ascitic leukocytes found in patients with HCV-C was significantly higher than in ALC-C patients. These differences were not detected in blood.

There were no significant differences as regards the rest of the clinical and analytical characteristics between the two groups of patients studied.

During 6-month follow-up study, 3 patients from the ALC-C group and one patient from the HCV-C group died. The causes of death in the ALC-C group were liver insufficiency (n=2) and renal failure (n=1). In the HCV-C group, the cause of death was renal failure (n=1).

Table 4.II. Clinical and analytical characteristics of patients included in the study.

Variable	Patients with cirrhosis and culture-negative ascites (n=45)	
	ALC-C (30)	HCV-C (15)
Etiology		
Age	58.5 (12.5)	58 (24)
Male sex n (%)	30 (100.0)	14 (93.3)
Previous episodes of ascites n (%)	25 (83.3)	13 (86.6)
Bacterial DNA translocation n (%)	7 (23.3)	5 (33.3)
Child-Pugh mean score	10 (3)	9 (3)
Meld mean score	14.5 (10)	14 (5)
Bilirubin (mg/dL)	2.7 (3)	1.85 (1.7)
Albumin (g/dL)	2.9 (1.1)	2.85 (0.9)
Quick (%)	64 (18)	54 (24)
Serum creatinine (mg/dL)	1.07 (1.2)	1 (0.5)
Serum sodium (mEq/L)	134 (6.3)	136 (7)
INR	1.45 (0.3)	1.46 (0.6)
Blood WBC/mm ³	4260 (2400)	3930 (4040)
Ascites WBC/mm ³	21.29 (47.4)	49 (82.8) *
Ascites Total protein (g/dL)	1.7 (0.3)	1.6 (1)
<i>Continuous variables are expressed as median (IQR) and categorical variables as percentage. Mann-Whitney U test * p<0.05</i>		

4.2.2. HCV-C is associated with increased counts of some leukocyte subpopulations in ascites.

To further explore differences in the number of leukocytes present in the ascites of both groups, the leukocyte subpopulations were characterized by flow cytometry analysis based on both the morphology and CD receptor expression criteria. The results presented in Table 4.III show that T lymphocytes, PMNs and M-DM counts were high in the ascites of HCV-C patients compared with the ALC-C group. A study of subset cell type distribution in blood showed no significant differences between ALC-C and HCV-C patients.

Table 4.III. White blood cell distribution in ascites.

Cell type/mm ³	Etiology	
	ALC-C	HCV-C
PMNs	0.5 (4.4)	3.4 (7)*
M-DM	6.95 (12.6)	14.8 (19.9)*
T Lymphocytes	7.37 (12.6)	14,66 (22.6)*
B Lymphocytes	0.16 (0.5)	0.21 (0.3)
NK cells	1.22 (2.2)	2.01 (5.6)
<i>Results are expressed as median (IQR). Mann-Whitney U test: * p<0.05.</i>		

4.2.3. Anti-inflammatory cytokine levels are higher and pro-inflammatory levels are lower in the ascites of HCV-C cirrhotic patients.

Fig. 4.6 shows the concentration in pg/mL of IL-10, IL-12, IL-1 β , IL-6 and TNF- α . The results showed that the ascites from the HCV-C group had lower levels of pro-inflammatory cytokines, although the differences between both groups were statistically significant only in the case of IL-12. The results also revealed that IL-10 anti-inflammatory cytokine levels in the ascites of HCV-C patients were significantly higher than the corresponding levels from the ALC-C group of cirrhotic patients.

It has been described that the presence of bacterial DNA in blood and ascites of cirrhotic patients is associated with an enhanced TNF- α and IL-12 levels in the AF (Francés *et al.*, 2008). These experiments were developed in cirrhotic patients with mixed etiologies, where the percentage of ALC-C patients varied in the groups of DNA positive or negative patients, while the rest of the etiologies were not specified.

To rule out the possibility of working with heterogeneous populations in terms of cytokine profile, we next study the cytokine levels in ascites of cirrhotic patients in function of the bacterial DNA translocation. In order to do so, we subdivided the alcoholic and the HCV groups, in bacterial DNA negative or positive groups, and analyzed the cytokine concentration by ELISA in AF. Our results revealed that there are not statistical significant differences between bacterial DNA positive or negative ALC-C patients in the ascites cytokine levels for IL-10 (p= 0.601), IL-12 (p= 0.710), IL-6 (p= 0.659), IL-1 β (p= 0.400) or TNF- α (p= 0.887). Similar results were found in the HCV-C patients (IL-10, p= 0.432; IL-12, p= 0.190; IL-6, p= 0.876; IL-1 β , p= 0.393; and TNF- α , p= 0.083).

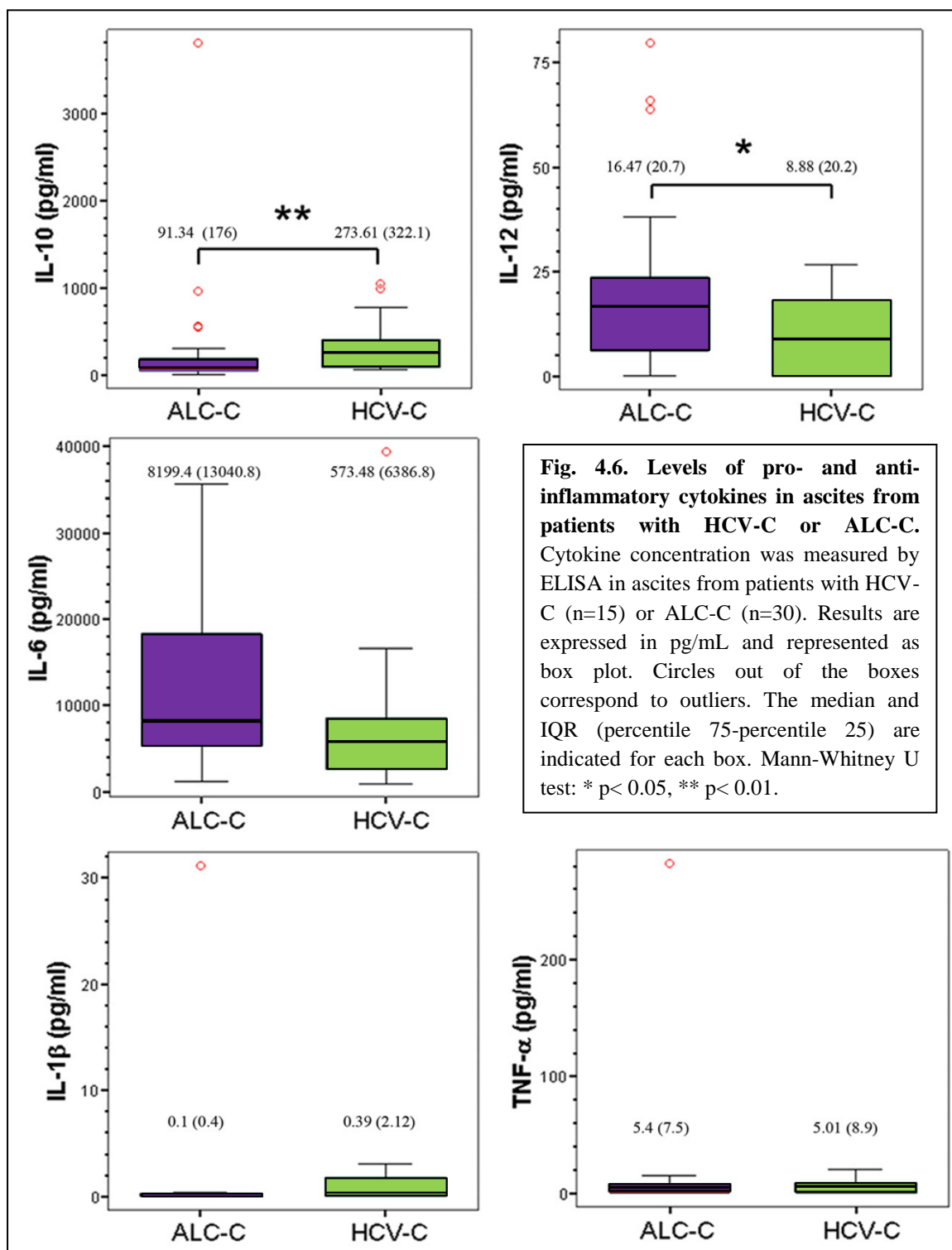


Fig. 4.6. Levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in ascites from patients with HCV-C or ALC-C. Cytokine concentration was measured by ELISA in ascites from patients with HCV-C (n=15) or ALC-C (n=30). Results are expressed in pg/mL and represented as box plot. Circles out of the boxes correspond to outliers. The median and IQR (percentile 75-percentile 25) are indicated for each box. Mann-Whitney U test: * p < 0.05, ** p < 0.01.

4.2.4. Peritoneal M-DM isolated from ascites of cirrhotic patients maintain their cytokine secretory profile *in vitro*.

We next compared the cytokine production ability of the peritoneal M-DM from HCV-C and ALC-C patients, first exploring the relative contribution of the M-DM to the cytokines contained in ascites by referring the concentration of cytokines to the number of this cell type (Fig. 4.7). Then we analyzed the basal production of cytokines in 24 h cultures of the M-DM population isolated from ascites (Fig. 4.8).

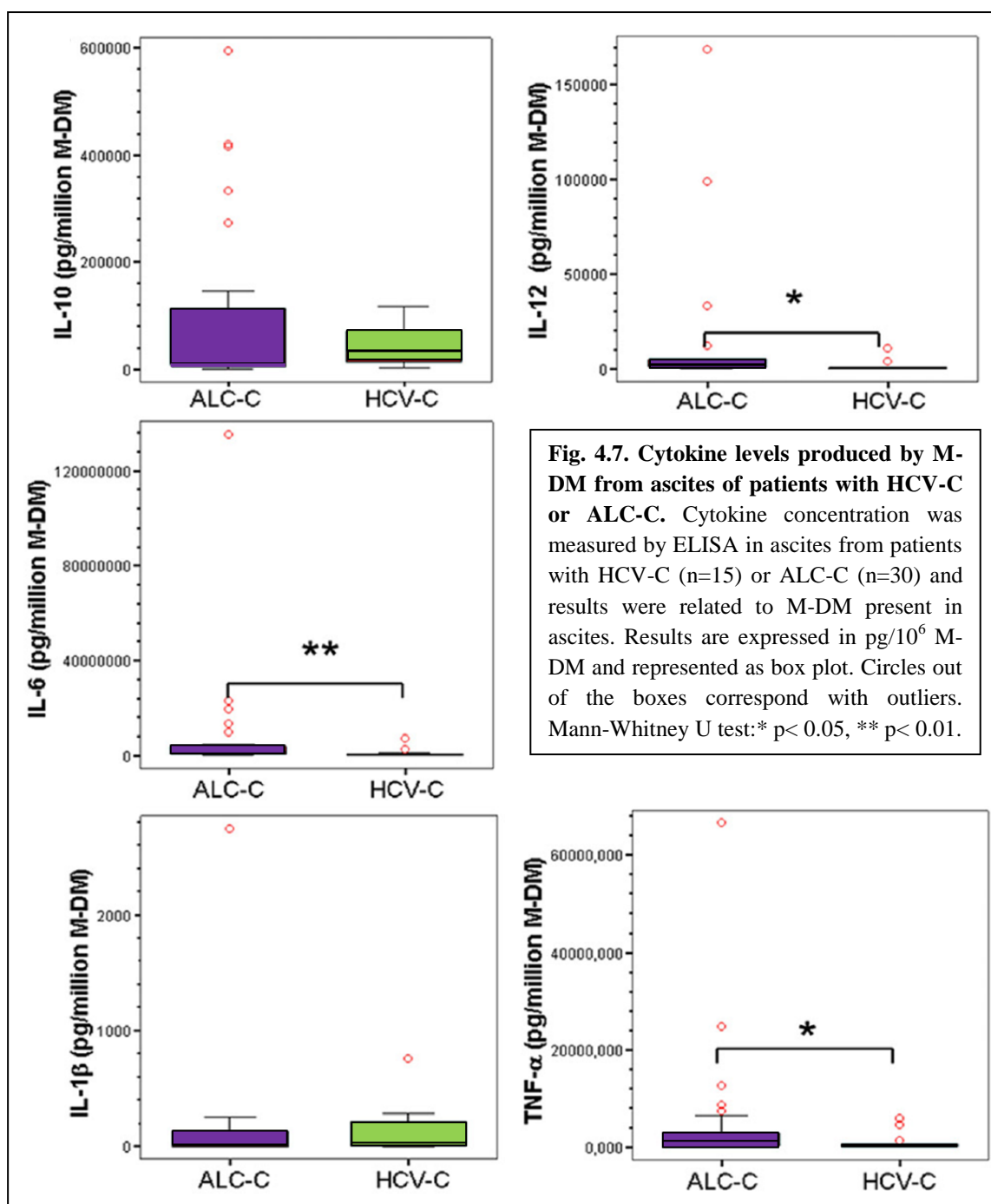


Fig. 4.7. Cytokine levels produced by M-DM from ascites of patients with HCV-C or ALC-C. Cytokine concentration was measured by ELISA in ascites from patients with HCV-C (n=15) or ALC-C (n=30) and results were related to M-DM present in ascites. Results are expressed in pg/10⁶ M-DM and represented as box plot. Circles out of the boxes correspond with outliers. Mann-Whitney U test: * p < 0.05, ** p < 0.01.

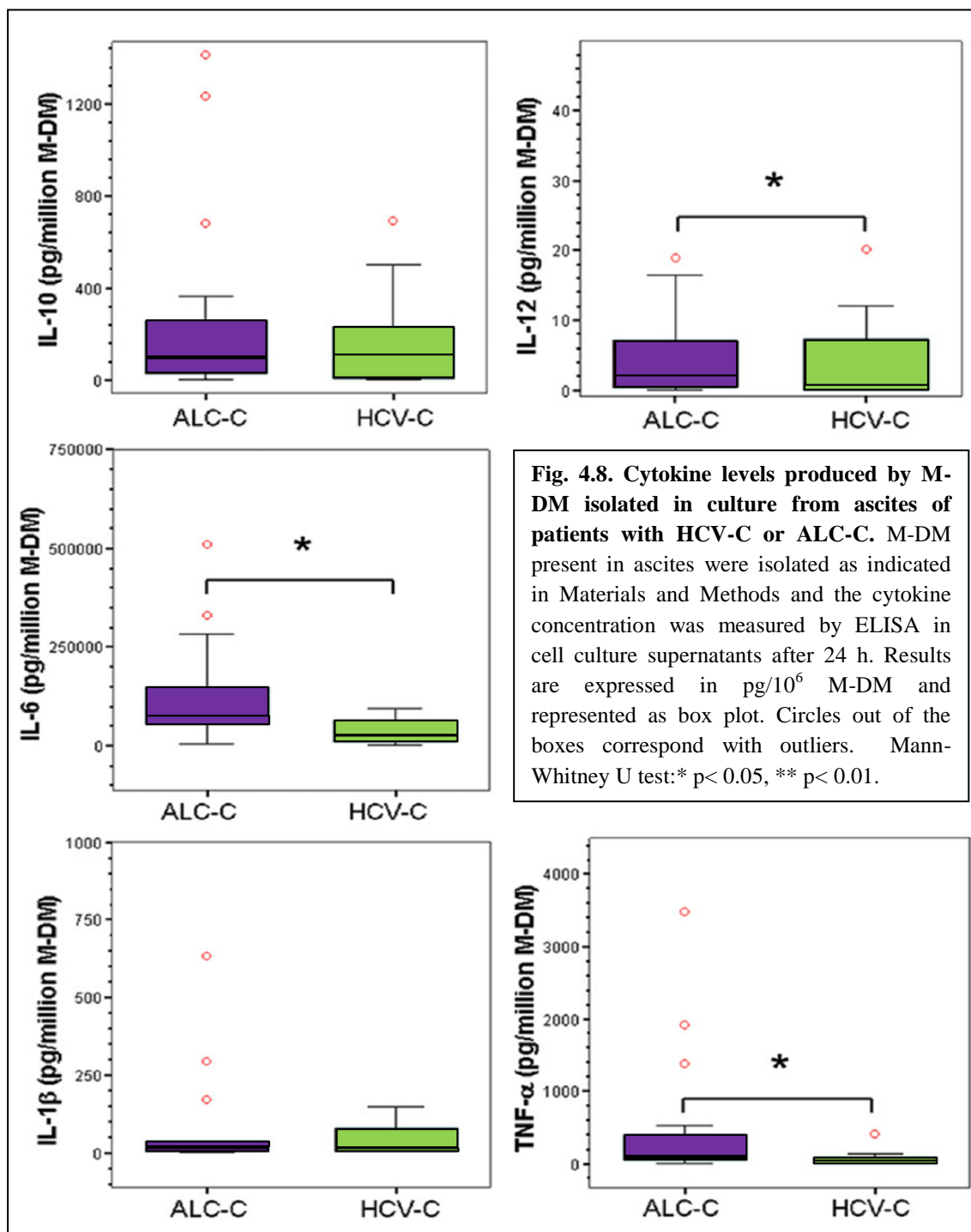


Fig. 4.8. Cytokine levels produced by M-DM isolated in culture from ascites of patients with HCV-C or ALC-C. M-DM present in ascites were isolated as indicated in Materials and Methods and the cytokine concentration was measured by ELISA in cell culture supernatants after 24 h. Results are expressed in pg/10⁶ M-DM and represented as box plot. Circles out of the boxes correspond with outliers. Mann-Whitney U test: * p < 0.05, ** p < 0.01.

The results revealed that M-DM from the HCV-C group produce significantly lower levels of IL-12, but also of IL-6 and TNF-α cytokines, than the ALC-C group when M-DM were isolated and cultured *in vitro* (Fig. 4.8). These data are consistent with those of cytokine levels in the ascites (Fig. 4.7), indicating that M-DM are “primed” by the pathological microenvironment and preserve their secretory profile, being more pro-inflammatory in the case of ALC-C group.

No significant differences in IL-10 production were observed between the two groups as regards as M-DM cultured *in vitro*, nor with respect to M-DM present in ascites, indicating that M-DM are not the main cell type responsible for the differences found for this cytokine in ascites.

4.2.5. Peritoneal M-DM isolated from ascites of cirrhotic patients are able to further respond to *in vitro* stimulation with several microbial stimuli.

SBP caused by the translocation of intestinal bacteria and their products, such as LPS or bacterial DNA, is one of the main life-threatening complications of cirrhosis. Given this, the quality and intensity of the peritoneal immune response plays a crucial role in the prognosis of these compromised patients. To seek further insight into the ability of cirrhotic peritoneal M-DM to respond to different PAMPs, we studied the capability of isolated M-DM to respond to LPS, synthetic CpG-ODNs and heat-killed *C. albicans* as examples of stimuli able to trigger activation and phagocytosis through different PRRs. For this purpose, the cytokines produced by M-DM cultured for 24 h in the presence of these stimuli were studied. The results shown in Table 4.IV reveal that this cell population is able to further recognize and respond to different PAMPs, although significant differences were observed, depending on the cytokine in question and the specific stimuli applied. The results shown in Table 4.IV point to a, first strong significant response of TNF- α secretion in the presence of LPS and *C. albicans* in M-DM from both groups of patients. Second, IL-6 and IL-10 secretion was significantly increased in all stimulatory conditions, except in the M-DM from ALC-C patients after stimulation by ODN. Third, the relative increases in IL-6 was significantly higher in HCV-C for the three stimuli assayed, while the increase in IL-10 secretion was only significant in the HCV-C group stimulated by ODN. Fourth, secreted IL-12 was only significantly increased by LPS and *C. albicans* in M-DM obtained from ALC-C patients. Finally, LPS and *C. albicans* induced a significant increase in secreted IL-1 β in M-DM from both groups of patients compared with their respective controls, although no significant differences were observed between groups.

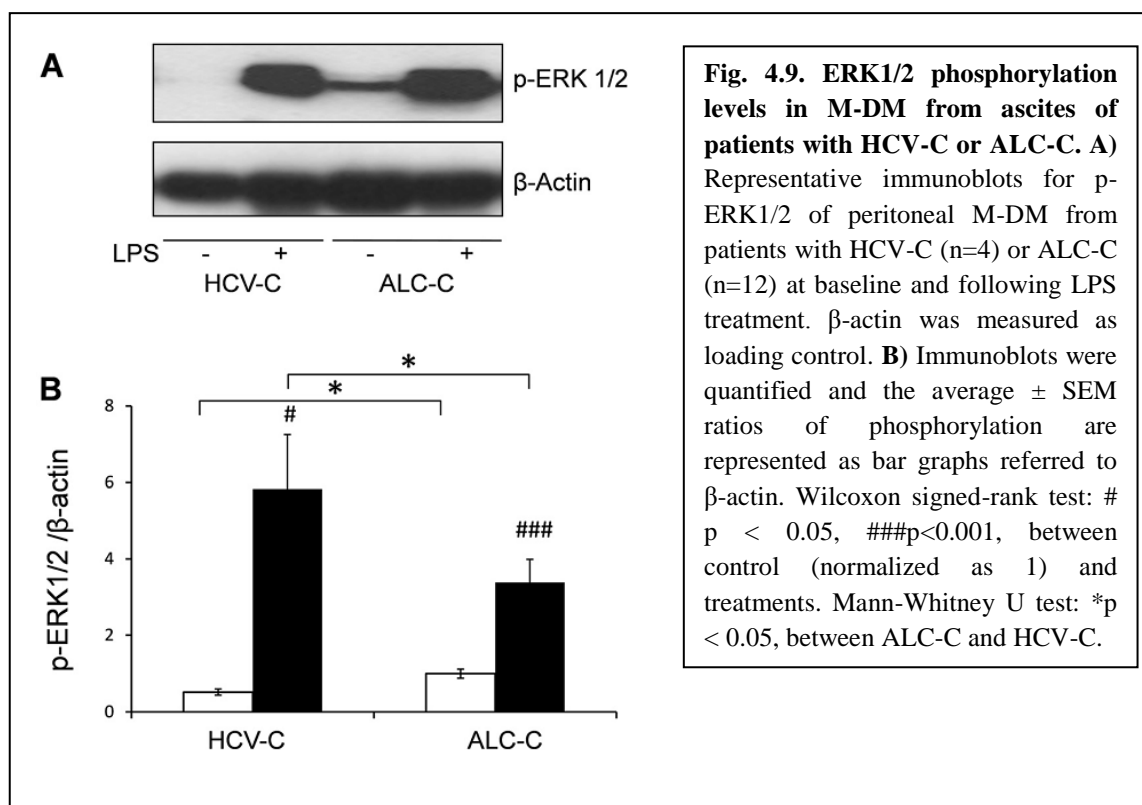
Table 4.IV M-DM response to *in vitro* stimulation.

Cytokines	Etiology	Fold activation		
		LPS	ODN	<i>C. albicans</i>
TNF- α	ALC-C	89.26 (204.5) ^a	0.89 (1.7)	170.92 (374.6) ^a
	HCV-C	97.61 (163.9) ^a	2.42 (4.9)	4334.96 (595.4) ^a
IL-6	ALC-C	2.73 (3.5) ^a	0.84 (5.8)	3.35 (10.4) ^a
	HCV-C	5.97 (19.6) ^{*,a}	1.26 (7.2) ^{*,a}	5.68 (37.2) ^{*,a}
IL-10	ALC-C	9.06 (6.2) ^a	0.77 (0.6)	13.7 (24.5) ^a
	HCV-C	11.33 (13.9) ^a	1.4 (2.6) ^{*,a}	223.4 (45.3) ^a
IL-12	ALC-C	1.75 (3.4) ^a	2.1 (8.4)	3.7 (6.6) ^{a,*}
	HCV-C	3.15 (4.8)	6.6 (17.4)	1.93 (1.1)
IL-1 β	ALC-C	20.21 (63) ^a	1.5 (10)	46.85 (135.6) ^a
	HCV-C	10.89 (24.7) ^a	2.11 (2.73)	15.4 (28.5) ^a

Results are expressed as median (IQR). Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$ between ALC-C and HCV-C; Wilcoxon signed-rank test: ^a $p < 0.05$ between control and treatments

4.2.6. ERK1/2 phosphorylation levels are lower in peritoneal M-DM isolated from ascites of patients with HCV-C vs. ALC-C.

In previous chapter we have described the primed status of peritoneal macrophages in cirrhosis, finding it to be related to ERK1/2 phosphorylation and IL-6 secretion. We therefore further analyzed the phosphorylation of ERK1/2 at baseline and in the presence of LPS in M-DM from both group of patients. As shown in Fig. 4.9, the results confirmed the primed status of ERK1/2 phosphorylation in peritoneal M-DM from ALC-C patients, which is consistent with the high concentration of IL-6 with respect to M-DM in ALC-C ascites, as well as with the IL-6 level produced *in vitro* by isolated M-DM cells from ALC-C patients. In contrast, baseline phosphorylation of ERK1/2 in M-DM from HVC-C patients was very low, although its relative increase after exposure to LPS for 15 min was higher than the corresponding increase in M-DM from ALC-C group. Again, this observation is consistent with the relative increase of IL-6 after LPS stimulation described above. These results confirm and extend the positive correlation previously established between basal IL-6 levels and ERK phosphorylation in peritoneal M-DM from patients with cirrhosis, and point to significant differences between ALC-C and HCV-C patients as regards the primed status at baseline.



4.2.7. Discussion.

Clinical research in human diseases is largely based on samples obtained by surgical or aggressive procedures from extremely ill patients. This implies the use of convenience samples of limited size rather than larger samples drawn at random from the population. Therefore, the main limitation of this type of study on the immune status in cirrhotic ascites is the nature and size of the sample. To minimize this limitation we processed consecutive samples obtained from cirrhotic patients from two different institutions during a three year period. A robust statistical test was used to ensure that the observed differences were significant. Nevertheless, this still does not solve the important question of whether results observed in samples of convenience can be generalized to the larger population. Herein we show first, that compared with ALC-C, HCV-C associated ascites contains a significantly higher number of leukocytes, although these findings did not match the cellular distributions observed in the peripheral blood. This indicates that the absolute cell number and population distribution of peritoneal leukocytes in cirrhotic ascites varies with the underlying cause and does not mirror the situation in peripheral blood. In this regard it is important to remark that the majority of studies on immune cells in human cirrhosis have been

performed in blood samples, mainly due to the difficulty involved in obtaining and managing ascites (Ferri *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2010) and in to a lesser extent, in liver biopsies (Lemmers *et al.*, 2009, Bonacini *et al.*, 2007). Thus, it is interesting to further explore the ascites in order to extrapolate data on immune cells from the above three types of samples to better understand the mechanisms underlying the pathogenesis of liver damage, enabling doctors to predict the risks and outcomes of apply the appropriate treatments.

Furthermore the findings also reveal that leukocyte migration towards the peritoneal cavity is not a passive process induced by hemodynamic anomalies associated to cirrhosis, like portal hypertension, but more of an active chemoattractant-induced process, recruiting leukocytes not only from blood vessels, but also from impaired lymphatic drainage (Ribera *et al.*, 2012). Moreover, the higher number of leukocytes in ascites from HCV-C vs ALC-C group resulted from increases in the T lymphocyte, PMN and monocyte cell subpopulations. This suggests that a specific differential pattern of chemoattractant stimuli must be involved in the recruitment of each particular cell population, depending on the microbial stimuli involved in the cirrhosis etiology. In this regard, it has been shown that the expression of the chemokines CCR1, -2, -5 and CXC-1 is induced in patients with chronic liver diseases, so that intrahepatic increases of CCL3-5 and IL-8 chemokines would be involved in recruiting not only monocyte/macrophages but also other immune cell populations (Zimmermann *et al.*, 2010, Zimmermann *et al.*, 2011).

Our results also showed that ascites from HCV-C patients exhibits a significantly lower concentration of IL-12 pro-inflammatory cytokine and a significant higher amount of the anti-inflammatory cytokine IL-10 compared with the ALC-C group, suggesting a predominant Th2/Treg profile in the pathogenesis of advanced HCV-C. Indeed, it has been described that HCV by itself induces intrahepatic Th1 cells (Delhem *et al.*, 2008), expands peripheral Treg in patients with normal aminotransferases (Ferri *et al.*, 2011) and affects dendritic cell function, switching the cytokine profile towards a suppressive phenotype of IL-10 and TGF- β predominance, preventing cell maturation and inhibiting the allostimulating capacity (Osna, 2009). However, when cytokine levels were compared with the number of M-DM contained in ascites of these patients, or secreted *in vitro* by isolated peritoneal M-DM, apart from differences in IL-12, the concentration of IL-6 and TNF- α also significantly differed between both groups of

patients. Furthermore, this fact was associated with lower baseline ERK1/2 phosphorylation than observed in the ALC-C group.

Four conclusions can be drawn from these findings. First, these results confirm and extend the positive correlation established between basal IL-6 levels and ERK phosphorylation in peritoneal M-DM from patients with cirrhosis, showed previously. Second, they indicate that M-DM are “differently primed” by the *in vivo* pathophysiological environment and preserve their inflammatory differentiation profile for at least 24 h, being more pro-inflammatory in the case of ALC-C. This “alert state” could provide an advantage for preventing the development of SBP in intermittent events of intestinal BT in ALC-C patients. Third, they confirm the predominantly immune inhibited status of M-DM in the end-stages of HCV-induced hepatic damage compared with ALC-C (Sreenarasimhaiah *et al.*, 2003), which may be intended to prevent immune-mediated decompensation. Fourth, the drop of significant differences in IL-10 levels with respect to M-DM strongly suggests that other immune cells are contributing to the total amount of this anti-inflammatory cytokine in ascites of the HCV-C group, especially Treg subpopulations. However, this does not mean that M-DM from HCV-C are functionally exhausted or endotoxin-tolerant as described (Lin *et al.*, 2007), since they are able to further respond to stimulation by several PAMP agonists. In fact, the relative increase of IL-6 secretion and ERK1/2 phosphorylation in isolated M-DM stimulated by LPS was significantly higher in HCV-C than in ALC-C patients. The same results were obtained for IL-6 secretion induced by ODN and *C. albicans*, and IL-10 induced by ODN from the HCV-C group. The above findings also point to the differential expression and/or susceptibility to ligands of PRRs in the M-DM present in ascites from both types of cirrhotic patient. Supporting this hypothesis, the clear up-regulation of TLRs has been reported in specimens from patients with HCV infection (Dolganiuc *et al.*, 2006, Mozer-Lisewska *et al.*, 2005) and ALC-induced liver damage (reviewed in (Seki and Brenner, 2008).

SBP caused by BT and their products such as LPS or bacterial DNA is one of the main life-threatening complications of cirrhosis (Such and Runyon, 1998). Faced with this condition, the quality and intensity of the peritoneal immune response seemingly plays a crucial role in the prognosis of these compromised patients. The lower inflammatory profile of ascites of the HCV-C compared with alcoholic etiology could also be the result of the hypothetically lower frequency of intestinal bacterial

translocation in HCV-C patients. Our results indicate the need for additional studies with a larger clinical sample to answer the question as to whether or not the difference in the MD-M peritoneal inflammatory status could influence the clinical outcome of patients beyond six months or the tolerance of a transplanted liver.

CHAPTER 4.3

Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from ascites of cirrhotic patients.

Liver cirrhosis is associated with increased hepatic and systemic inflammatory mediators, including TNF- α , IL-6, and IL-8 (Dasarathy, 2008). Chronic hepatic inflammation and fibrosis are the key features associated with macrophage accumulation in the liver (Ramachandran and Iredale, 2012). These cells can account for many of the pathophysiological events associated with liver cirrhosis (Heymann *et al.*, 2009), so that they are good candidates to be current targets for anti-inflammatory therapy intended to avoid progression of liver damage. PAMPs, such as LPS, bacterial DNA, mannan and glucans, among others, are potent stimulants of cytokine secretion from cells of the monocyte lineage (Sparwasser *et al.*, 1997, Jouault *et al.*, 2009). M-DM, have an important pleiotropic function as phagocytic, immuno-regulatory, and antigen-presenting cells of the innate immune system (Serbina *et al.*, 2008).

Several new approaches targeting inflammation associated with different diseases are in clinical development, including inhibition of MAPK (Karin, 2005, Hattori *et al.*, 2007, Coulthard *et al.*, 2009). As depicted in Fig. 4.10, the MAPK kinases (MKK1/MEK1) phosphorylate and activate ERK 1/2. This pathway is important in the induction and release of IL-8 from *Haemophilus influenzae*-stimulated human epithelial cells (Wang *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2006) showed that LPS stimulated monocyte cytokine release was p38 MAPK-dependent, although the effect in macrophages was more unclear.

Differentiation of monocytes toward a particular macrophage phenotype may convey activation of alternative MAPK pathways (Ivashkiv, 2011). The principal aim of this work was to explore the relative importance of several intracellular signaling routes implied in the expression and the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines in a population of activated macrophages obtained from a pathological and habitually little accessible scene, and therefore scarcely studied, such as the ascites of cirrhotic patients. To this end, as shown in Fig. 4.10, we compared the relative importance of ERK1/2, JNK and p38 MAPK and PI3K-Akt pathways on the release of inflammatory (TNF- α and IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in LPS- and heat killed *C. albicans*-

stimulated M-DM obtained from the ascites of cirrhotic patients trying to identify novel targets for pharmaceutical intervention to prevent hepatic damage.

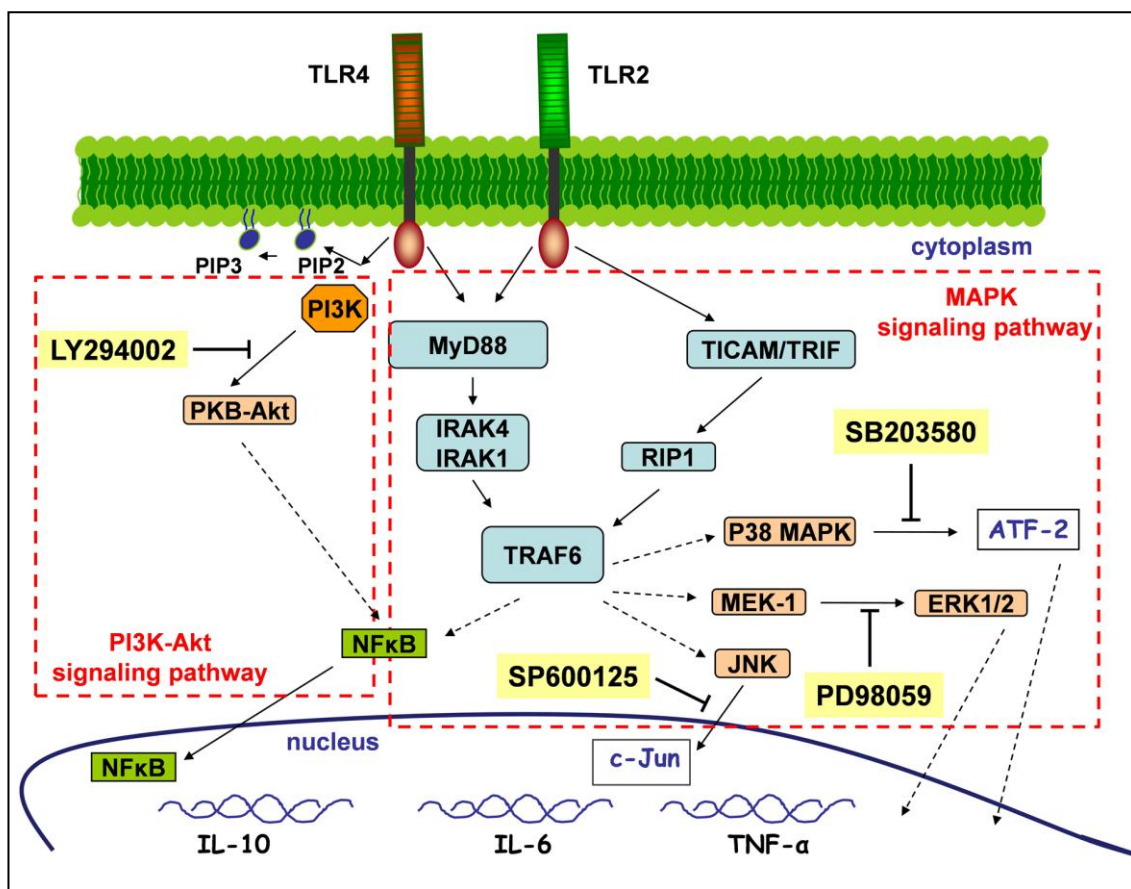


Fig. 4.10. TLR4 and TLR2 cell signaling pathways in normal subjects. TLR-2 and 4 engagement, induces activation of PKB-Akt and MAPK intracellular signaling pathways leading to the phosphorylation of several molecules, which control the expression levels of pro- and anti-inflammatory cytokines. The targets of PD98059, SB203580, SP600125 and Ly294002 inhibitors (yellow boxes), are indicated by dashed arrows.

4.3.1. LPS- and heat killed *C. albicans*-induced activation of cell signaling molecules in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites.

Previously, we have described that peritoneal macrophages from ascites of cirrhotic patients display a statistically significant higher baseline activation level of the cell signaling kinases ERK 1/2, PKB and the transcriptional factor c-Jun than those observed in M-DM obtained from the blood of healthy controls; and in contrast, the p38 MAPK and in a more extend the p65 NF-κB, show a lower pattern of phosphorylation. Here we further extended the analysis of LPS- and heat killed *C. albicans*-induced activating response of these intracellular signaling molecules in M-DM obtained from

the ascites of cirrhotic patients. The clinical and analytical characteristics of patients included in this study are shown in Table 4.V.

Table 4.V. Clinical and analytical characteristics of patients included in the study.

Variable	Patients with cirrhosis and culture-negative ascites (n = 14)
Etiology (n)	ALC (7), HCV (7)
Age	59 (21.5)
Male sex n (%)	14 (100.0)
Previous episodes of ascites n (%)	12 (85.7)
Child-Pugh mean score	8.5 (6.5)
Meld mean score	15.5 (7.2)
Bilirubin (mg/dL)	1.85 (2)
Albumin (g/dL)	2.95 (0.9)
Quick (%)	57 (27.5)
Serum creatinine (mg/dL)	1.26 (0.9)
Serum sodium (mEq/L)	135 (7.7)
INR	1.49 (0.4)
Blood WBC/mm ³	4530 (2870)
Ascites WBC/mm ³	39.29 (87.3)
Ascites Total protein (g/dL)	1.65 (1.5)
<i>Continuous variables are expressed as median (IQR) and categorical variables as percentage. ALC: alcohol intake; HCV: HCV chronic infection.</i>	

Fig. 4.11 shows representative immunoblots for phosphorylated ERK 1/2, substrate of MEK1; phosphorylated ATF-2, substrate of p38 MAPK; phosphorylated c-Jun, substrate of JNK; and phosphorylated PKB-Akt, substrate of PI3K, from cell extracts of peritoneal M-DM at baseline or following treatment with *C. albicans* (Ca) and LPS with or without co-treatment with several signaling inhibitors. Cells were preincubated with the designed inhibitor for 30 min before adding *C. albicans* or LPS. Cell extracts were obtained after 15 min of *C. albicans* or LPS treatment. As can be observed in Fig.4.11, LPS and *C. albicans* induced a strong increase of the phosphorylation levels of ERK1/2, followed by a lower increase of c-Jun, PKB and ATF-2. The inhibitory activity of PD98059, SB203580, SP600125 and Ly294002 upon their specific kinases, MEK1, p38 MAPK, JNK and PI3K respectively, at baseline and after LPS-stimulation is also shown.

the ascites of cirrhotic patients was significantly increased in response to both LPS and *C. albicans* (12.3 and 12.9 fold activation, respectively). In this case, the inhibition of MEK1 produced the most significant reduction of the IL-6 secretion induced by LPS (83.2%), while the inhibition of PI3K had the highest effect (78.7% inhibition) on decreasing the IL-6 secretion induced by *C. albicans*.

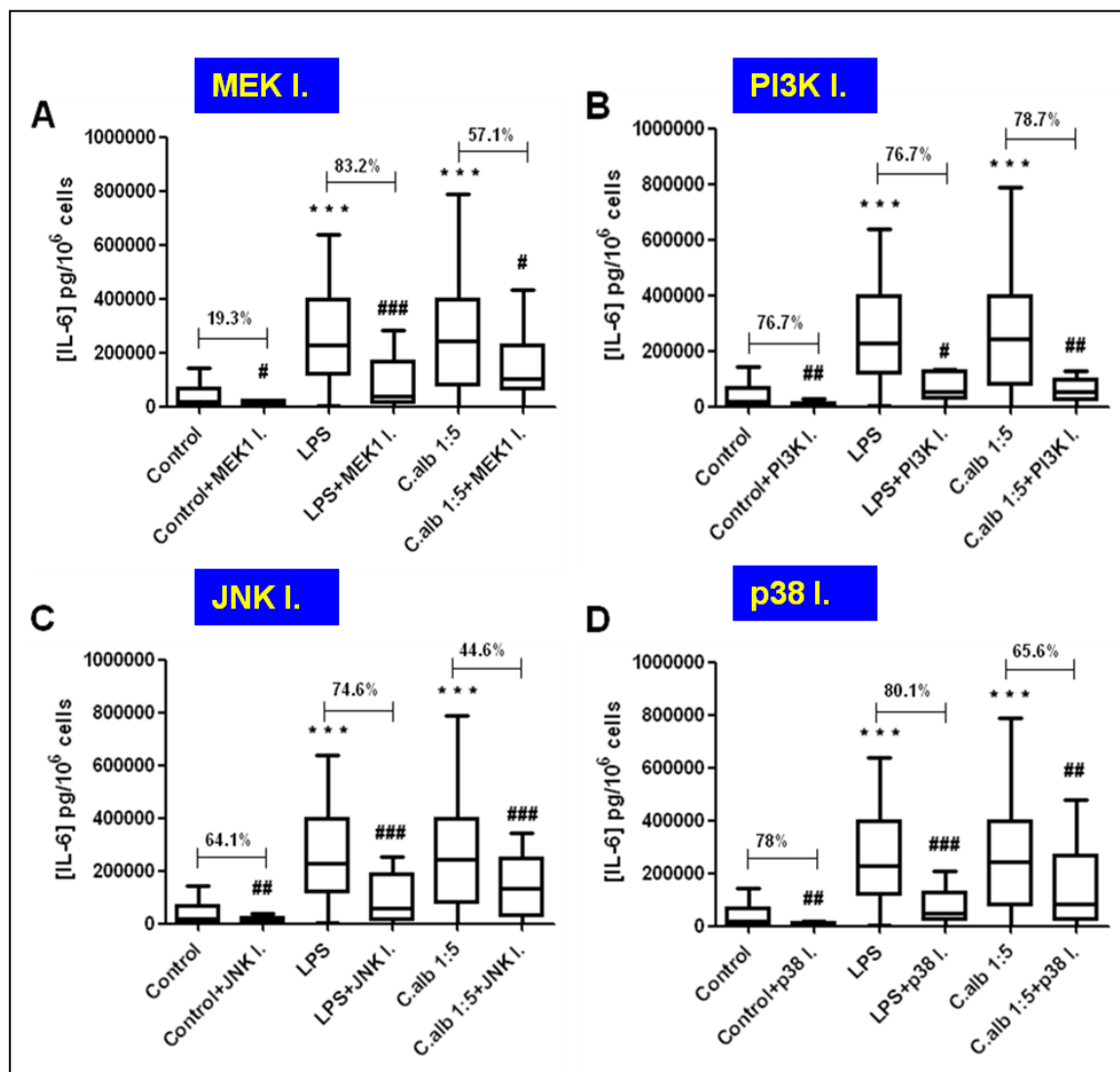


Fig. 4.12. Effect of cell signaling inhibitors on the IL-6 release from peritoneal M-DM. Peritoneal M-DM from patients with cirrhosis and ascites were isolated and the IL-6 concentration was measured by ELISA in 24 h cell culture supernatants at baseline or following treatment with *C. albicans*, or LPS with or without co-treatment with the signaling inhibitors for MEK1 (A), PI3K (B), JNK (C) and p38 MAPK (D). Results are expressed as pg IL-6/10⁶ cells and represented as box plot. Wilcoxon signed-rank test: *** p < 0.001 between control and LPS or *C. albicans* treatments; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 between absence and presence of signaling inhibitors for each condition (resulting % of inhibition are indicated over the boxes).

4.3.3. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed *C. albicans*-stimulated TNF- α release from peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites.

TNF- α is a potent inflammatory cytokine involved in acute and chronic inflammatory diseases. Thus, we next sought the effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and *C. albicans*-stimulated TNF- α release from peritoneal M-DM from cirrhotic patients.

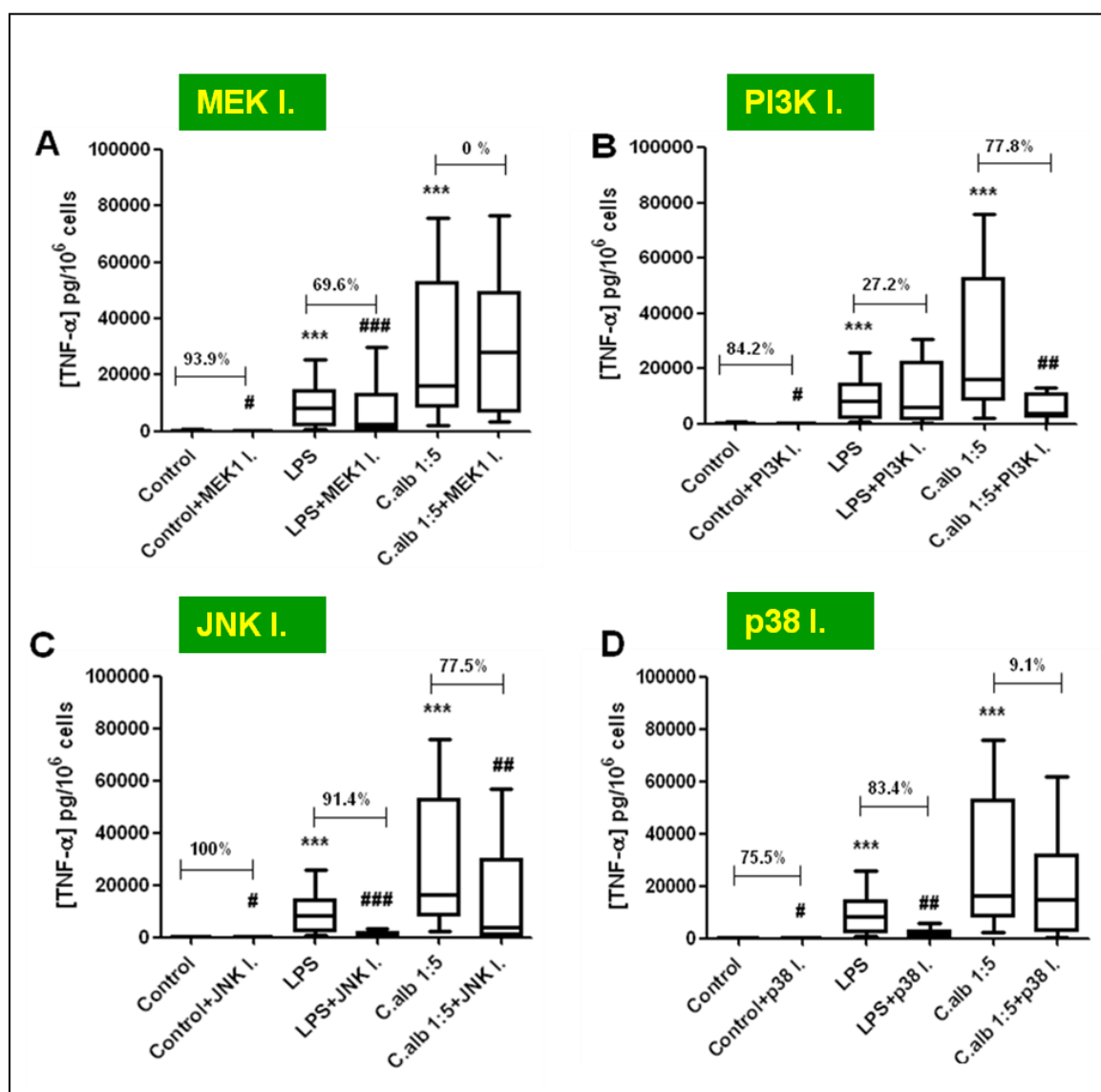


Fig. 4.13. Effect of cell signaling inhibitors on the TNF- α release from peritoneal M-DM. Peritoneal M-DM from patients with cirrhosis and ascites were isolated and the TNF- α concentration was measured by ELISA in 24 h cell culture supernatants at baseline or following treatment with *C. albicans*, or LPS with or without co-treatment with the signaling inhibitors for MEK1 (A), PI3K (B), JNK (C) and p38 MAPK (D). Results are expressed as pg TNF- α /10⁶ cells and represented as box plot. Wilcoxon signed-

rank test: *** $p < 0.001$ between control and LPS or *C. albicans* treatments; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ between absence and presence of signaling inhibitors for each condition (resulting % of inhibition are indicated over the boxes).

As can be observed in Fig.4.13 the baseline secretion of TNF- α (143.3 pg/10⁶ cells) was significantly decreased in the presence of all the inhibitors assayed, with the highest effect exerted by the JNK inhibitor (100% inhibition). As expected, LPS induced a significant strong increase of the secretion of TNF- α (58.6 fold increase), that was statistically decreased by inhibitors of MAPK, especially those inhibiting the JNK and the p38 (91.4% and 83.4% inhibition respectively). In contrast, inhibition of PI3K did not achieve a significant decrease of LPS-induced TNF- α secretion. Stimulation of peritoneal M-DM with *C. albicans* induced a strong effect on secretion of TNF- α (113.3 fold increase). Strikingly, inhibition of MEK1 turn out to favour *C. albicans*-induced secretion of TNF- α , which was only statistically inhibited in the presence of the PI3K inhibitor (77.8%) and the JNK inhibitor (77.5%).

4.3.4. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed *C. albicans*-stimulated IL-10 release from peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites.

Finally, we also studied the effect of specific inhibitors of MAPK and PI3K-Akt intracellular signaling routes on the LPS- and *C. albicans*-induced secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Fig.4.14 shows that the baseline secretion of IL-10 (112.3 pg/10⁶ cells) was only significantly inhibited in the presence of PI3K inhibitor by 90.3%. Consistent with our previous findings, we can also observe that the amount of IL-10 released by M-DM isolated from ascites of cirrhotic patients was significantly increased in response to LPS (16.0 fold), being higher the effect in response to *C. albicans* (28.2 fold activation). However, in this case, the PI3K, JNK and p38 inhibitors statistically decreased the amount of IL-10 induced by LPS (98.7%, 63.3% and 66.3% respectively) or *C. albicans* (99.2%, 53% and 69.2% respectively). It is important to remark that inhibition of PI3K almost completely suppressed the secretion of IL-10 under all the assayed conditions.

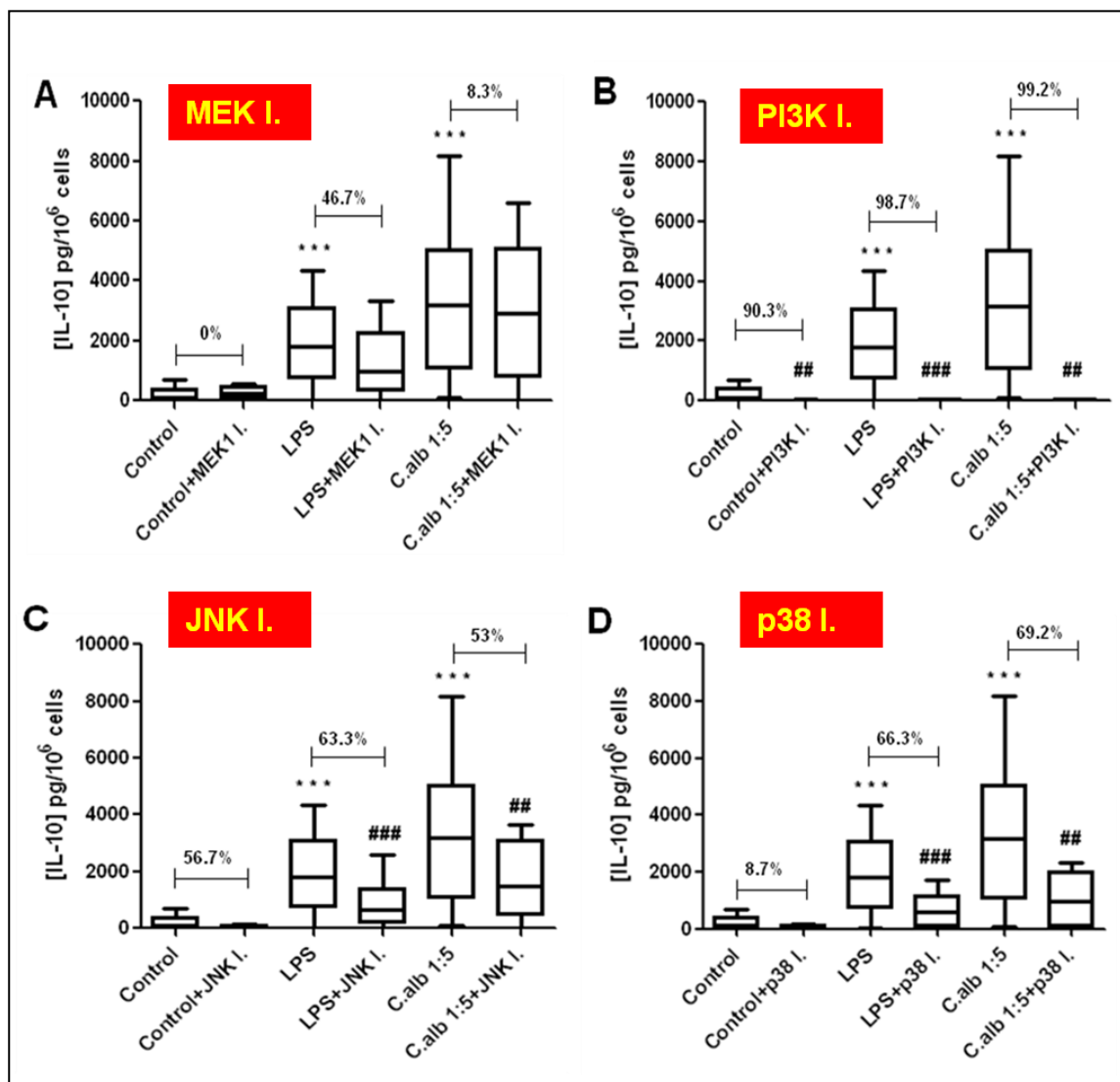


Fig. 4.14. Effect of cell signaling inhibitors on the IL-10 release from peritoneal M-DM. Peritoneal M-DM from patients with cirrhosis and ascites were isolated and the IL-10 concentration was measured by ELISA in 24 h cell culture supernatants at baseline or following treatment with *C. albicans*, or LPS with or without co-treatment with the signaling inhibitors for MEK1 (A), PI3K (B), JNK (C) and p38 MAPK (D). Results are expressed as pg IL-10/10⁶ cells and represented as box plot. Wilcoxon signed-rank test: *** p < 0.001 between control and LPS or *C. albicans* treatments; ## < 0.01, ### < 0.001 between absence and presence of signaling inhibitors for each condition (resulting % of inhibition are indicated over the boxes).

4.3.5. Discussion.

Macrophages play a crucial role in the pathogenesis of chronic liver diseases (Dasarathy, 2008, Ramachandran and Iredale, 2012, Heymann *et al.*, 2009). It is therefore of importance to investigate the regulation of inflammatory mediators produced by these immune cells in this clinical scenario. Pharmacological modulation

of pro- and anti-inflammatory immune response has a great interest as a therapeutic tool for many chronic diseases, such as rheumatoid arthritis, liver cirrhosis and chronic inflammatory bowel disease, among others. In this study, we extended our previous results on the role of several peritoneal M-DM intracellular signaling molecules involved in the regulation of inflammatory mediators in the AF of advanced stages of liver cirrhosis. We show here that the basal “alert” state of peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and non-infected ascites can be pharmacologically modulated by inhibiting some of the MAPK and PI3K-Akt intracellular intermediates. Thus, we examined the role of MEK1, JNK and p38 MAPK as well as PI3K-Akt pathways in the production of both pro-inflammatory, IL-6 and TNF- α and anti-inflammatory IL-10 cytokines in peritoneal M-DM isolated from the ascites of cirrhotic patients using specific inhibitors.

As agents eliciting cytokine secretion through interaction with PRRs we have selected the bacterial LPS, recognized by the complex TLR4/CD14/MD2, and heat killed *C. albicans*, whose polysaccharide structures are mainly, although not exclusively recognized by lectin receptors, either independently or in cooperation with TLR2 and 4 or other signaling receptors (Jouault *et al.*, 2009). We did not include in this study CpG-containing ODNs because we previously demonstrated (chapter 4.1) that they fail to significantly further induce the phosphorylation of the p38 MAPK, PKB-Akt, and c-Jun, in comparison with the LPS, which indicates that those ODNs transduce through different intracellular signaling pathways despite inducing the activation of p65 NF- κ B in both cases.

First of all, we found that the IL-6 baseline secretion was reduced in a similar way by the p38 MAPK, PI3K and JNK inhibitors, and in a lesser extent by the MEK1 inhibitor. Baseline release of TNF- α was more sensitive to inhibition of JNK and MEK1, while baseline secretion of IL-10 was only and strongly affected by inhibition of PI3K. These results demonstrate the different dependence on the intracellular signaling pathways regulating the expression of these three cytokines in peritoneal macrophages of cirrhotic ascites, and confirm the prominent role of PI3K-Akt pathway in the modulation of the IL-10 mediated anti-inflammatory function (Pengal *et al.*, 2006, Antoniv and Ivashkiv, 2011).

Next we show here that incubation of peritoneal M-DM in the presence of heat killed *C. albicans* at 1:5 cell: yeast ratio increased the release of IL-6 in a similar way

Resultados y Discusión

that LPS (4.3 and 4.9 fold, respectively), contrasting with the non significant effect of CpG ODNs on the IL-6 secretion described before. These results are consistent with others reported on different professional antigen-presenting cells, such as dendritic cells, on which different TLR-ligands induce differences in the expression of MAPK signaling pathways molecules (Dowling *et al.*, 2008). Nevertheless, we found a different dependence on the intracellular signaling pathways elicited by each microbial stimulus, since the LPS-induced IL-6 secretion was more sensitive to the MEK1 inhibitor, while the IL-6 secretion induced by *C. albicans* was more susceptible to the inhibition of PI3K. These results confirm first the role of MAPK, and especially the correlation between the IL-6 secretion and the ERK phosphorylation induced by LPS in M-DM from the ascites of cirrhotic patients described before. These results also point out toward a more critical role of the PI3K implication in IL-6 release in peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients when intracellular signals are triggered through lectin receptors alone or associated with others.

TNF- α is a potent inflammatory cytokine involved in acute and chronic inflammatory diseases, with a prominent role in the pathogenesis of liver fibrosis (Dasarathy, 2008). From our previous and present results we have detected high increases of TNF- α secreted by peritoneal M-DM stimulated by LPS, but herein we found that activation by heat killed *C. albicans* induced the highest significant increments of TNF- α . The secretion of TNF- α induced by LPS was not affected by the PI3K inhibitor but it was effectively reduced by MAPK inhibitors, although unlike IL-6, TNF- α was more efficiently decreased by the JNK and p38 inhibitors. Thus, the LPS-induced TNF- α secretion is highly dependent on the JNK and p38 MAPK mediated pathways at least in this particular clinical setting, while PI3K does not seem to play a prominent role on this process. Regarding the inhibition assays of *C. albicans*-induced secretion of TNF- α the results showed the involvement of both JNK and PI3K. In this regard, it is noteworthy to remark that the inhibition of MEK1 did not reduce, but increased, albeit non-significantly, the *C. albicans*-induced secretion of TNF- α . This suggests a null or even a negative regulatory role played by MEK1 in the signaling process through lectin receptors leading to TNF- α release in this clinical condition.

Finally, our previous results also revealed the existence of a counterbalanced response to LPS in peritoneal macrophages from ascites which is mediated by the secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in order to prevent an excessive type I

immune response. This assumption is supported by others studies showing that IL-10 gene KO mice secrete higher amounts of TNF- α than wild-type after the induction of liver injury (Louis *et al.*, 1998), or that higher colonic levels of TNF- α and IFN- γ are present in IL-10 KO mice than in wild-type after the induction of colitis (Arrieta *et al.*, 2009). Herein we show that the heat killed *C. albicans*-IL-10 induced secretion was higher than that induced by LPS, and both display an intermediate level between those of secreted IL-6 and TNF- α . The inhibition of MEK1 did not reduce the *C. albicans*-induced secretion of IL-10, which suggests again a null regulatory role played by MEK1 in the signaling process triggered by lectin receptors leading to IL-10 and TNF- α secretion in this clinical condition. The pharmacological inhibition of MAP Kinases and PI3K-Akt signaling routes on both LPS- and heat killed *C. albicans*-induced IL-10 secretion showed that inhibition of PI3K almost completely suppressed the secretion of IL-10 under all the assayed conditions. This confirms the prominent role of the PI3K-Akt pathway in the modulation of IL-10 mediated anti-inflammatory function.

In the second chapter of this report, we have described a different inflammatory profile in the ascites from cirrhosis depending on the alcoholic or hepatitis C viral etiology which is related with ERK phosphorylation. Herein, as the inhibitor of MEK-1 totally blocks the phosphorylation of ERK1/2, its effect on the IL-6 and TNF- α release was significant irrespective of the etiology of cirrhosis. Hence, under these experimental conditions, the stratification according etiology does not modify the overall findings of this work.

In conclusion, these results demonstrate that the release of IL-6 and TNF- α pro-inflammatory cytokines depends on MAPK signaling pathways and differ depending on the microbial stimulus in this clinical setting, and confirm the prominent role of PI3K-Akt pathway in the modulation of IL-10 mediated anti-inflammatory function in peritoneal M-DM isolated from the ascites of cirrhotic patients. This will contribute to better understand the mechanisms underlying the pathogenesis of liver damage leading to decompensated cirrhosis and points out to the MAPK inhibitors as potential targets for the development of novel anti-inflammatory therapeutics to prevent hepatic damage.

CHAPTER 4.4

Regulatory role of MAPK and PI3K-Akt pathways on the IL-1 β release in peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients.

Following the results obtained in chapter 3, now, we focus our study in the role of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in peritoneal M-DM obtained from patients with cirrhosis and ascites.

IL-1 β is an important pleiotropic cytokine with immune and pro-inflammatory activities. Its potent pro-inflammatory role is mediated by induction of additional mediators, including IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, COX(cyclooxygenase)-2 and PGE2 (prostaglandin E2). Its autocrine properties allow that even small localized IL-1 β concentrations could induce potent biological functions (Dinarello, 2009). Hence, processing and secretion of biological active IL-1 β is tightly regulated at several levels. Infectious and inflammatory mediators induce NF- κ B-dependent transcription of the *IL1 β* gene. *IL-1 β* is further regulated at the level of RNA stability and translational control, encodes a proprotein formed by 269 aminoacides, and requires posttranslational proteolytic cleavage to acquire its active properties. Activation of CASP1 by inflammasome assembling plays a critical role in this process, although it also exists a CASP1 non-dependent mechanism for IL-1 β processing (Dinarello, 2009). *CASP1* encodes an inactive proenzyme which undergo proteolytic processing at conserved aspartic residues to produce 2 subunits, large and small, that dimerize to form the active enzyme.

Assembly of this multi-protein complex is triggered by a wide range of structurally diverse DAMPs or PAMPs stimuli, and the signaling pathways involved on it, as well as its cross-talk with others intracellular signaling routes triggered by membrane PRRs, such as the MAPKs and PI3K-Akt are poorly understood (Latz *et al.*, 2013). Related to liver cirrhosis, in a mouse model of ALD, IL-1 β signaling was required for the development of inflammation and injury. The increased IL-1 β was caused by upregulation of CASP1 activity and inflammasome activation (Petrasek *et al.*, 2012). This group also found that IL-1 β increased the hepatotoxic effect of TNF- α . Furthermore, during experimental liver fibrosis IL-1 levels were elevated, and the progression of liver fibrosis was lower in IL-1R deficient mice. Additionally, it was

found that the expression of metalloproteinases, MM9 and MMP13, and tissue inhibitor metalloprotease (TIMP), regulators of fibrosis, is dependent on IL-1 β (Gieling *et al.*, 2009). However, the specific role of CASP1 vs other caspases or proteases in liver fibrosis remains to be fully understood (Szabo and Csak, 2012).

In this study we have explored the relative importance of ERK1/2, JNK and p38 MAPK and PI3K pathways on the expression and release of the inflammatory IL-1 β cytokine in M-DM obtained from the ascites of cirrhotic patients, trying to gain further insights into the pathogenesis of liver cirrhosis that could lead to identify novel targets for pharmaceutical intervention to prevent hepatic damage. For this aim, we have examined the effects of several MAPK and PI3K-Akt inhibitors on baseline and LPS- and *C. albicans*-stimulated secretion of IL-1 β in M-DM from the ascites of cirrhotic patients. A fuller understanding of the molecular mechanisms of macrophage activation in this pathologic scenario is clearly desirable in delineating therapeutic target molecules to reduce the inflammatory response associated to liver failure.

4.4.1. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed *C. albicans*-stimulated IL-1 β release from M-DM of cirrhotic patients.

We have described in the previous chapter that secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in peritoneal M-DM from cirrhotic patients strongly depends on the MAPK signaling pathways. IL-1 β is a potent inflammatory cytokine involved in acute and chronic inflammatory diseases. Herein, we further explored the effect of specific MAPK and PI3K inhibitors on both the IL-1 β baseline secretion and the LPS- and heat killed *C. albicans*- stimulated IL-1 β release from peritoneal M-DM from cirrhotic patients. The clinical and analytical characteristics of patients included in this study are shown in Table 4.VI.

Table 4.VI. Clinical and analytical characteristics of patients included in the study.

Variable	Patients with cirrhosis and culture-negative ascites (n = 48)
Etiology (n)	ALC (33), HCV (15)
Age	57.5 (15.7)
Male sex n (%)	46 (95.8)
Previous episodes of ascites n (%)	41 (85.4)
Child-Pugh mean score	9 (3)
Meld mean score	15 (5.7)
Bilirubin (mg/dL)	2.07 (2)
Albumin (g/dL)	2.9 (0.6)
Quick (%)	58.5 (21.7)
Serum creatinine (mg/dL)	1.05 (0.8)
Serum sodium (mEq/L)	133 (7)
INR	1.55 (0.3)
Blood WBC/mm ³	3970 (2500)
Ascites WBC/mm ³	90 (127)
Ascites Total protein (g/dL)	1.7 (1.3)
<i>Continuous variables are expressed as median (IQR) and categorical variables as percentage.</i>	

Previously, in chapter 4.2, we have shown no significant differences in basal, LPS- or *C. albicans*-stimulated IL-1 β secretion respect to the cirrhotic etiology, justifying its treatment as a homogeneous group of work. As can be observed in Fig. 4.15, the baseline secretion of IL-1 β was significantly decreased in the presence of JNK and MEK1 inhibitors, 95.1% and 66.7% inhibition from untreated controls respectively (Fig. 4.15 A and B), whereas p38 MAPK and PI3K inhibitors had no significant effect (Fig. 4.15 C and D).

As expected, LPS induced a significant increase of the secreted IL-1 β , that was statistically decreased by the JNK and the MEK1 inhibitors 64.6% and 80.4% inhibition respectively (Fig. 4.15 A and B), while inhibition of p38 MAPK phosphorylation did not affect the LPS-induced IL-1 β secretion (Fig. 4.15 C). Strikingly, inhibition of PI3K turns out to favour the LPS-induced secretion of IL-1 β , reaching to 6.9 fold activation levels (Fig. 4.15 D).

Stimulation of peritoneal M-DM with heat killed *C. albicans* induced a strong increase on the secretion of IL-1 β , which was only statistically inhibited in the presence of the JNK inhibitor (87% inhibition) and the MEK1 inhibitor (71.4% inhibition) (Fig.

Resultados y Discusión

4.15 A and B). Of note, the inhibition of PI3K significantly increases 2.3 folds the *C. albicans*-induced secretion of IL-1 β (Fig. 4.15 D).

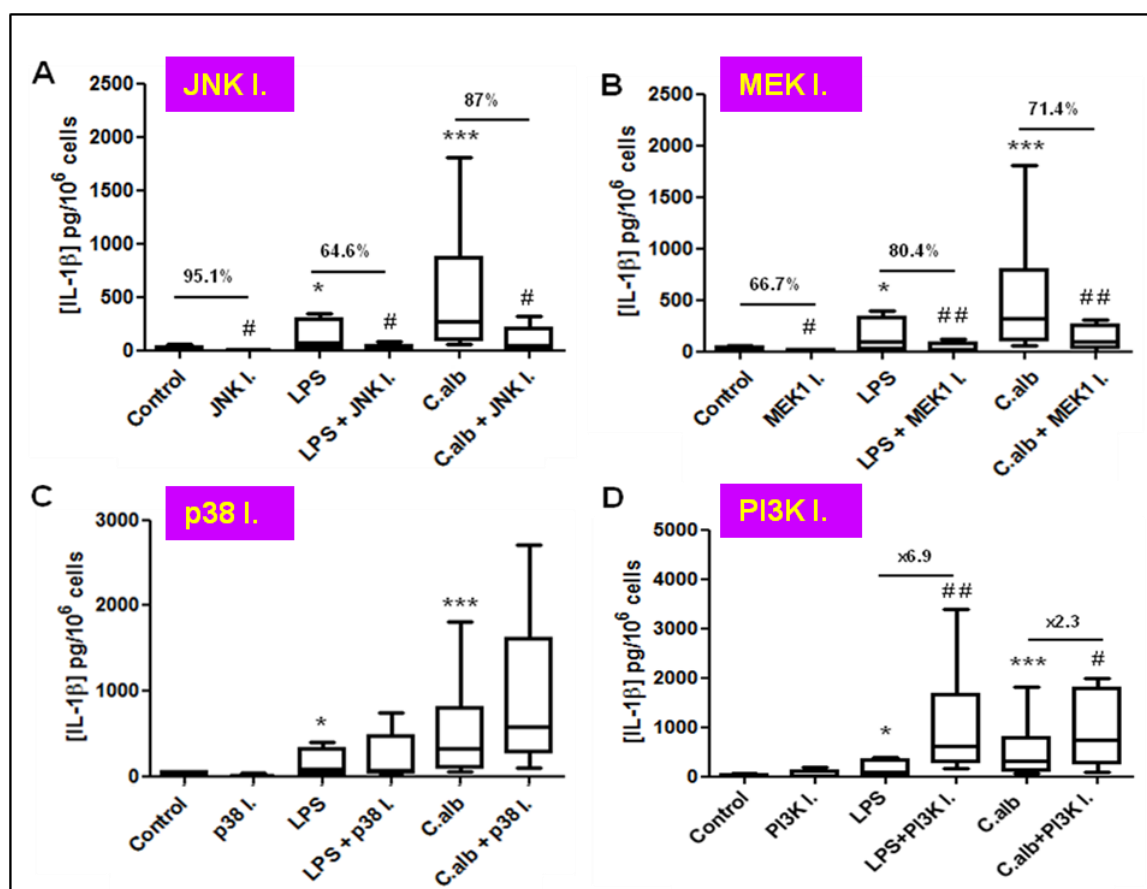


Fig. 4.15. Effect of cell signaling inhibitors on the IL-1 β release in M-DM from ascites. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites (n=17) and the IL-1 β concentration was measured by ELISA in 24 h cell culture supernatants at baseline or following treatment with *C. albicans*, or LPS with or without co-treatment with the signaling inhibitors for JNK (A), MEK1 (B), p38 MAPK (C) and PI3K (D). Results are expressed as pg IL-1 β /10⁶ cells and represented as box plot. Wilcoxon signed-rank test: * p< 0.05, *** p< 0.001 between control and LPS or *C. albicans* treatments; # p< 0.05, ## p< 0.01, between absence and presence of signaling inhibitors (I.) for each condition (resulting % of inhibition or fold activation are indicated over the boxes).

Viability assessed by MTT method in M-DM treated with the signaling inhibitors did not vary significantly from untreated controls after 24 h in culture (Fig. 4.16).

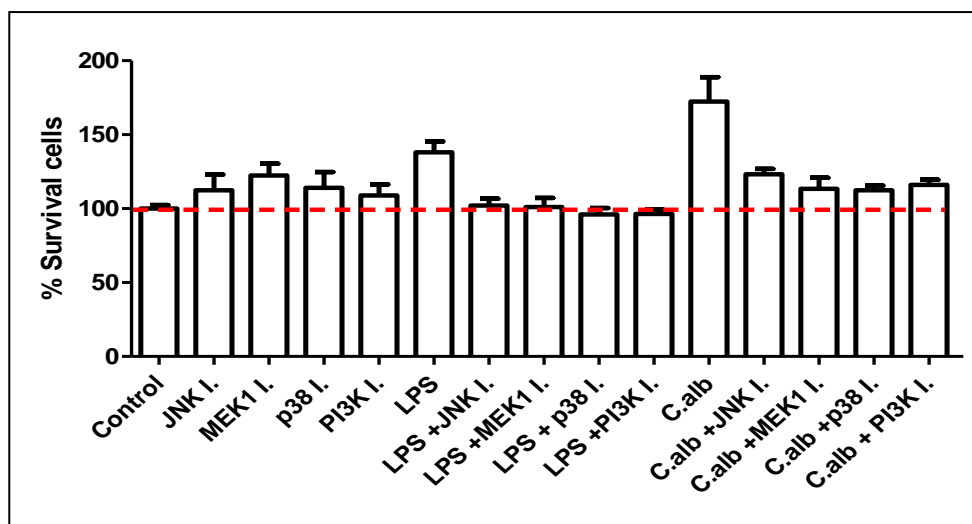


Fig. 4.16. Representative MTT assay of M-DM from patients with cirrhosis and ascites at baseline or after treatment with LPS or *C. albicans* for 24 h, with or without co-treatment with the signaling inhibitors. Assay was done by triplicate. Discontinuous red line indicates the survival percentage at basal level.

4.4.2. Effect of MAPK and PI3K inhibitors on the LPS- and heat killed *C. albicans*-stimulated IL-1 β release from M-DM of healthy donors.

To discern whether this phenomenon was specific of cirrhotic peritoneal M-DM or if this could be extensively applied to other non pathologic-related M-DM, we also analyzed the effect of the inhibitors of MAPKs and PI3K signaling pathways on the IL-1 β release from M-DM obtained from the blood of healthy donors (n=13).

According to the intracellular signaling, both cell populations had a similar behavior (Fig. 4.17) with the exception of the significant reduction of IL-1 β basal levels recorded in presence of the JNK and MEK1 inhibitors in M-DM from ascites vs M-DM from the blood of healthy donors (Fig. 4.15 A and B vs 4.17 A and B).

Also, inhibition of PI3K enhanced the release of IL-1 β in both M-DM populations, demonstrating that the regulatory role of PI3K in the secretion of IL-1 β is not exclusive of peritoneal M-DM from cirrhotic patients. Nevertheless, while the increases of secretion of IL-1 β in the presence of Ly294002 from M-DM of cirrhotic ascites was only statistically significant in LPS- and *C. albicans*-stimulated cells, those obtained from M-DM from the blood of healthy donors were only significant on the basal levels (4.1 fold activation) and not after LPS-stimulation. In fact, stimulation with *C. albicans* in the presence of Ly294002 induced a non significant decrease of IL- β secretion in this cell population.

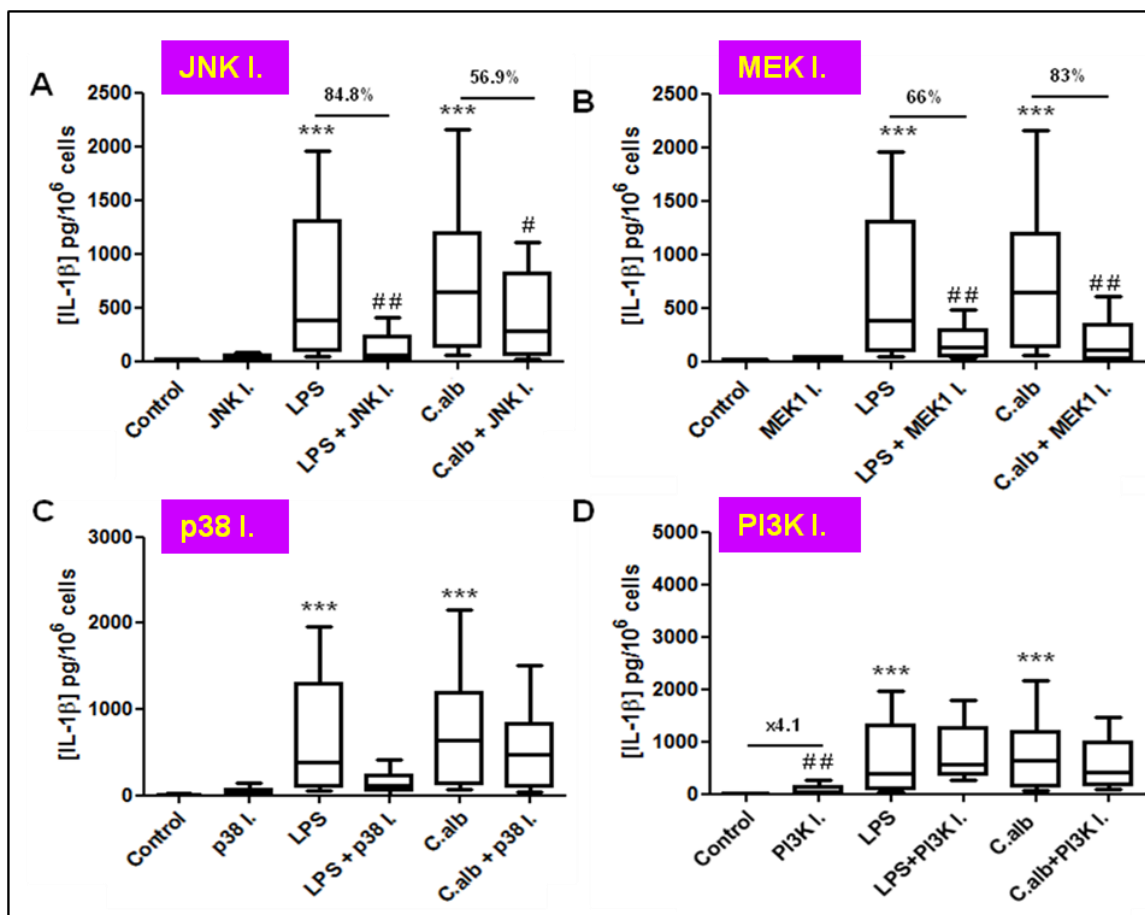


Fig. 4.17. Effect of cell signaling inhibitors on the IL-1 β release in M-DM from the blood of healthy controls. M-DM were isolated from the blood of healthy donors (n=13) and the IL-1 β concentration was measured by ELISA in 24 h cell culture supernatants at baseline or following treatment with *C. albicans*, or LPS with or without co-treatment with the signaling inhibitors for JNK (A), MEK1 (B), p38 MAPK (C) and PI3K (D). Results are expressed as pg IL-1 β /10⁶ cells and represented as box plot. Wilcoxon signed-rank test: *** p< 0.001 between control and LPS or *C. albicans* treatments; # p< 0.05, ## p< 0.01, between absence and presence of signaling inhibitors (I.) for each condition (resulting % of inhibition or fold activation are indicated over the boxes).

We compared the IL-1 β levels of ascitic M-DM from cirrhotic patients with those of M-DM from the blood of healthy donors, in a larger population of ascitic M-DM (n=42) and blood M-DM (n=20), with similar results than those obtained in the samples represented in figures 4.15 and 4.17. We found that both M-DM populations produce similar basal levels of IL-1 β (18.2 vs 11.9 pg/10⁶ cells, peritoneal vs blood M-DM respectively) and respond efficiently to LPS- or *C. albicans*-stimulation, although the response of peritoneal M-DM from cirrhotic ascites was significantly lower than that achieved by blood M-DM (6 vs 12.5 fold activation in response to LPS treatment and 6.7 vs 40.2 fold activation for *C. albicans* stimulation, respectively).

4.4.3. Activation level of cell signaling molecules in response to LPS and *C. albicans* in M-DM from patients with cirrhosis and healthy donors.

Next, we analyzed by Western blot the activation state of key molecules of the intracellular signaling pathways targeted by the inhibitors used above in order to correlate with the differences found in their effects on IL-1 β secretion between M-DM from ascites of cirrhotic patients and those obtained from the blood of healthy donors.

Related to this, we have described in chapter 4.1, that peritoneal macrophages from ascites of cirrhotic patients display a significantly higher baseline activation level of the cell signaling kinases ERK 1/2, PKB-Akt and the transcriptional factor c-Jun than those observed in M-DM obtained from the blood of healthy controls. In contrast, p38 MAPK and, in a more extended way p65 NF- κ B, show a lower pattern of baseline phosphorylation in ascites M-DM. Furthermore, we have described the modulation of these signaling molecules in response to LPS and heat killed *C. albicans* stimulation in M-DM obtained from the ascites of cirrhotic patients.

Comparative analysis of the activation state of these intracellular key signaling molecules between both M-DM populations is shown in Fig. 4.18. A representative immunoblot for phosphorylated PKB, phosphorylated c-Jun, phosphorylated ERK 1/2 and phosphorylated p38 MAPK from cell extracts of peritoneal ascites and blood M-DM at baseline or following treatment with either LPS or heat killed *C.albicans* is shown in Fig. 4.18 A. Baseline activation levels of PKB (Fig. 4.18 B), c-Jun (Fig. 4.18 C) and ERK 1/2 (Fig. 4.18 D) were, as expected, higher in M-DM from ascites of cirrhotic patients. On the contrary, baseline phosphorylation level of p38 MAPK was markedly higher in blood derived M-DM (Fig. 4.18 E). LPS treatment further increased the phosphorylation level of all the molecules under study in peritoneal M-DM from ascites, while in the case of M-DM from blood only the phosphorylation of ERK 1/2 and p38 MAPK (Fig. 4.18 D and 4.18 E), but not PKB or c-Jun (Fig. 4.18 B and 4.18 C), reached a significant elevation over baseline. When comparing the two groups of M-DM, significant differences on the phosphorylation level of all the molecules following LPS treatment were observed, meaning higher LPS-stimulated levels of phosphorylated PKB (Fig. 4.18 B), c-Jun (Fig. 4.18 C) and ERK 1/2 (Fig. 4.18 D) and lower LPS-stimulated phosphorylation of p38 MAPK (Fig. 4.18 E) in M-DM from ascites compared to M-DM from healthy controls blood.

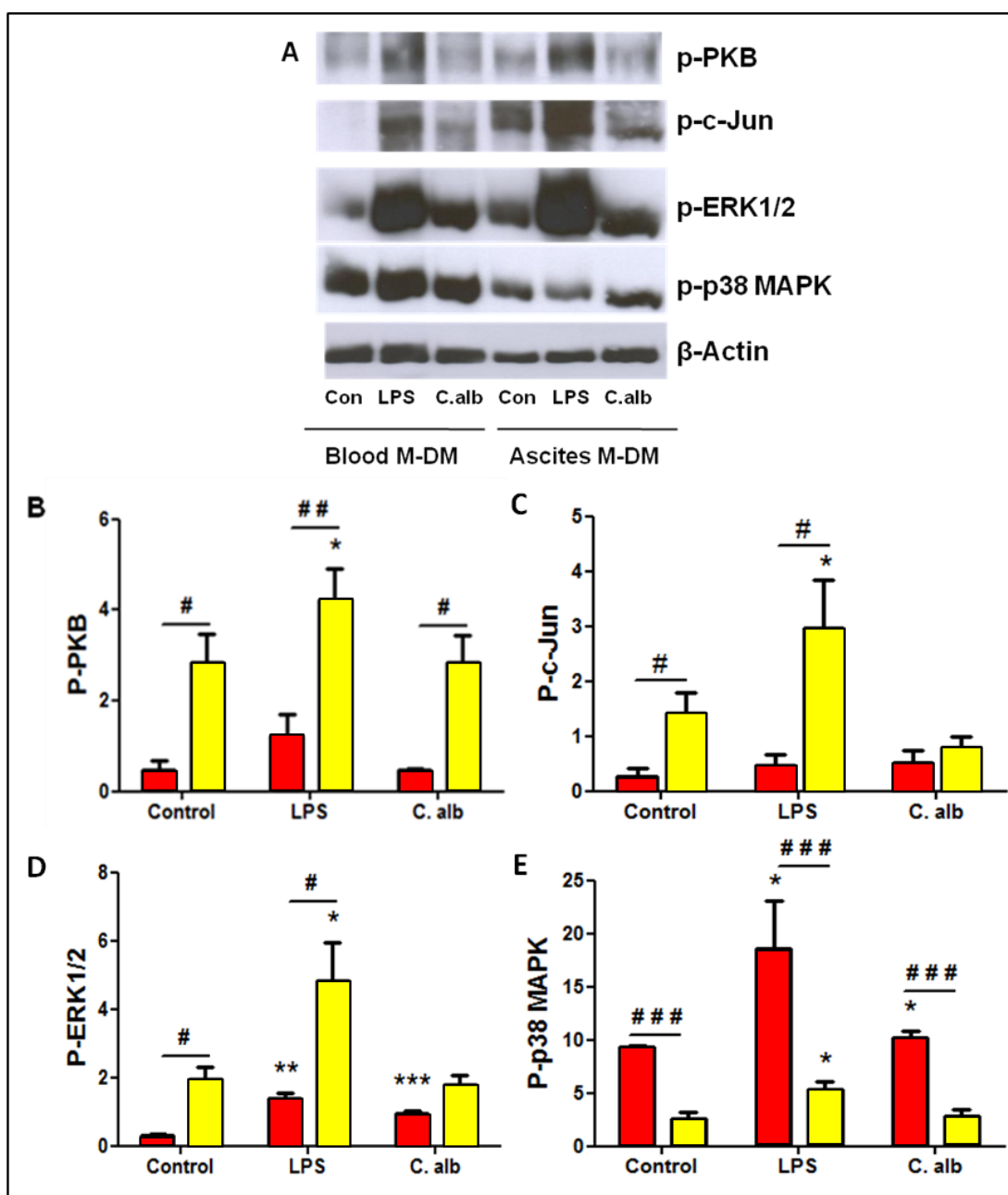


Fig. 4.18. Activation of cell signaling molecules by LPS and *C. albicans* in ascites vs controls M-DM. Representative immunoblots for phosphorylated PKB, c-Jun, ERK1/2, p38 MAPK and β -actin as loading control, from cell extracts of peritoneal or blood M-DM at baseline or following treatment with LPS or *C. albicans*. (A). Immunoblots were quantified and the average \pm SEM ratios are represented as histograms of PKB (B), c-Jun (C), ERK 1/2 (D) and p38 MAPK phosphorylation (E), and referred to basal level of activation of blood M-DM. Statistical significance was analyzed by the Wilcoxon signed-rank test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, between control and LPS or *C. albicans* treatments; and Mann Whitney U test: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ between blood (red bars, $n=5$) and ascites M-DM (yellow bars, $n=10$).

C. albicans had no effect upon the baseline activation state of any of the molecules analysed in M-DM from ascites of cirrhotic patients. On the other hand, in M-DM from blood, and similarly to what happened with LPS, *C. albicans* showed no effect on activation levels of PKB nor c-Jun (Fig. 4.18 B and 4.18 C), but was able to slightly but significantly elevate ERK 1/2 and p38 MAPK phosphorylation (Fig. 4.18 D and 4.18 E). When comparing between M-DM groups the activation state of the molecules following *C. albicans* treatment, significantly differences were only observed on PKB and p38 MAPK, being higher the phosphorylation level of PKB (Fig. 4.18 B) and lower the phosphorylation level of p38 MAPK (Fig. 4.18 E) in M-DM from ascites.

4.4.4. Effect of PI3K inhibition on *IL1 β* gene and protein expression in M-DM from cirrhotic patients and healthy donors.

To explore whether the observed increments of secreted IL-1 β induced by PI3K inhibition were mediated by an increase in the *IL1 β* gene expression, we analyzed by qRT-PCR the basal, LPS- and heat killed *C. albicans*-stimulated *IL1 β* mRNA expression in the presence or absence of the PI3K inhibitor, Ly294002.

The baseline levels of *IL1 β* mRNA expression analyzed by qRT-PCR, does not differ significantly between M-DM from ascites of cirrhotic patients or blood of healthy donors (Fig. 4.19), which is consistent with the similar secreted IL-1 β protein levels described before in both M-DM populations. However, the results point out toward a tendency to a higher mRNA expression level in ascitic M-DM, where the variability is also higher.

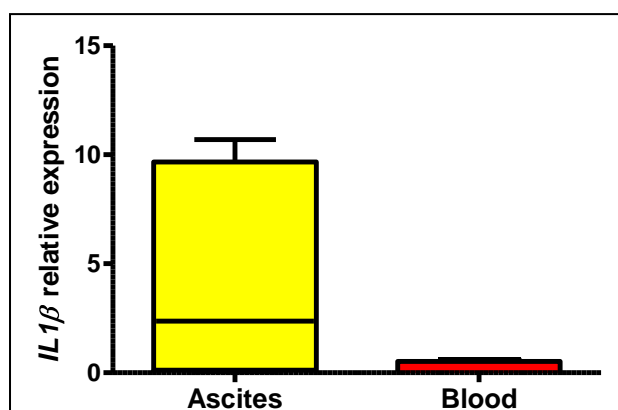


Fig. 4.19. Basal *IL1 β* gene expression levels in ascites vs healthy donors blood M-DM. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites (n=3) or from the blood of healthy donors (n=6). The *IL1 β* gene expression was evaluated by qRT-PCR normalized to *GAPDH* expression and referred to ascites at basal levels.

Resultados y Discusión

As expected, LPS- and *C. albicans*-stimulation significantly increased the expression of *IL1 β* mRNA in M-DM from ascites and blood of healthy donors (Fig. 4.20). Inhibition of PI3K induced a non-significant increase of baseline *IL1 β* mRNA expression in both cell populations, while the corresponding results on LPS- and *C. albicans*-induced *IL1 β* mRNA expression were variable. While the PI3K inhibitor induces a non significant increase on LPS-induced and a decrease statistically significant on *C. albicans*-induced *IL1 β* gene expression in M-DM from ascites, in M-DM from blood of healthy donors, the PI3K inhibitor reduces the *IL1 β* mRNA expression induced by both stimuli, but this effect was only statistically significant on LPS stimulation.

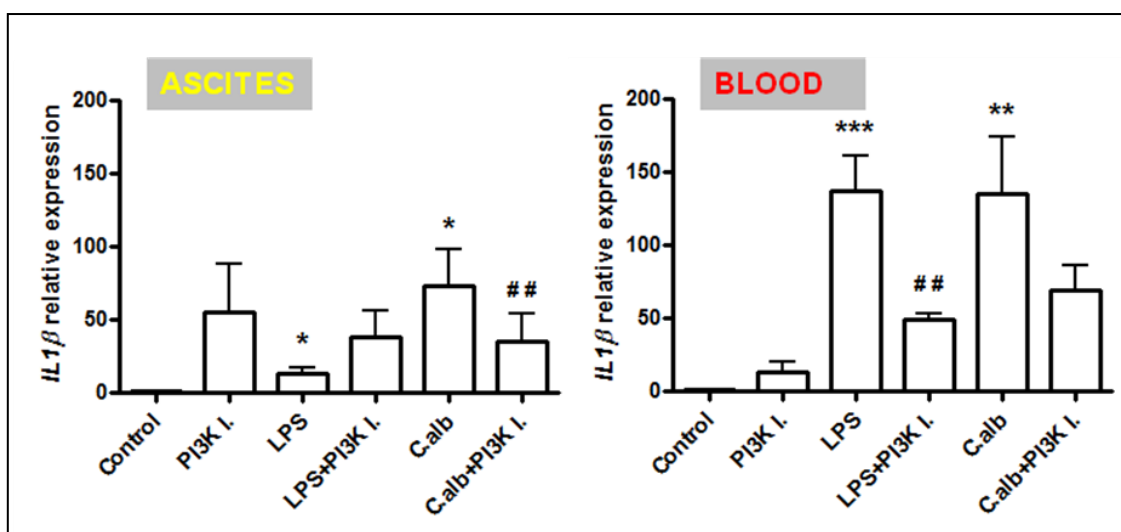


Fig. 4.20. Modulation of *IL1 β* expression in response to LPS and *C. albicans* and PI3K inhibitor in M-DM from ascites vs healthy donors. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites (n=3) or from the blood of healthy donors (n=6) and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans* in the presence or absence of the PI3K inhibitor Ly294002. The *IL1 β* gene expression was evaluated by qRT-PCR normalized to *GAPDH* expression and referred to their basal levels. Results are expressed as histograms showing the mean \pm SEM. Wilcoxon signed-rank test: *p<0.05; ** p< 0.01, ***p<0.001, between control and LPS or *C. albicans* treatments; # p< 0.05, ## p< 0.01, between absence or presence of the PI3K inhibitor (I).

These results suggest that the effect of PI3K-Akt pathway inhibition on *IL1 β* gene expression does not suffice to explain the increments in the IL-1 β secreted protein detected by ELISA described above (Fig.4.15 and 4.17). As this technique detects mainly the mature form of IL-1 β protein secreted to the medium, we decided to analyse by Western blot the total production of the protein, both mature and immature forms of IL-1 β , in M-DM. The results shown in Figure 4.21 reveal that ascitic M-DM express

higher levels of intracellular IL-1 β than blood M-DM, which is consistent with the non significant tendency to a higher mRNA expression levels in ascitic M-DM described before (Fig. 4.19). Fig. 4.21 also showed that the intracellular content of protein was increased noticeably in response to LPS and *C. albicans* treatment, and this induction was partially reduced by the PI3K inhibitor.

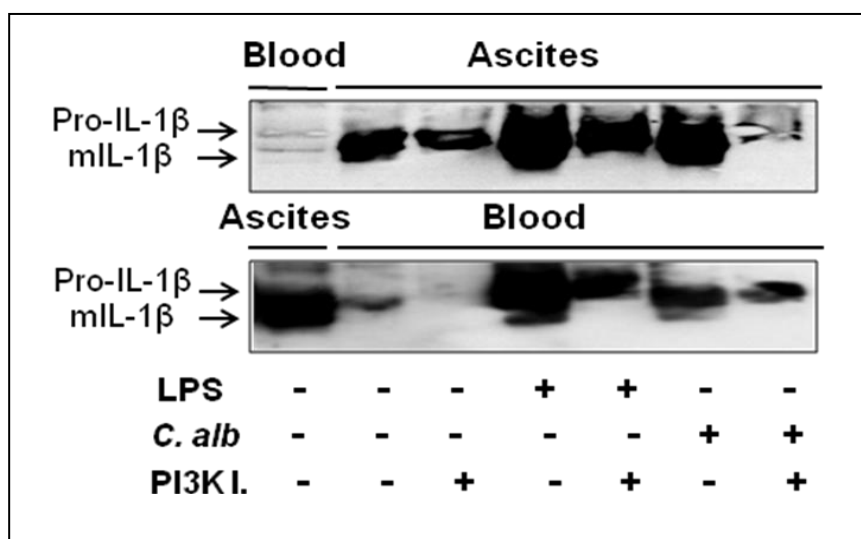


Fig. 4.21. IL-1 β protein expression in M-DM extracts from ascites vs healthy donors. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites or from the blood of healthy donors and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans* in the presence or absence of the PI3K inhibitor (I.). Ly294002. A representative Western blot of intracellular protein content of ascites and blood M-DM, indicating the expression of precursor and mature forms of IL-1 β is shown.

These data are in agreement with the *IL1 β* gene expression results but not with those obtained when measured the secreted IL-1 β in M-DM culture supernatants by ELISA. To clarify this discrepancy the content of IL-1 β , both mature and pro-IL-1 β , was analysed by Western blot in culture supernatants of ascites M-DM, finding that the extracellular levels of IL-1 β correlates with the ELISA measurements (Fig. 4.22), and demonstrating that whereas the stimulation with LPS or *C. albicans* induces an increment in the total content of the protein which is accumulated mainly inside the cell, the PI3K inhibition induces the secretion of both mature and immature forms of IL-1 β .

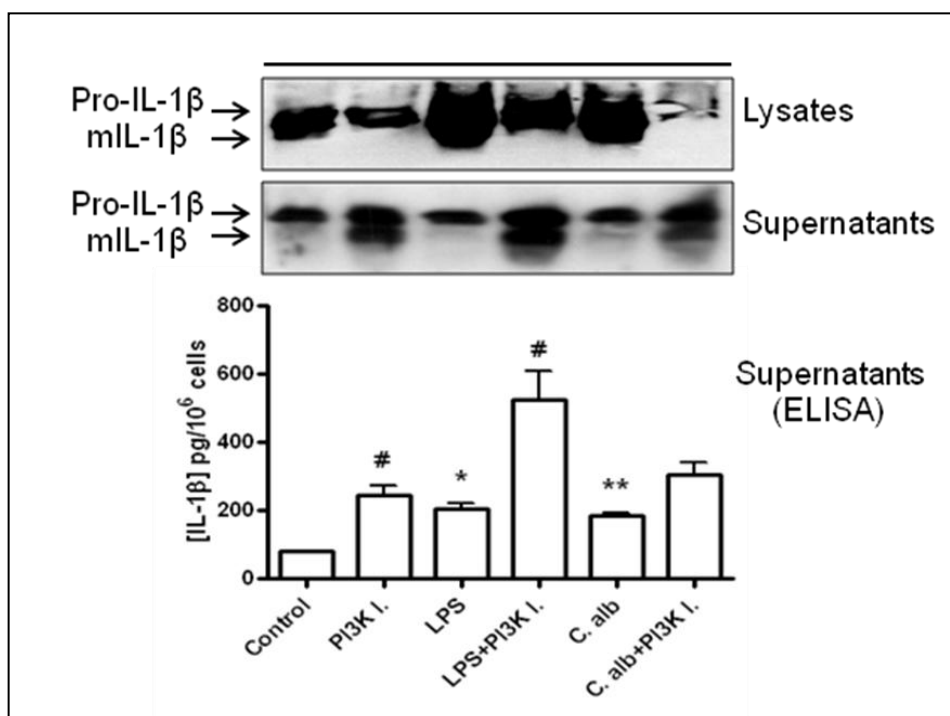


Fig. 4.22. Correlation of IL-1 β protein expression in M-DM obtained from ascites analysed by Western blot in extracts and supernatants of the cells and by ELISA. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans* in the presence or absence of the PI3K inhibitor (I). Ly294002. A representative Western blot of lysates and cell culture supernatants, and the ELISA quantification of the supernatant of ascites M-DM is shown. Wilcoxon signed-rank test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, between control and LPS or *C. albicans* treatments; # $p < 0.05$, between absence or presence of the PI3K I.

4.4.5. Role of CASP1 on the release of IL-1 β in M-DM from patients with cirrhosis.

Next, we planned to explore the role of CASP1 on the increments of secreted IL-1 β induced by LPS and *C. albicans* stimulation. Western blot analysis of both pro-CASP1 and mature CASP1 cellular content in M-DM obtained from blood of healthy donors or ascites of cirrhotic patients (Fig. 4.23), revealed both LPS and *C. albicans* induces an increment of both protein forms, being the effect stronger in blood M-DM, where the basal levels were also higher than those for ascites M-DM.

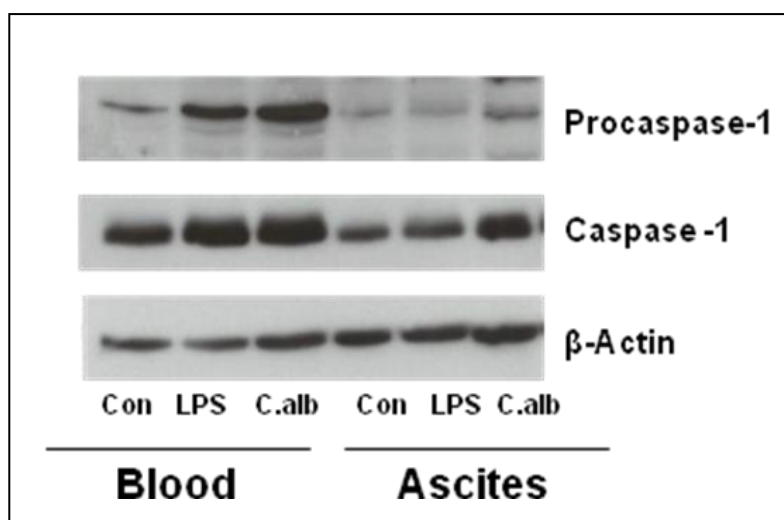


Fig 4.23. Pro- and CASP1 expression in M-DM from ascites vs healthy donors' blood. M-DM were isolated from the blood of healthy donors or from patients with cirrhosis and ascites and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans*. A representative Western blot of intracellular protein content of ascites and blood M-DM, indicating the expression of precursor and mature form of CASP-1 is shown. β -actin was used as loading control.

Incubation of ascites M-DM with the specific CASP1 inhibitor YVAD (Fig.4.24) completely blocked the basal and LPS-induced release of IL-1 β , whereas not a complete blockage could be registered for that induced by *C. albicans*, indicating the participation of both CASP1 dependent and independent mechanisms in the response to *C. albicans*.

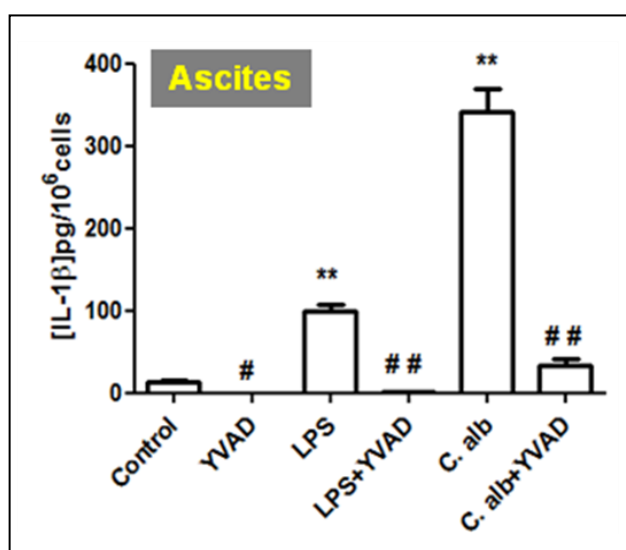


Fig. 4.24. Effect of CASP1 in the IL-1 β release from ascites M-DM. M-DM were isolated from ascites of patients with cirrhosis and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans* in the presence or absence of the CASP1 inhibitor YVAD. IL-1 β was measure in supernatans and analysed by ELISA. Wilcoxon signed-rank test: ** $p < 0.01$ between control and LPS or *C. albicans* treatments; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ between absence or presence of the CASP1 inhibitor (YVAD).

Resultados y Discusión

Viability assessed by MTT method in M-DM treated with the CASP1 inhibitor or/and the PI3K inhibitor did not vary significantly from untreated controls after 24 h in culture at baseline or after stimulation with LPS or *C. albicans* (Fig 4.25).

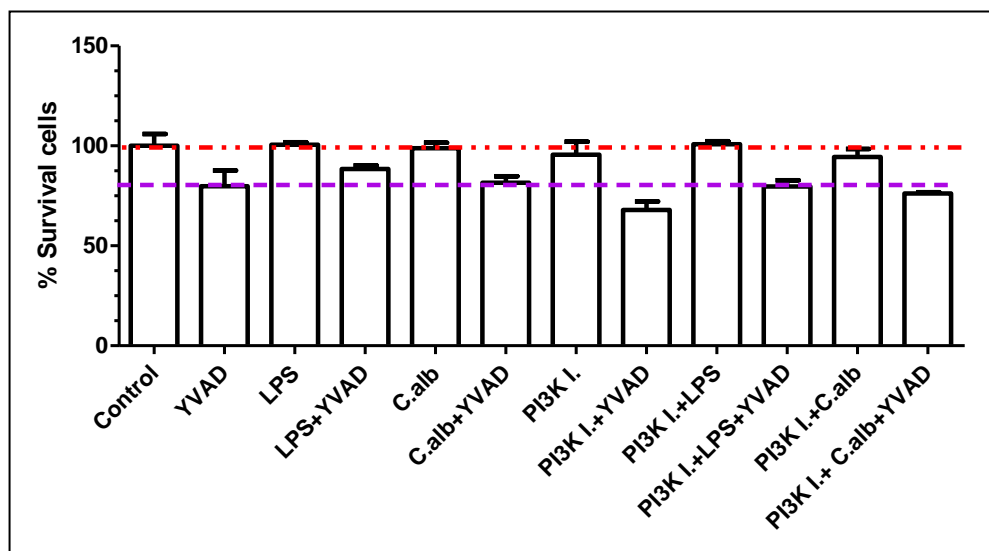


Fig. 4.25. Representative MTT assay of M-DM from patients with cirrhosis and ascites at baseline or following 24 h treatment with LPS or *C. albicans*, with or without co-treatment with the YVAD and/or PI3K inhibitor (PI3K I). Assay was done by triplicate. Discontinuous red line indicates the survival percentage at basal level and discontinuous violet line the survival percentage after basal YVAD treatment.

Furthermore, we explored the role of PI3K inhibition on the basal and LPS- or *C. albicans*-induced expression of *CASP1*. With this purpose, we analysed the *CASP1* mRNA and its protein expression levels in the presence of the PI3K inhibitor, Ly294002. The results showed in Fig. 4.26 demonstrated that peritoneal M-DM from cirrhotic patients exhibited significant lower *CASP1* gene expression levels than M-DM from healthy donors, which correlated with the protein expression levels shown in Fig 4.23.

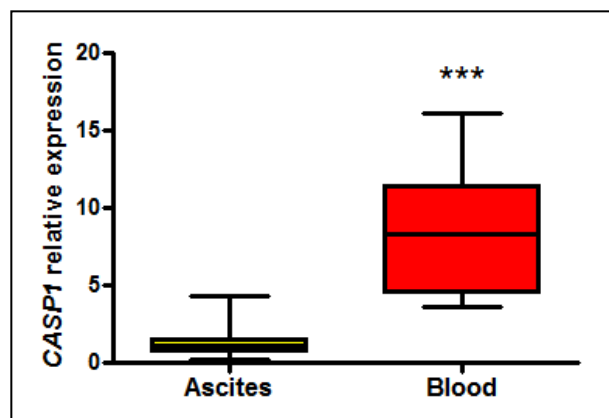


Fig. 4.26. *CASP1* expression at baseline in M-DM from ascites vs healthy donors. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites (n=10) or from the blood of healthy donors (n=6). The *CASP1* gene expression was evaluated by qRT-PCR normalized to *GAPDH* expression and referred to ascites at basal level. Mann-Whitney U test *** p<0.001.

As expected, LPS stimulation significantly increased the expression of *CASP1* mRNA in both cell groups (Fig.4.27). In contrast, the *CASP1* gene expression did not vary in response to *C. albicans* stimulation in both M-DM types, although the protein levels increased after this treatment (Fig.4.27, Fig 4.23). A faster modulation and recover to basal levels of *CASP1* gene expression in response to *C. albicans* were discarded after analysis at shorter incubation times: 4 and 6 h (data not shown). Inhibition of PI3K induced a significant reduction of *CASP1* mRNA in LPS stimulated M-DM of both populations and on blood M-DM basal levels, being the reduction non-significant in the rest of the cases (Fig.4.27).

The results obtained when we analyzed by Western blot the pro-CASP1 and active CASP1 protein levels in cell lysates of ascites M-DM (Fig. 4.28) showed that inhibition of PI3K had no effect at basal levels, while it noticeably reduces the expression of both proteins on LPS-stimulated M-DM. These data correlate with the *CASP1* mRNA expression levels (Fig. 4.27). In turn, the inhibitor of PI3K increased the intracellular levels of CASP1 on *C. albicans*-stimulated M-DM, mainly the amount of active CASP1, while the *CASP1* mRNA expression levels did not vary significantly (Fig. 4.27). These results suggest the existence of posttranslational mechanisms induced by *C. albicans* to synthesize active CASP1. Western blot of ascites M-DM cell culture supernatants reveal that CASP1 is also secreted by these cells, and that the PI3K inhibitor enhanced this release, alike to what happened with the IL-1 β .

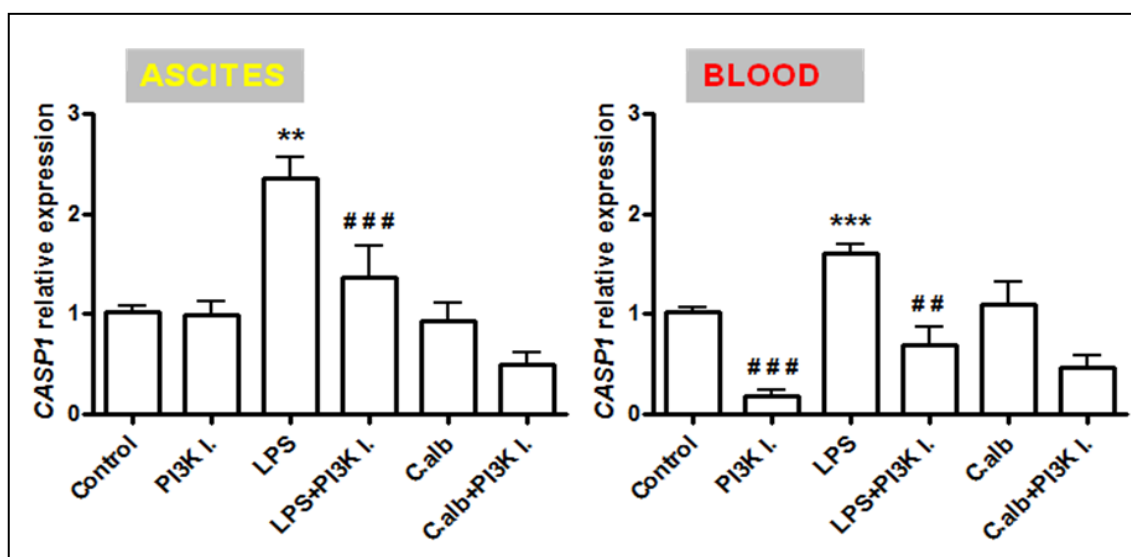


Fig. 4.27. Effect of PI3K inhibitor on basal and stimulated *CASP1* expression in ascites vs healthy M-DM. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites or from the blood of healthy donors and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans* in the presence or absence of the PI3K inhibitor. The *CASP1* gene expression was evaluated by qRT-PCR normalized to *GAPDH* expression and referred to their basal levels. The *CASP1* gene expression response to the treatments was studied in M-DM obtained from ascites (n=4) or healthy donors's blood (n=6). Wilcoxon signed-rank test: ** p< 0.01, *** p< 0.001 between control and LPS or *C. albicans* treatments; ## p< 0.01, ### p< 0.001 between absence or presence of the PI3K inhibitor.

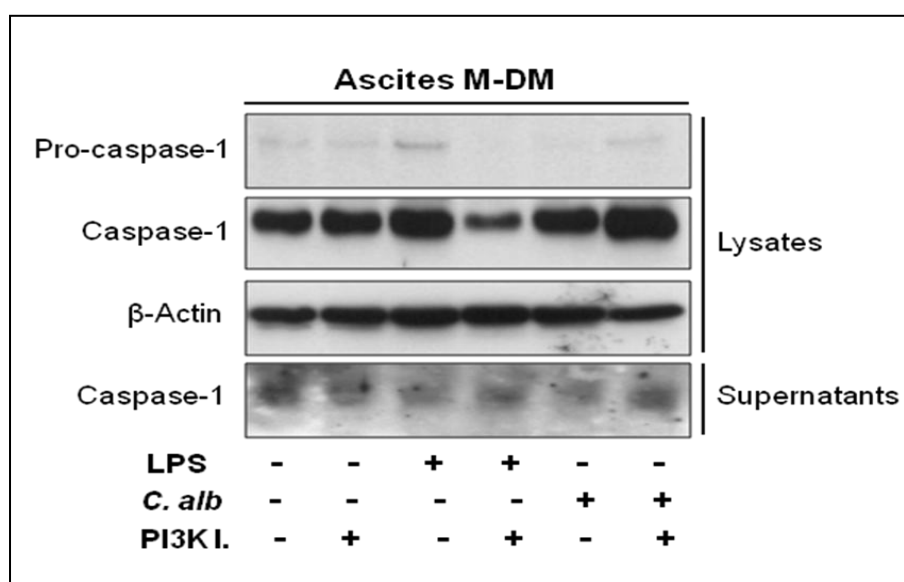


Fig 4.28. Pro- and CASP1 expression in ascites M-DM. A representative Western blot of cell lysates and cell culture supernatants of ascites M-DM, indicating the expression of precursor and mature form of CASP1 is shown. β -actin was used as loading control. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans*. in the presence or absence of the PI3K inhibitor, Ly294002.

4.4.6. Discussion.

Liver cirrhosis is a disease difficult to treat with a high morbidity and mortality rate (Chen *et al.*, 2007). The search to identify novel targets for the rational development of drugs able to modulate the balance of pro- and anti-inflammatory immune response has a great interest to provide therapeutic tools for many chronic diseases, including rheumatoid arthritis, chronic inflammatory bowel disease and liver cirrhosis, among others (Alessandri *et al.*, 2013). In this respect, among the 11 members of the IL-1 family, IL-1 β is considered as a therapeutic target for a growing number of systemic and local inflammatory processes called autoinflammatory diseases such as familial Mediterranean fever and others cryopyrinopathies, as well as chronic inflammatory diseases like gout, rheumatoid arthritis, type 2 diabetes, and recurrent pericarditis, among others. In these processes, neutralization of IL-1 β or its receptor, results in a rapid and sustained improvement of disease severity (Braddock and Quinn, 2004; Dinarello, 2011).

Macrophages have a prominent role in the pathogenesis of chronic liver diseases (Dasarathy, 2008; Ramachandran and Iredale, 2012; Heymann *et al.*, 2009). We have described in chapter 1, that the basal “alert” state of peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and non-infected ascites regarding production of both pro-inflammatory, IL-6 and TNF- α , and anti-inflammatory IL-10 cytokines, can be pharmacologically modulated by inhibiting some of the MAPK and PI3K-Akt intracellular intermediates. In this chapter we have focused on the role of MEK1, JNK and p38 MAPK, as well as PI3K-Akt pathways in the generation of the potent inflammatory initiating cytokine IL-1 β , in peritoneal M-DM of patients with advanced stages of liver cirrhosis using specific inhibitors. M-DM from the blood of healthy controls was employed as reference population. As agents triggering cytokine secretion through interaction with PRRs we have used LPS, recognized by the complex (TLR4)/CD14/MD2, and heat killed *C. albicans*, whose polysaccharide structures are mainly, although not exclusively recognized by lectin receptors, either independently or in cooperation with TLR2 and 4 or other signaling receptors (Jouault *et al.*, 2009). Related to these stimuli, it has been described that LPS is able to induce NF- κ B-dependent transcription of the *IL1 β* gene and secretion of IL-1 β , although it does not trigger macrophages inflammasome activation in the absence of specific triggering ligands, such as ATP, reactive oxygen species, flagellin, pore-forming toxins, etc (Netea *et al.*,

Resultados y Discusión

2009), while *C. albicans* is able to induce inflammasome activation in the absence of other DAMPs o PAMPs (Cheng *et al.*, 2011).

First of all, we observed that there were not significant differences at *IL1 β* mRNA basal levels (although the tendency was higher for ascites M-DM) and the corresponding secreted protein assayed by ELISA in both M-DM populations, and they responded efficiently to LPS- or *C. albicans*-stimulation by increasing the amount of mRNA levels and secreted IL-1 β . Nonetheless, as it could be expected based on current literature (Netea *et al.*, 2009), the IL-1 β response (IL-1 β protein and mRNA) of healthy blood M-DM was higher than that achieved by M-DM from cirrhotic ascites probably due to the different state of differentiation between both population. In line with our previous results related to TNF- α , we have observed that the increment of secreted IL-1 β induced by heat killed *C. albicans* was significantly higher than that induced by LPS in ascites M-DM.

Additionally, our results confirm and strength the prominent role played by MEK1 and JNK in the pro-inflammatory signature of M-DM from the ascites of cirrhotic patients. Herein, we found that the phosphorylation state of their substrates, ERK 1/2 and c-Jun at baseline and under stimulation was higher in ascites M-DM. Moreover, inhibition of MEK1 and JNK significantly decreased the release of IL-1 β induced by LPS and *C. albicans* in both cell populations. These findings are consistent with our previous studies related to IL-6 and TNF- α pro-inflammatory cytokines. However, the basal level of IL-1 β produced by M-DM from donors' blood remained unaltered under treatment with both inhibitors. In contrast, p38 MAPK does not seem to play a significant role in the basal or activated secretion of IL-1 β in M-DM, since its inhibition did not produce any significant effect.

Notably, inhibition of PI3K by Ly294002 globally enhanced the release of IL-1 β in both M-DM populations, demonstrating the down-regulatory role of the PI3K-Akt pathway on the expression and secretion of this pro-inflammatory cytokine (Antoniv and Ivashkiv, 2011), although some statistical differences were observed between both cell groups when checking basal or stimuli-induced secretion. Thus, while the increase of baseline secretion of IL-1 β was only significant in M-DM from healthy controls, the LPS- and *C. albicans*-induced IL-1 β was only statistically increased in peritoneal M-DM from cirrhotic patients. Related to the effect of PI3K inhibition on the *IL1 β* gene expression, we found that it did not increase statistically the basal *IL1 β* mRNA either in

blood or ascites M-DM, while it reduced the *IL1 β* mRNA expression induced by LPS in blood M-DM, or *C. albicans* in ascites M-DM, treatment. These results suggest that the modulation of *IL1 β* gene expression induced by inhibition of the PI3K-Akt pathway do not explain the high increases produced in the IL-1 β secreted cytokine. Western blot of ascitic M-DM lysates and cell culture supernatants revealed that PI3K inhibitor induced the release of both forms of IL-1 β (pro- IL-1 β and mature form) outside the cell, which explains the results obtained of secreted mature IL-1 β by ELISA. Western blot of cell lysates showed that intracellular IL-1 β basal levels were higher in ascites M-DM, which correlated with the tendency found in mRNA expression, although the secreted IL-1 β levels detected by ELISA were similar in both populations. The higher intracellular accumulation of both IL-1 β forms in ascites M-DM indicated that the IL-1 β release rate by these cells was lower than in M-DM from healthy donors which could be explained at least in part by the higher PI3K pathway activity.

Related to this, it has been described in LPS-stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), that the constitutive active glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) favors gene induction of pro- vs. anti-inflammatory cytokines. Then, TLR4 dampens its own pro-inflammatory response by rapid induction (within minutes) of PI3K-Akt-mediated phosphorylation of GSK3 β on Ser9. This inhibits its activity, decreases the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12, and increases IL-10 (Martin *et al.*, 2005). However, blood monocytes from patients with decompensated cirrhosis present a defect in PI3K-Akt-mediated GSK3 β phosphorylation which results in unrestricted 'pro-inflammatory' activity of the enzyme (Coant *et al.*, 2011). On this regard, our results on PI3K inhibition (which has the opposite effect of GSK3 β inhibition, used by Coant *et al.*,2011) do not attribute a common behavior in gene transcription and expression of all pro-inflammatory cytokines tested in M-DM from ascites. Thus, we have described that the LPS-induced TNF- α and IL-6 secretion by M-DM from ascites of cirrhotic patients was highly dependent on the MAPK, while PI3K-Akt did not seem to play a prominent role because PI3K inhibition did not increase the amount of secreted IL-6 and TNF- α , but instead it was either unchanged or decreased in both M-DM. On the other hand, inhibition of PI3K almost completely suppressed the secretion of IL-10 in basal and stimulated M-DM consistent with other results (Antoniv and Ivashkiv, 2011).

Additionally, these results confirm the different dependence on the intracellular signaling pathways elicited by each microbial stimulus (Latz *et al.*, 2013; Kawai and Akira, 2011), i.e., the increase of secreted IL-1 β induced by LPS was more sensitive to PI3K inhibition than that induced by *C. albicans* in M-DM from ascites. These results also point out toward a critical counterbalanced cross-talking between activating signals mediated by MAPK ERK1/2 and JNK and inhibitory signals produced by PI3K-Akt on the release of IL-1 β in peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients when triggered through TLR4. However, intracellular signals triggered through lectin receptors alone or associated with others, are less dependent on the regulatory role of PI3K-Akt, at least in the cell populations analyzed in this work.

Most of the secreted IL-1 β in monocytes and macrophages is dependent on the inflammasome complex assembling which processes pro-CASP1 to its mature active form, CASP1 (Netea *et al.*, 2009). It has been recently described that inflammasome activation seems to be a component of the liver pathophysiology in ALD, since the increased IL-1 β was caused by upregulation of CASP1 activity and inflammasome activation, and was involved in the pathogenesis of alcohol-induced liver steatosis in mice (Petrasek *et al.*, 2012). Furthermore, components of CASP1-inflammasome complex (NLRP3 complex) are involved in the proteolytic activation and secretion of IL-1 β in HCV infected human hepatoma cells (Burdette *et al.*, 2012). Also as described above, the expression of several regulators of fibrosis such as MM9, MMP13 and TIMP, is dependent on IL-1 β (Gielsing *et al.*, 2009). Nevertheless, the specific role of CASP1 versus other caspases or proteases in liver fibrosis remains to be fully understood (Szabo and Csak, 2012).

Based on these findings we analyzed at the CASP1 implication on the IL-1 β release in both M-DM populations. Our results revealed that specific CASP1 inhibitor blocked completely the basal and LPS-induced release of IL-1 β , whereas only a partial blockage could be registered for the *C. albicans*-induced IL-1 β release, indicating the participation of CASP1 dependent and independent mechanisms in the response to *C. albicans*. On this regard it has been described fungal and mycobacterial-induced pro-IL-1 β processing through dectin-1 triggered MALT1-CASP-8-ASC noncanonical inflammasome complex (Gringhuis *et al.*, 2012).

Analysis of *CASP1* mRNA expression levels in both M-DM populations, showed that only LPS stimulation increase *CASP1* gene expression. In turn, at the protein level,

LPS and *C. albicans* induce a noticeable increment of pro-CASP1 and mature CASP1, being the effect stronger in blood M-DM, where the basal levels were also higher than those for ascites M-DM. Inhibition of PI3K did not have effect on the basal levels in cell lysates, while reduces noticeably the expression of both the pro-CASP1 and active CASP1 proteins on LPS-stimulated M-DM, which correlated with the lowering effects upon *CASP1* mRNA expression levels. In turn, while the PI3K inhibitor mainly increased the intracellular level of active CASP1 on *C. albicans*-stimulated M-DM, it did not change statistically the corresponding *CASP1* mRNA expression level. These results suggest the implication of other caspases, like CASP8 in the secretion of IL-1 β , and the existence of *C. albicans* induced posttranslational mechanisms in the processing of active CASP1. Furthermore, CASP1 is also secreted by ascites M-DM, and the PI3K inhibitor enhanced this release, which enables its contribution to activate the pro-IL-1 β released by these cells.

In conclusion, this work shows that inhibition of MEK1 and JNK reduced the basal and stimulated IL-1 β secretion, while the p38 MAPK inhibitor had no effect on that process. On the contrary, inhibition of PI3K increased the secretion of IL-1 β in stimulated M-DM, and this effect was mainly mediated by the enhancement of the release of intracellular IL-1 β and CASP1 content toward the extracellular medium. The mechanisms involved in the enhancement of this unconventional secretion route by PI3K inhibition remain to be elucidated.

These data point out at inhibitors of the MAPK pathways as potential therapeutic tools for pharmaceutical intervention to prevent hepatic damage by reducing the inflammatory response associated to liver failure. On the contrary the search on PI3K-Akt inhibitors it is not recommended as those drugs would enhance the inflammatory response by increasing the IL-1 β release and suppressing the production of IL-10.

CHAPTER 4.5

Galectin-3 in decompensated hepatic cirrhosis.

Galectin-3 (GAL-3) is a member of a large family of animal lectins involved in recognition and binding of carbohydrates (Ravinovich *et al.*, 2002). It can bind to a variety of extracellular and intracellular proteins, directly or through their carbohydrate residues, modulating cell activation, differentiation and survival (Henderson *et al.*, 2006).

Gene encoding Galectin-3, *LGALS3*, generates seven different transcripts by alternative RNA splicing. Only three are translated to protein and from them only two preserve the CDR domain. The isoform 1, with 250 aminoacides length, is encoded by the mRNA that we named as *GAL-3.1* and the isoform 2, with 200 aminoacides length, by mRNA we named *GAL-3.2*. *GAL-3.2* transcript variant uses an alternate splice site in the 3' coding region, which results in a frameshift. It encodes isoform 2, which has a shorter and distinct C-terminus, compared to isoform 1. Bibliography related to GAL-3 is referred to the isoform 1, the canonical sequence named here as GAL-3.1, and there is no published data about isoform 2 (GAL-3.2) expression.

Many studies suggest that GAL-3 may regulate inflammatory responses through its function on cell activation, cell migration, and regulation of apoptosis in immune cells. However the function of GAL-3 is multifaceted. Its regulation ability on many biological functions depends on its concentration, oligomerization state, and localization, extracellular, cytoplasmic or nuclear (Henderson and Sethi, 2009).

Several studies have determined an important role of GAL-3 during hepatic injury. The activation of hepatic stellate cells is a central process in liver fibrosis and is followed by a marked upregulation of GAL-3 which can be detected in human cirrhotic liver (Henderson *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2011). GAL-3 is also strongly expressed in rats treated with carbon tetrachloride to induce liver fibrosis (Hsu *et al.*, 1999).

GAL-3 has recently become an attractive therapeutic target due to its autocrine and paracrine actions, It modulates many immune reactions and affects various immune cells, particularly those of monocyte-macrophage lineage (Dabelic *et al.*, 2012). However, molecular mechanisms of its actions as well as regulatory mechanism of its expression and activation are still largely unknown.

Resultados y Discusión

The aim of this study was to determine the expression levels of *GAL-3.1* and *GAL-3.2* transcript variants and the protein they encoded, GAL-3 isoform 1 and 2, respectively in M-DM obtained from ascites of patients with decompensated cirrhosis. We compared the results with those obtained in M-DM control population obtained from blood of healthy donors, in order to establish a correlation with the hepatic cirrhosis pathology.

4.5.1. *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA variants are expressed in M-DM from ascites of cirrhotic patients.

To study the expression of mRNA that encodes *GAL-3.1* and *GAL-3.2* isoforms by qRT-PCR, we designed specific primers based on the gene sequence (*LGALS3*, NCBIGene number 3958) (Fig. 4.29).

```
1 GAGTATTGA GGCTCGGAGC CACCGCCCCG CCGGCGCCCCG CAGCACCTCC TCGCCAGCAG
61 CCGTCCGGAG CCAGCCAACG AGCGGAAAAT GGCAGACAAT TTTTCGCTCC ATGATGCGTT
121 ATCTGGGTCT GGAAACCCAA ACCCTCAAGG ATGGCCTGGC GCATGGGGGA ACCAGCCTGC
181 TGGGGCAGGG GGCTACCCAG GGGCTTCCTA TCCTGGGGCC TACCCCGGGC AGGCACCCCC
241 AGGGGCTTAT CCTGGACAGG CACCTCCAGG CGCCTACCCT GGAGCACCTG GAGCTTATCC
301 CGGAGCACCT GCACCTGGAG TCTACCCAGG GCCACCCAGC GGCCCTGGGG CCTACCCATC
361 TTCTGGACAG CCAAGTGCCA CCGGAGCCTA CCCTGCCACT GGCCCCTATG GCGCCCCTGC
421 TGGGCCACTG ATTGTGCCTT ATAACCTGCC TTTGCCTGGG GGAGTGGTGC CTCGCATGCT
481 GATAACAATT CTGGGCACG G TGAAGCCCAATGCAAACAGA ATTGCTTTAG ATTTCCAAAG
541 AGGGAATGAT GTTGCCTTCC ACTTAAACC ACGCTTCAAT GAGAACAACA GGAGAGTCAT
601 TGTTTGCAAT ACAAAGCTGG ATAATAACTG GGGAAGGGAA GAAAGACAGT CGGTTTTCCC
661 ATTTGAAAGT GGGAAACCAT TCAAATACA AGTACTGGTT GAACCTGACC ACTTCAAGGT
721 TGCAGTGAAT GATGCTCACT TGTTCAGTA CAATCATCGG GTTAAAAAAC TCAATGAAAT
781 CAGCAAACCTG GGAATTTT TGGTGACATAGA CCTCACCAGT GCTTCATATA CCATGATATA
841 ATCTGAAAGG GGCAGATTAA AAAAAAAAAA AGAATCTAAA CCTTACA TGT GTAAAGGTTT
901 CATGTTCACT GTGAGTGAAA ATTTTACAT TCATCAATAT CCCTCTTGTA AGTCATCTAC
961 TTAATAAATA TTACAGTGAA TTACCTGTCT CAATATGTCA AAAAAAAAAA AAAAAA
```

Fig 4.29. *GAL-3.1* cDNA sequence. The sequence underlined did not appear in *GAL-3.2* variant. In blue, forward primer to both *GAL-3* cDNA. In yellow, reverse primer to *GAL-3.1*. In green, reverse primer to *GAL-3.2*.

One forward primer common for both mRNA, one reverse primer specific for a sequence only present in *GAL-3.1* mRNA, and the other reverse primer common for both mRNA, but at the appropriate distance from forward primer to amplify only the *GAL3.2* mRNA.

The clinical and analytical characteristics of patients included in this study are shown in Table 4.VII.

Table 4.VII. Clinical and analytical characteristics of patients included in the study.

Variable	Patients with cirrhosis and culture-negative ascites (n = 10)
Etiology (n)	ALC (8), HCV (2)
Age	55.5 (14.2)
Male sex n (%)	7 (70)
Previous episodes of ascites n (%)	6 (60)
Child-Pugh mean score	8 (1.5)
Meld mean score	14.5 (6.7)
Bilirubin (mg/dL)	0.95 (0.5)
Albumin (g/dL)	3.1 (0.7)
Quick (%)	59.5 (30.7)
Serum creatinine (mg/dL)	1.05 (0.6)
Serum sodium (mEq/L)	134 (6.5)
INR	1.40 (0.6)
Blood WBC/mm ³	3990 (40670)
Ascites WBC/mm ³	121 (152)
Ascites Total protein (g/dL)	1.5 (0.63)
<i>Continuous variables are expressed as median (IQR) and categorical variables as percentage. ALC: alcohol intake; HCV: HCV chronic infection.</i>	

The efficiency of amplification was optimal for *GAL-3.1* mRNA in the qRT-PCR standard conditions, but we needed to improve the efficiency for *GAL-3.2* increasing the concentration of reverse primer until 100 nM, instead of 50 nM as described in Material and Methods section.

Results shown in Fig. 4.30 demonstrated that the mRNA encoding both *GAL-3* isoforms are expressed in M-DM from cirrhotic patients and M-DM from blood of healthy controls. Moreover, *GAL-3.1* mRNA was more abundant than *GAL-3.2* in these human M-DM populations, since qRT-PCR *GAL-3.2* amplification resulted in higher Ct even though the cDNA concentration was higher.

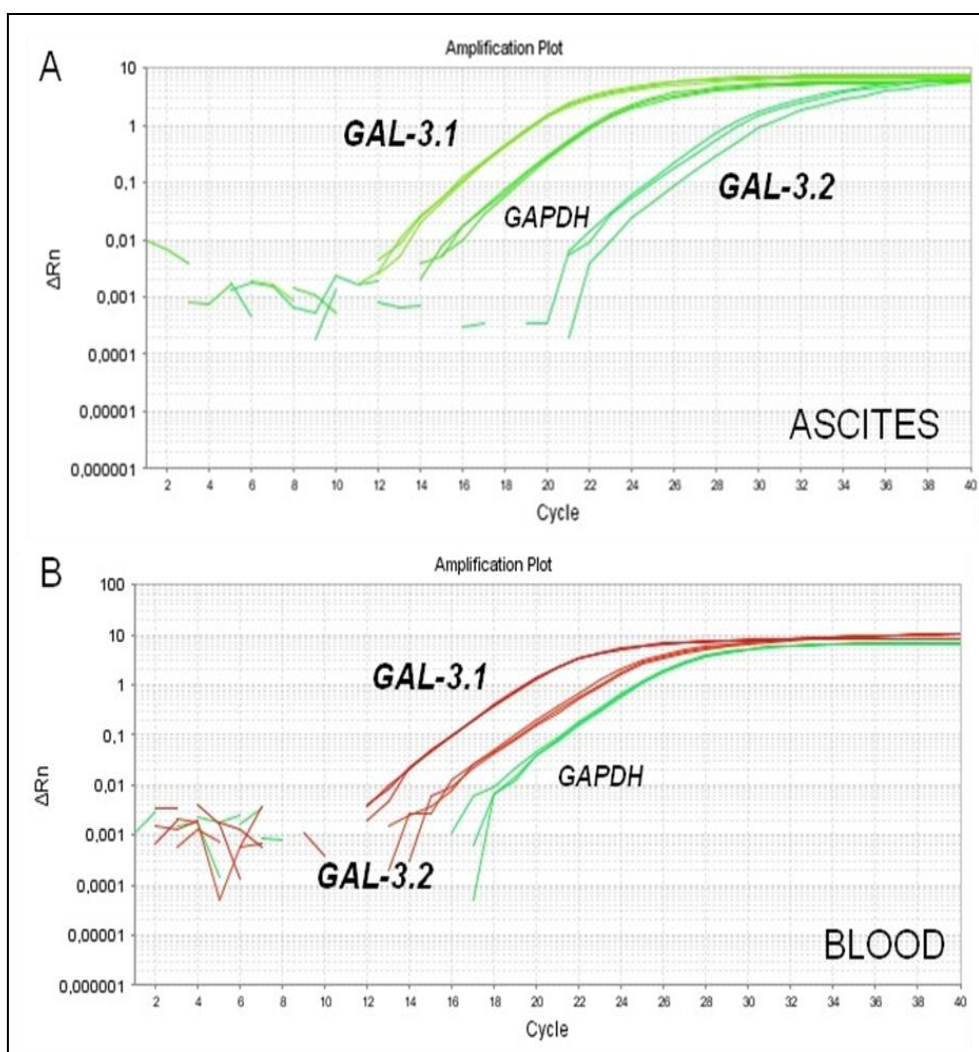


Fig 4.30. Amplification plot for *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA variants of the *LGALS3* gene by qRT-PCR. The cDNA was retrotranscribed from total RNA obtained from peritoneal M-DM from ascites of cirrhotic patients (2 μ g) (A) or blood M-DM from healthy donors (1 μ g) (B). To perform the qPCR we used undiluted, 1/5 and 1/100 cDNA dilutions to amplify *GAL-3.2*, *GAL-3.1* and *GAPDH* sequences respectively. Amplification plot of a representative individual of each M-DM population is shown.

These data also suggested that the *GAL-3.2/GAL-3.1* ratio is lower in M-DM from cirrhotic patients, implying that alternative splicing of primary *LGALS3* transcript directed to *GAL-3.2* variant was lower in this pathological condition.

4.5.2. *LGALS3* gene expression levels are lower in cirrhotic peritoneal M-DM compared with blood healthy M-DM.

The expression of *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA variants of *LGALS3* gene was analyzed by qRT-PCR at baseline in M-DM from blood of healthy donors or ascites from patients with cirrhosis (Fig 4.31). Results revealed that the expression of both

GAL-3.1 and *GAL-3.2* in M-DM from ascites was significantly lower than M-DM from blood.

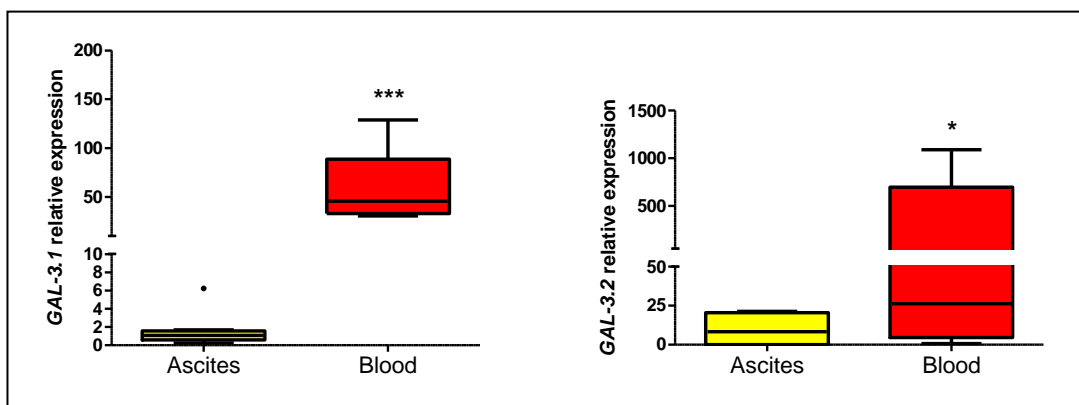


Fig.4.31. Baseline relative expression of *LGALS3* mRNA variants in ascites and blood M-DM. Total RNA were obtained from ascites (n=10) or healthy donors (n=5) M-DM and the *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA expression were analyzed by qRT-PCR and referred to the ascites M-DM expression (normalized as 1). *GAPDH* was used as house-keeping gene. The assay was done by triplicate. Results are represented as box plot. Circles out of the boxes correspond to outliers. The median and IQR are indicated for each box. Mann-Whitney U test: * p< 0.05, *** p< 0.001.

4.5.3. *LGALS3* gene expression exhibited differential response pattern to stimulation in peritoneal M-DM from cirrhotic patients.

Kinetic expression of *LGALS3* gene was analyzed by qRT-PCR at basal levels and after treatment with LPS or heat killed *C. albicans*. Expression of both *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA variants significantly decreased after 4 h of treatment with LPS or heat killed *C. albicans*, compared to basal levels (Fig. 4.32 A and B respectively). Their expression increased significantly after 24 h of stimulation, reaching basal levels for *GAL-3.2* and levels significantly higher than control only for *GAL-3.1* variant. After 48 hours of stimulation, *GAL-3.2* expression levels did not change, remaining as controls, meanwhile those for *GAL-3.1* decreased noticeably to recover also the basal expression levels.

These data indicated that *LGALS3* primary transcript is matured in a different way to generate *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA in response to stimulation with LPS and *C. albicans*. The synthesis of *LGALS3* primary transcript was quickly reduced in response to stimulation, which was reflected by the reduction of both *GAL-3.1* and 2 mRNAs. After 4h stimulation with LPS or *C. albicans*, the gene expression started to recover, appearing a rebound effect at 24h, in which the *LGALS3* primary transcript

Resultados y Discusión

concentration was higher than unstimulated control, and its processing was mainly directed to the synthesis of *GAL3.1* mRNA. Finally, the gene expression returned to basal levels 48h after stimulation, by reducing the synthesis of *LGALS3* primary transcript, which was again processed to *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNAs in the same proportion than in the baseline conditions.

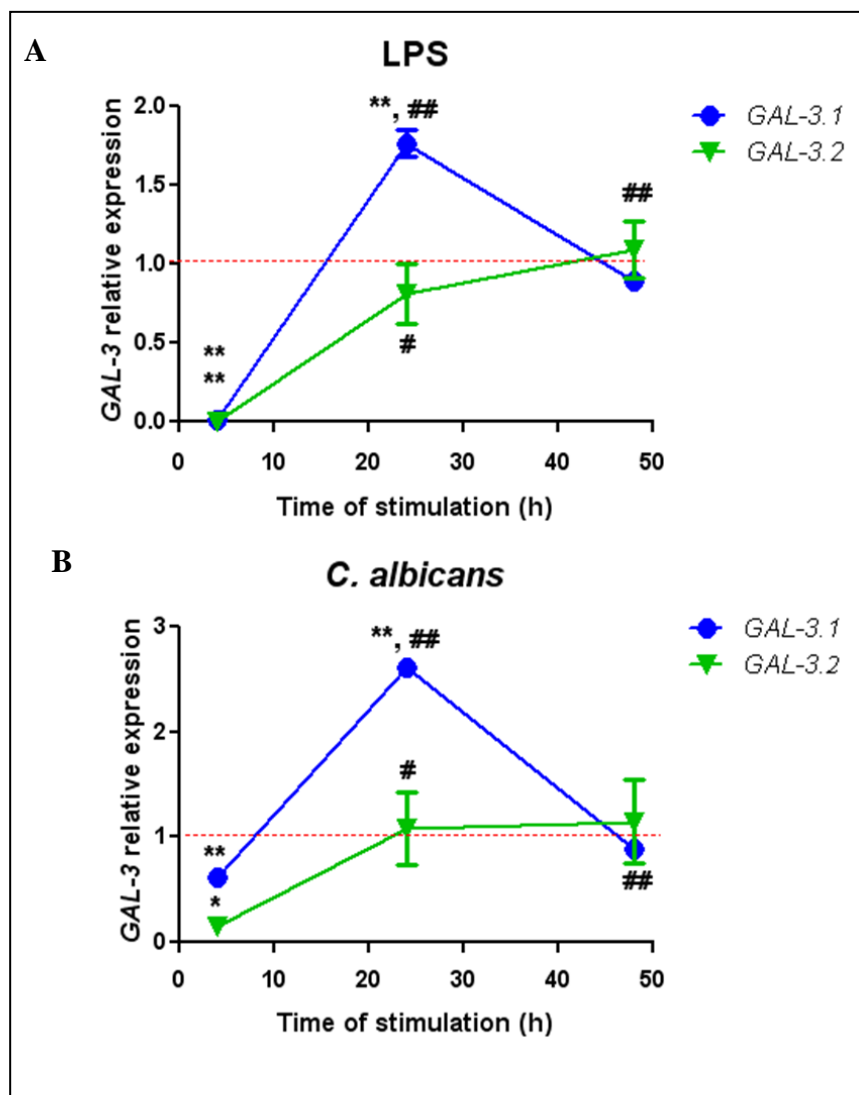


Fig. 4.32. *LGALS3* gene expression kinetics in response to stimulation with LPS or *C. albicans* in ascites M-DM. M-DM from ascites of one representative cirrhotic patient was treated with LPS (A) or *C. albicans* (B) for 4, 24, and 48 h. The relative expression of *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA variants were measured and referred to their untreated control (normalized as 1). *GAPDH* was used as house-keeping gene. The assay was done by triplicate. Wilcoxon test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ between treatment and its untreated control; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ between time of stimulation.

To determine if the rebound effect in the expression of *GAL-3.1* observed in response to 24h treatment with LPS or *C. albicans*, was specific to the ascites M-DM population or a common behaviour in human macrophages, we analyzed its expression

in the healthy M-DM population in those experimental conditions. Result shown in Fig 4.33 revealed that in contrast with the increased expression of *GAL-3.1* mRNA variant achieved in response to LPS and *C. albicans* in ascites M-DM after 24 h (Fig. 4.32), its expression levels decreased significantly ($P= 0.0001$) in response to LPS stimulation and slightly after treatment with *C. albicans*, in M-DM from blood donors.

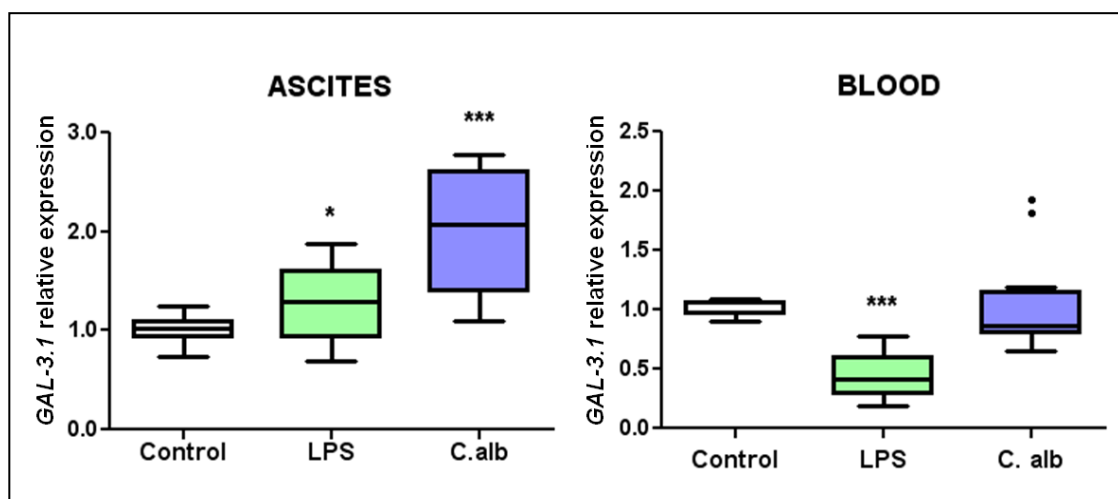


Fig.4.33. *GAL-3.1* mRNA variant expression in response to stimulation in ascites and blood M-DM. *GAL-3.1* expression was analysed in M-DM obtained from ascites (N=4) or from healthy donors blood (N=5) after 24 h treatment with LPS or *C. albicans* and referred to their untreated controls (normalized as 1). *GAPDH* was used as a house-keeping gene. The assay was performed in triplicate. Controls were normalized and used as calibrators. Results are represented as box plot. Circles out of the boxes correspond to outliers. The median and IQR are indicated for each box. Wilcoxon test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

These results pointed out to a differential stimulation response in ascites M-DM associated with their pathological environment.

4.5.4. Study of *GAL-3* protein expression in M-DM obtained from blood donors and from ascites of patients with cirrhosis.

Afterwards, we aimed to study the regulation of *GAL-3* at protein level treating to confirm the correlation with the results obtained at gene expression level. To do so, we used commercially available antibodies against human *GAL-3*. These antibodies were designed to recognize epitopes located in the protein N-terminus portion (being therefore able to recognize both *GAL-3* isoforms), or against the *GAL-3* whole molecule (there is no information about the epitope recognized, so it could be even in a common fragment for both isoforms or only in *GAL-3* isoform 1). Therefore, for the moment we have not an antibody available directed specifically against *GAL-3.2*

Resultados y Discusión

isoform which allow us to distinguish between both GAL-3 isoforms. We performed Western blot with different GAL-3 antibodies in ascites M-DM cell lysates and the staining pattern was similar for all of them (data not shown).

Then we analyzed basal expression levels of GAL-3 by Western blot in total protein extracts (Fig. 4.34) with the antibody directed to GAL-3 N-terminus portion, and we found that M-DM obtained from blood donors showed higher GAL-3 expression levels compared to M-DM from ascites ($p=0.017$).

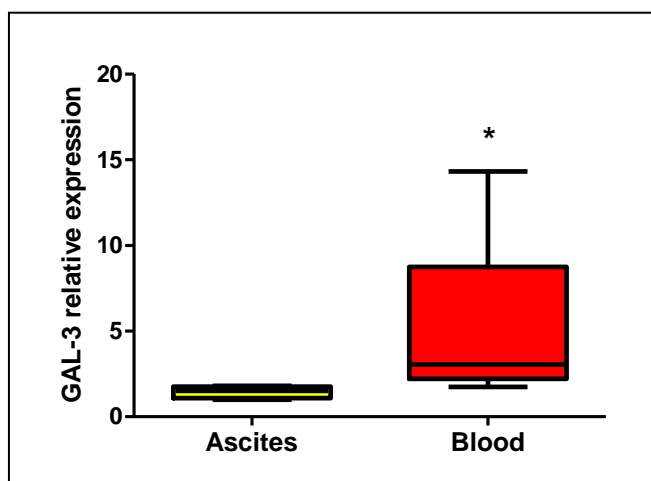


Fig. 4.34. Baseline GAL-3 expression in ascites and healthy blood M-DM. GAL-3 expression levels was studied by Western blot in total protein extracts obtained from ascites ($n=6$) and blood donors ($n=5$) M-DM and referred to ascites M-DM expression (normalized as 1). Immunoblots were quantified and the median \pm IQR represented as box plot. Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$.

We next analyzed the GAL-3 protein expression after 24 h treatment with LPS or *C. albicans* in both cellular populations (Fig. 4.35). The M-DM from ascites of patients with cirrhosis showed statistically significant reduced GAL-3 protein baseline expression levels compared with M-DM from blood of healthy donors. The lack of statistical differences after LPS or *C. albicans* treatments between both M-DM populations could be explained by the reduced number of samples, and/or because of the results obtained with this antibody were the addition of expression of both 1 and 2 GAL-3 isoforms, being the mRNA encoding GAL-3 isoform 2 levels not affected in this experimental conditions. Nevertheless, the trend seemed clear and correlated with results obtained for *GAL-3* mRNA expression.

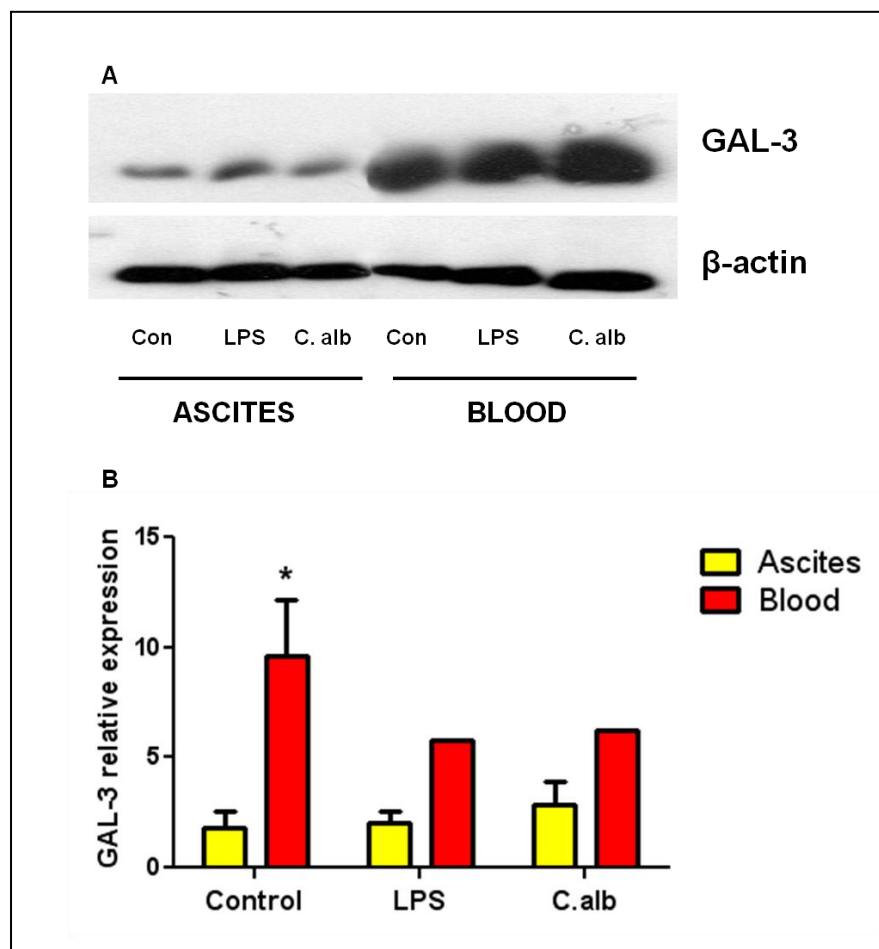


Fig. 4.35. GAL-3 protein expression in response to LPS or *C. albicans* stimulation in ascites and healthy blood M-DM. (A) Representative immunoblot for GAL-3 expression after 24h treatment with LPS and *C. albicans* in ascites and blood M-DM (n=2). β -actin was used as loading control (B) Immunoblots were quantified, GAL-3 expression was normalized to β -actin and referred to ascites M-DM basal level (normalized as 1) and the average \pm SEM represented as histograms in arbitrary units. Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$ between ascites and blood M-DM.

Finally, we explored the GAL-3 ability to release to the extracellular medium in M-DM from both populations. To do so, we concentrated the M-DM cell culture supernatants (see Materials and Methods chapter) and analyzed the GAL-3 expression by Western blot. In contrast with that we have described for cell lysates, we could not detect any specific GAL-3 band in the cell culture supernatant in any M-DM population. Therefore, the expression shown in cell lysates mainly reflects the total protein expression of GAL-3 in our M-DM populations, although we can not discard a slight release of GAL-3 which could be detected with more sensitive techniques as ELISA analyses.

4.5.5. Discussion.

Gene encoding Galectin-3, *LGALS3*, generates two different transcripts by alternative RNA splicing, encoding two proteins which preserve the CDR domain, the isoform 1 canonical sequence, named here as GAL-3.1, and the isoform 2 named here GAL-3.2, which has a shorter (50 aminoacids) and distinct C-terminus. Until now, all studies performed on human GAL-3, has been directed on GAL-3.1 isoform.

In this study we demonstrate for first time that the mRNA encoding GAL-3.1 is expressed, both at gene and protein levels, in M-DM from ascites of patients with decompensated cirrhosis. In response to LPS or *C. albicans* stimulation, *GAL-3.1* mRNAs expression decreased fast and drastically (4h), appearing a rebound effect at 24h, in which the *GAL-3.1* levels were higher than unstimulated controls, returning to basal levels 48h after stimulation.

Compared with the M-DM from blood of healthy donors, peritoneal M-DM from ascites of cirrhotic patients exhibited significantly lower *GAL-3.1* mRNA and protein expression levels. In contrast, *GAL-3.1* mRNA and protein expression increased in ascites M-DM in response to LPS and in higher extent to *C. albicans* after 24 h, while it decreased in M-DM from blood donors. These results pointed out to a differential response to stimulation in ascites M-DM associated with their pathological status.

Several studies have determined an important role of GAL-3 during hepatic injury. Hepatic macrophages activate HSC and enhance myofibroblast survival and thereby promote liver fibrosis (Pradere *et al.*, 2013). Activated HSC increased GAL-3.1 expression and release, which acts as an autocrine and paracrine factor, activating HSC (Jiang *et al.*, 2012) and inducing macrophage chemotaxis and their alternative activation (Henderson and Sethi, 2009). In this sense, we have previously described (chapter 4.1 and 4.4) that ascites M-DM presented similar TNF- α , IL-1 β and IL-10 and higher IL-6 cytokine levels than M-DM from blood donors. The secretion of pro-inflammatory IL-1 β in response to LPS and *C. albicans* stimulation was lower for ascites M-DM (chapter 4.4) compared with blood M-DM. These data could suggest that the M-DM present in AF of cirrhotic patients expressed a phenotype more “alternatively activated or M2a” type compared to our reference population, the M-DM from blood of healthy donors. These data could explain the differences found in GAL-3.1 expression in response to stimulation between both M-DM populations, although differences at baseline GAL-3.1

levels were the opposite as to what we expected. In this sense it has been published that *in vitro* differentiation of human monocytes to macrophages provoked significant increase of GAL-3.1 expression (Liu et al., 1995), although mainly alternatively activated macrophages are able to secrete GAL-3.1 in response to stimulation.

Zimmermann and collaborators described in the context of liver disease, a shift in the distribution of peripheral monocytes and monocyte-derived hepatic macrophages subsets towards the CD14⁺ CD16⁺ non-classical subtype, correlating with disease progression and being highest in patients with end-stage Child-Pugh C cirrhosis (Zimmermann *et al.*, 2010). As we described in chapter 4.2, the leukocyte migration to the peritoneal cavity is not a passive process induced by hemodynamic anomalies associated to cirrhosis, like portal hypertension, but more of an active chemoattractant-induced process involved in the recruitment of particular cell populations. Further work is currently in process to better define the M-DM phenotype in the ascites of cirrhotic patients, taking into account also its etiology.

It has been described that GAL-3 protein shuttles between the cytoplasm and nucleus on the basis of targeting signals that are recognized by importins for nuclear localization and exportin-1 (CRM1) for nuclear export (Haudek *et al.*, 2010). Not only the GAL-3 expression levels, but also its intracellular distribution, are important to exert its biological functions. In this sense, it has been reported that shifting the nuclear localization in favour of the cytoplasmic compartment occurs during neoplastic progression (Honjo *et al.*, 2000). GAL-3.2 isoform lacks of the protein domains required for nuclear trafficking, so its expression synthesis in macrophages could contribute to the regulation of the GAL-3 biological function in this cell type.

Our data demonstrate that the *GAL-3.2* mRNA is expressed both in M-DM from ascites of patients with decompensated cirrhosis and in M-DM from blood of healthy controls. This spliced variant of *LGALS3* gene was less abundant than *GAL-3.1* mRNA in these human M-DM populations. Similarly to *GAL-3.1* mRNA, the baseline *GAL-3.2* mRNA expression levels in M-DM from ascites were significantly lower than in M-DM from blood. Interestingly, the *LGALS3* primary transcript is matured differently to generate *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA in response to stimulation with LPS and *C. albicans*. We observed a fast reduction in *GAL-3.2* mRNA expression in the first 4h of stimulation and a gradual recover reaching basal levels at 24h of treatment. In contrast, *GAL-3.1* mRNA expression exhibited a significant increase at 24h, which indicated a

change in the processing of the *LGALS3* primary transcript, being directed mainly toward this transcript variant in these experimental conditions. It has been described the expression *in vivo* of transcriptional variants of certain galectins in endothelium whose expression and localization varied with activation and tumor development (Thijssen *et al.*, 2008). They described the presence of several bands in Western blot analysis with GAL-3 antibodies which were explained by different glycosylation states because they only detected one transcript variant. Nevertheless, we were not able to demonstrate the expression of GAL-3.2 in human macrophages. A different technical approach is needed to demonstrate the translation of *GAL-3.2* mRNA into protein in human macrophages which would confer biological relevance to its regulation.

These results showed for first time, expression and modulation in response to stimulation, of spliced mRNA variants of *LGALS3* gene in peritoneal M-DM from ascites of patients with decompensated cirrhosis. The differential gene and protein GAL-3 expression levels and behavior in response to stimulation compared with M-DM from healthy donors, could be related to a polarization toward a alternatively activated macrophage phenotype in that pathological scenario, that could be involved in the fibrosis enhancement. Gaining further understanding of GAL-3 regulation and function in M-DM will set the basis to identify new molecular targets for the hepatic damage prevention controlling the inflammatory and fibrogenic response associated to liver cirrhosis.

CHAPTER 4.6

Searching for a model to study the role of GAL-3 in human macrophages.

To deep inside of the molecular mechanisms of GAL-3 role in human macrophages, we decide to develop an *in vitro* model where we modified the *LGALS3* gene expression levels and study its effect on cell activity.

Primary monocytes or M-DM do not proliferate in a suitable scale so that, their use in functional studies *ex vivo* is limited. Acquisition of human primary monocytes or M-DM is difficult and the limited cell numbers obtained represent a barrier to the use of these primary cells in protocols requiring very large number of cells. Immortal proliferating cell lines, such as the human THP-1, HL-60 or U937 monocytic cell lines, are therefore often used instead a primary cells for *in vitro* studies of biological function of human monocytes and macrophages. Phorbol esters such as PMA allow differentiation of monocyte into macrophage-like cells which mimic many of the characteristic features of human primary M-DM (Daigneault *et al.*, 2010).

In this study, we assayed different transfection methods to overexpress *LGALS3* gene in THP-1, HL-60 and U937 human cell lines, and analyzed the mortality rate, transfection efficiency and the resulting GAL-3 expression levels and its cellular location. We also explored the GAL-3 expression depending on the monocyte- or macrophage-like phenotype, inducing differentiation to macrophages with PMA in these human cell lines.

4.6.1. Classical transfection methods resulted in low transfection efficiency and high mortality rates.

We tested different transfection methods commercially available based in liposomes such as lipofectamine 2000 (Life Technologies-Invitrogen, Paisley, UK), and Genjet and Polyjet *in vitro* transfection reagents following the manufacturer's instructions (Signagen Laboratories, MD, USA), and analyzed their efficiency and toxicity in THP-1 cell line. As positive control for transfection, we used a plasmid encoding GFP (pEGFP-C1 Vector, BD Biosciences Clontech, Saint-Germain-en -Laye, France). The efficiency of transfections was determined by flow cytometry and fluorescence microscopy. Results obtained were as follows: i). Transfection with lipofectamine was negative in all cases. ii). Transfection with Genjet provided a 4.5% of

Resultados y Discusión

THP-1 cells transfected and a 33% decrease in cellular viability. iii) Transfection with Polyjet provided a 5% of THP-1 cells transfected and a reduction in 43% of cellular viability.

Nucleofection was another technique used to modify gene expression based on the physical method of electroporation. The vector with the oligonucleotide sequence of interest is transferred directly into the cell nucleus or cytoplasm through the presence of pores in the membrane. The results obtained by nucleofection of pEGFP-C1 vector in THP-1, HL-60 and U937 human cell lines are represented in Fig. 4.36. THP-1 presented the highest percentage of transfection, followed by U937 and finally HL-60. Nevertheless, the efficiency obtained with this method, lower than 10% in all cases, indicated the need for trying other methods.

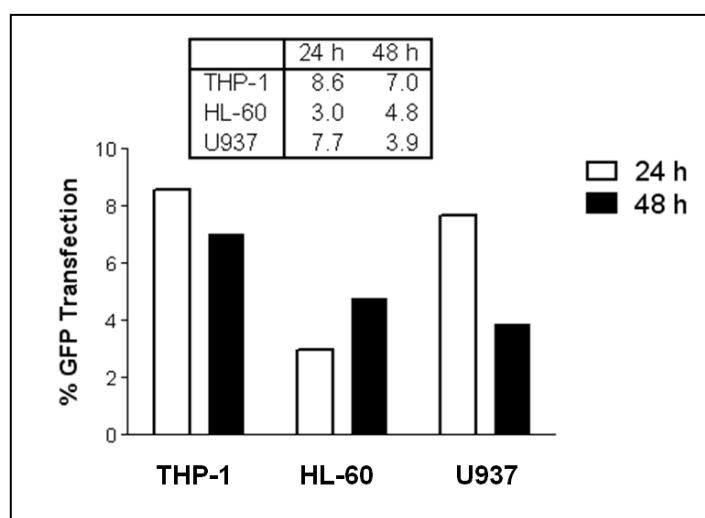


Fig. 4.36. Efficiency of transfection obtained in myelocytic cell lines using nucleofection method. Percentage of cells transfected after 24 or 48 h after transfection are represented as histograms and indicated in the table for each cellular type.

4.6.2. Lentiviral transduction method and expression controlled by SFFV promoter showed the highest efficiency rates.

The efficiency of previous transfection methods was inadequate to carry out our studies of GAL-3overexpression, so we searched for a different method to transfect these cell lines. Lentiviral vectors derived from the human immunodeficiency virus (HIV-1) have become major tools for genetic studies in mammalian cells. The advantageous feature of lentivirus vectors is the ability to mediate potent transduction and stable expression into dividing and non-dividing cells both *in vitro* and *in vivo*.

Lentiviruses are used to modify the expression of a gene of interest, either by overexpression or silencing into the target cell. This technique has shown the best results with cell types hard to transfect, like macrophages.

We first analyzed and compared the efficiency of lentivirus transduction method employing vectors encoding eGFP under two different promoters, SFFV or CMV, in the three promyelocytic cell lines and HEK293T.

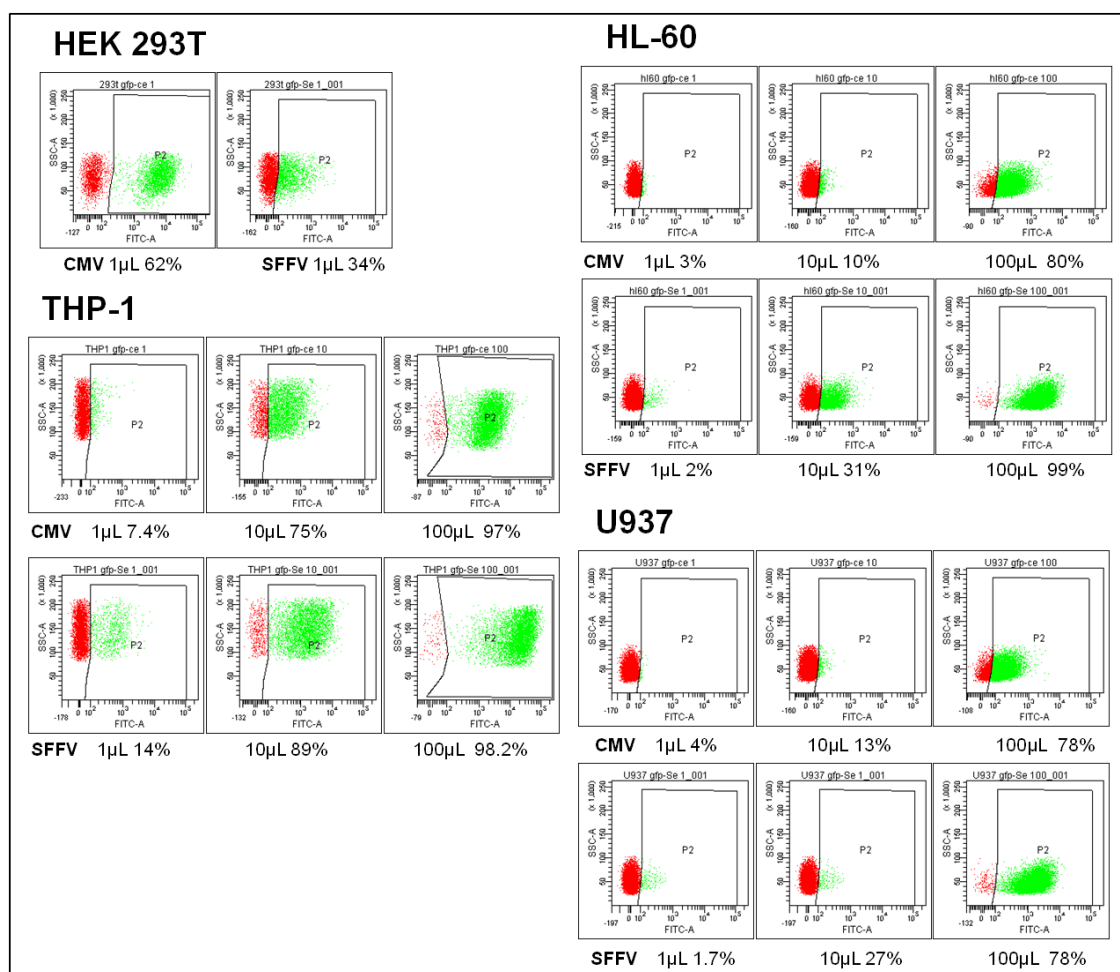


Fig.4.37. Expression of eGFP in HEK293T, THP-1, HL-60 and U937 cell lines after transduction with SEWP with SSVF or CMV promoters. Cells were transduced with 1, 10 or 100 μL of supernatant containing TUs (obtained from transfected HEK293T) that expressed eGFP under two different promoters, and transduction efficiency was analyzed after 24h by flow cytometry. Green fluorescence emission of GFP protein was analyzed in 5000 cells, registered and represented in X axes as FITC-A. In red, negative population for eGFP, in green, population that express eGFP.

The results, analyzed by flow cytometry, revealed that the percentage of cell expressing eGFP and the intensity of fluorescence expression, related to the number of inserted vector copies, were higher in the three myelocytic cells transduced with SEWP with the promoter SFFV (Fig 4.37). On the contrary, the lentiviral vector with CMV

Resultados y Discusión

promoter rendered the best results in HEK293T cells. Therefore we selected this method, and the lentivirus vector encoding eGFP under SFFV promoter for introducing the sequence of *LGALS3* and modulate its expression in HL-60, THP-1 and U937 cell lines (see Materials and Methods chapter).

Furthermore, we also analyzed the transduction efficiency by fluorescence microscopy for HL-60, THP-1 and U937 transduced cell lines (Fig. 4.38). The transduced cells showed a normal morphology, viability close to 90% and the results were consistent with those obtained by flow cytometry (Fig. 4.37).

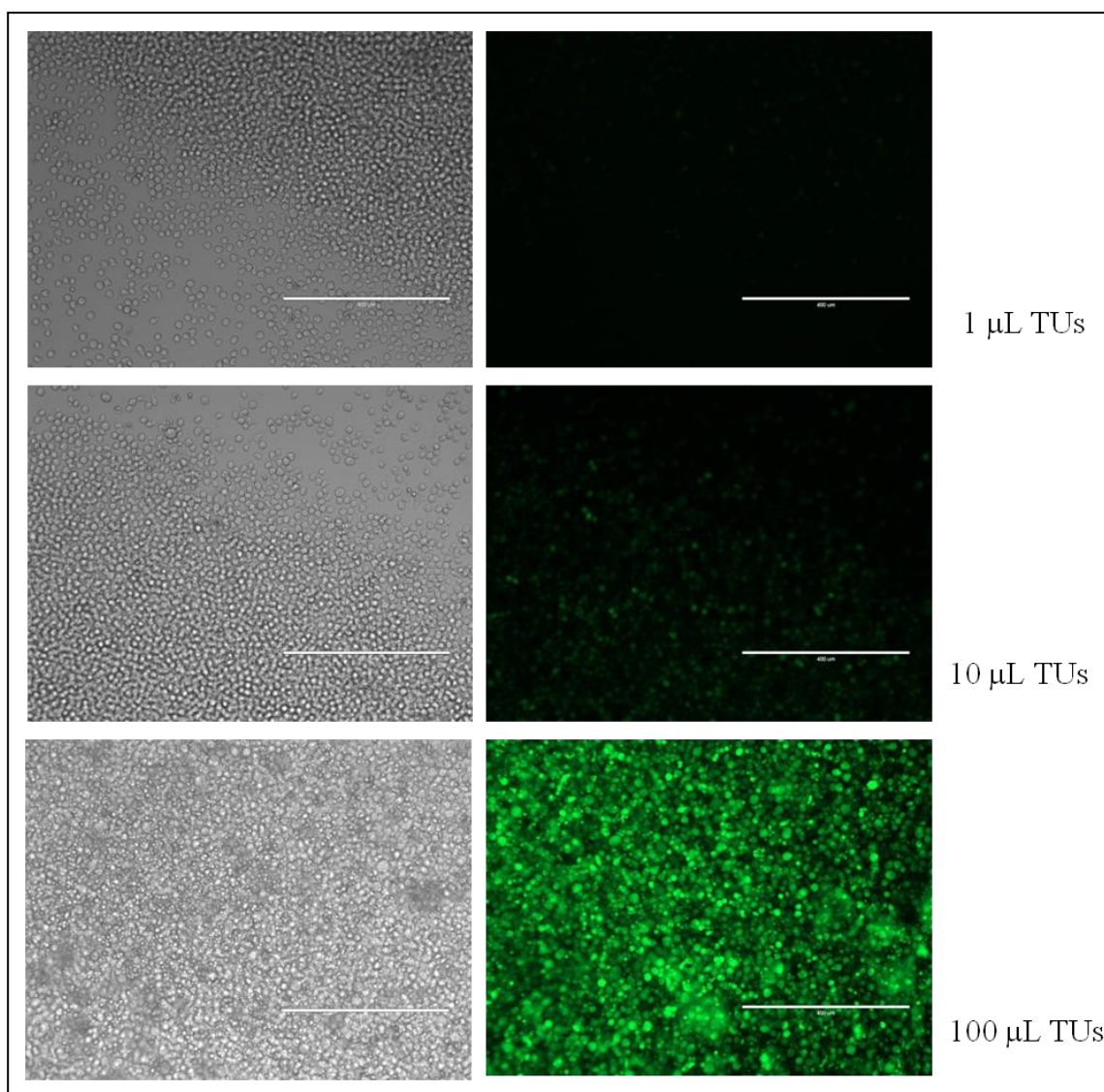


Fig. 4.38. Transduction efficiency in THP-1 cell line. THP-1 cells were transduced with 1, 10, or 100 μL of supernatant containing TUs with the lentiviral vector SEWP under SFFV promoter, and green fluorescence expression was analysed by fluorescent microscopy. The panels on the left showed bright field and panels on the right green fluorescence of THP-1 transduced cells.

4.6.3. GAL-3.1 cDNA transduction with lentiviral particles.

Once selected the transduction method and the vector, SEWP with SSFV promoter, we introduced the sequence of *GAL-3.1* c-DNA in this vector (SEWP+*GAL-3.1*) (see Materials and Methods chapter).

As we also explained in Materials and Methods chapter, for transductions assays, essential lentiviral (HIV-1) genes must be expressed in HEK 293T cells to allow the generation of lentiviral particles (TUs). 48 h after transduction, the supernatant of transfected HEK 293T cells containing recombinant lentiviral vectors were collected, the viral concentration estimated and used to transduce our cell type targets.

We calculated the viral titre to know the virions number or TUs, contained into the purified supernatants. To do that, we performed transductions with the SEWP lentiviruses obtained from transfected HEK293T supernatant at different concentrations: 1, 10 or 100 μL in 10^5 HEK293T, THP-1, U937 and HL-60 cell lines, and results were analysed after 48 h by flow cytometry (Fig. 4.37). We transfected 34% of HEK293T cells (34000 cells), with 1 μL of the virions containing supernatants, indicating a virus titre of 34×10^6 TUs/mL. The virus titre obtained for THP-1 was 14×10^6 TUs/mL, for HL-60, 3×10^6 TUs/mL, and finally for U937, 2.7×10^6 TUs/mL.

To check the integration and estimate the number of *GAL-3.1* cDNA copies integrated into the genome of target cell lines, we isolated the genomic DNA of these cell lines and performed specific *GAL-3.1* amplification by qPCR (see Material and Methods chapter). The primers employed, hybridized between first and second exon of the *LGALS3* gene, amplifying therefore only our cDNA insert and no the *LGALS3* gene which contains intron sequences. A standard curve with serial dilutions of the plasmid SEWP-*GAL-3.1* was done. Using specific primers to amplify *GAL-3.1* by qPCR and analysing the results we calculated the Ct number that correspond with each dilution. In parallel, DNA from our transduced cells were amplify with the same specific primers and the number of Ct obtained calculated and then, the results were extrapolated with our standard curve to determine the number of *GAL-3.1* sequences inserted into the genome. We found that THP-1 cells transduced with 100 μL of TUs expressed 2 copies/cell of *GAL-3.1*, and THP-1 transduced with 300 μL of TUs expressed 7 copies/cell of *GAL-3.1*; HL-60 and U937 transduced with 300 μL of TUs expressed

Resultados y Discusión

only 1 copy/cell of *GAL-3.1* inserted into their genome; and finally HEK293T transduced with 100 μ L of TUs expressed 1 copy/cell of *GAL-3.1*.

4.6.4. Analysis of *GAL-3.1* expression after lentiviral transduction in human macrophage-like cell lines.

The *GAL-3.1* mRNA level expression was assayed by qRT-PCR with *GAL-3* specific primers in transduced with respect to non-transduced cell lines. For THP-1 cell, the increase of *GAL-3.1* mRNA expression reached 45 fold after transduction with 100 μ L of TUs and 170 fold after transduction with 300 μ L of TUs respect to its non-transduced control (NT) (Fig. 4.39). In the case of HL-60, the *GAL-3.1* mRNA level increased 42 fold after transduction with 300 μ L of TUs respect to its control, and 139 fold after transduction with 300 μ L of TUs in U937 cells compared with its control. Therefore, the cell line transduced more efficiently was THP-1.

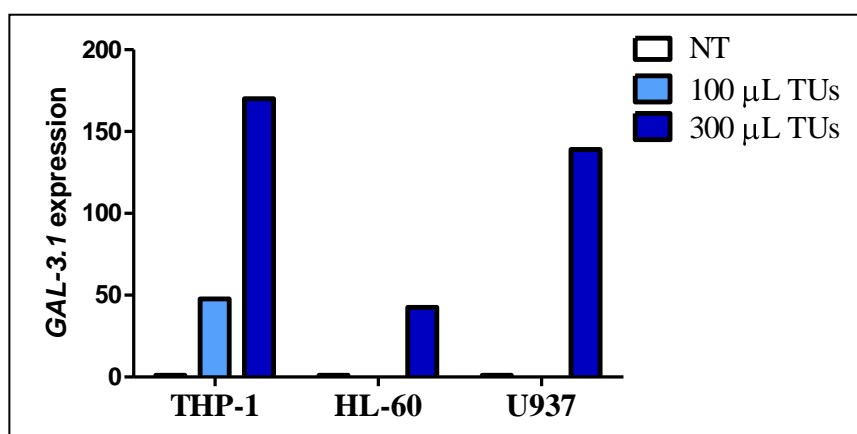


Fig. 4.39. Analysis of *GAL-3.1* mRNA expression in myelocytic cell lines after lentiviral transduction. *GAL-3.1* expression was analyzed by qRT-PCR in cell lines non-transduced (NT) or transduced with 100 μ L or 300 μ L of TUs, and referred to their NT control (normalized as 1). *GAPDH* was used as house-keeping. The assay was done by triplicate.

We then, analyzed the modulation of *GAL-3.1* expression by Western blot, using specific antibodies against *GAL-3* protein (directed to the amino terminus of protein, binding, then recognizing also to the *GAL-3.2* isoform).

The results shown in Fig. 4.40, revealed higher *GAL-3* expression levels in all transduced cells with respect to their controls.

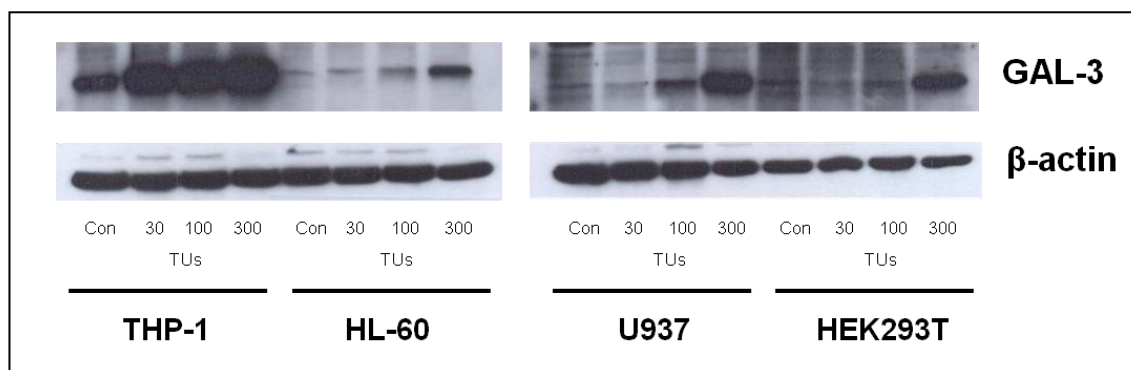


Fig. 4.40. Analysis of GAL-3 protein expression in myelocytic cell lines after lentiviral transduction. Representative immunoblots for GAL-3 protein expression in THP-1, HL-60, U937 and HEK293T cell lines non-transduced (Con, from control) or transduced with 30, 100 or 300 μ L TUs containing SEWP+ *GAL-3.1* vector. Total β -actin was used as loading control.

These results indicated that the cDNA inserted into the genome by transduction with lentivirus vectors, was efficiently translated to protein and correlated with the TUs dosage, in all cell lines tested. THP-1 cell line exhibited the highest GAL-3 protein expression levels, either at baseline or after *GAL-3.1* transduction.

4.6.5. Effect of differentiation to macrophages on GAL-3 protein expression and location in myelocytic cell lines.

We next study the effect of differentiation in the modulation of GAL-3 expression in transduced cells with respect to their controls. To do that, the three myelocytic cell lines non-transduced, or transduced with the highest TUs assayed, were differentiated with PMA (see Materials and Methods chapter). We then analyzed the GAL-3 protein expression by Western blot and the results obtained were represented in Fig. 4.41. The expression of GAL-3 increased with PMA differentiation both in transduced and non-transduced HL-60 and U937 cells, but in the case of THP-1 cells, the GAL-3 expression levels were so high in transduced cells, that slight differences could be detected after differentiation in this condition.

To further study the expression and localization of GAL-3, we analyzed its expression at cell surface level by flow cytometry, using the only commercial antibody able to recognize GAL-3 in the cell surface (TIB 166 hybridoma).

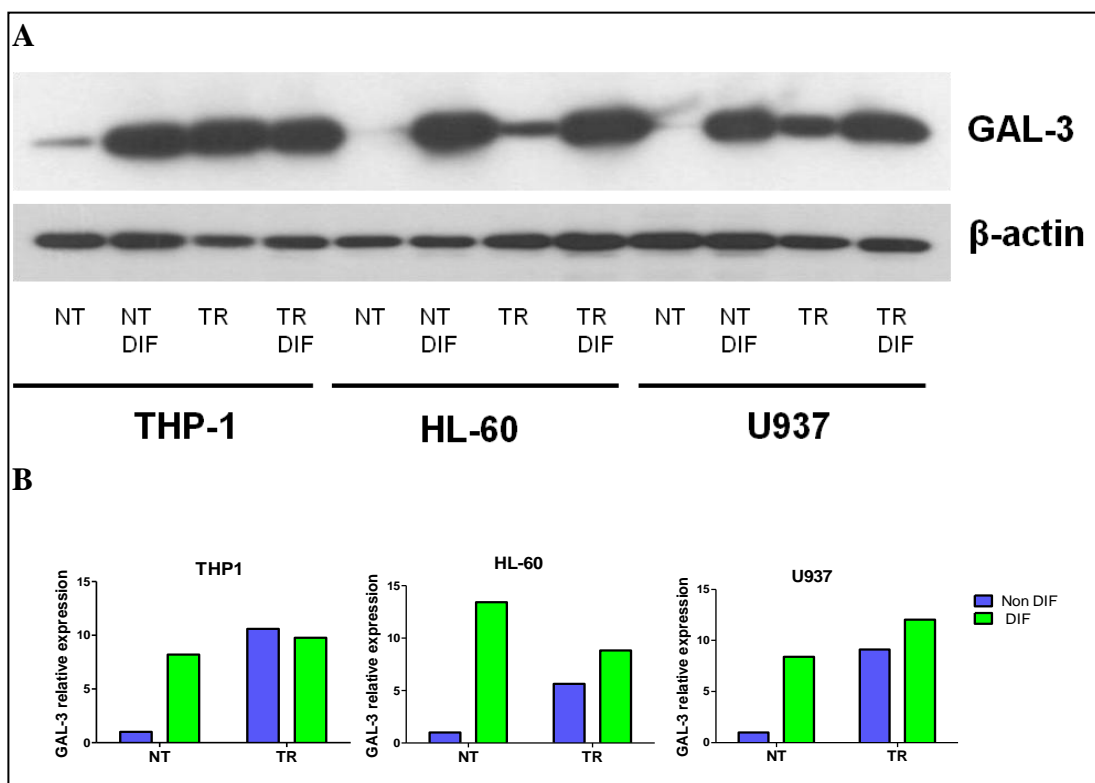


Fig. 4.41. Effect of differentiation to macrophages on GAL-3 protein expression in myelocytic cell lines. THP-1, HL-60 and U937 cell lines were differentiated by 10 ng/ml PMA addition for 24 h. (A) Representative immunoblots for GAL-3 protein expression is shown. Total β -actin was used as loading control. (B) Immunoblots were quantified, GAL-3 expression was normalized to β -actin and referred to their non-transduced and non differentiated controls (normalized as 1) and the average \pm SEM represented as histograms in arbitrary units. NT= non-transduced cells, TR = transduced cells, DIF= differentiated cells, Non DIF = non differentiated cells. Assays were done by triplicate.

In Fig. 4.42, we observed by cytometric analysis, that GAL-3 is expressed at surface in non differentiated HL-60 and U937 cell lines either non-transfected (light blue line vs negative staining control, dark blue line) or transfected (light pink line vs negative staining control, dark pink line). Interestingly GAL-3 expression was absent in membrane of THP-1 cells in those conditions. However, all differentiated cell lines expressed GAL-3 at surface level, either non-transfected (light green line vs negative staining control, dark green line) or transfected (yellow line vs negative staining control, orange line).

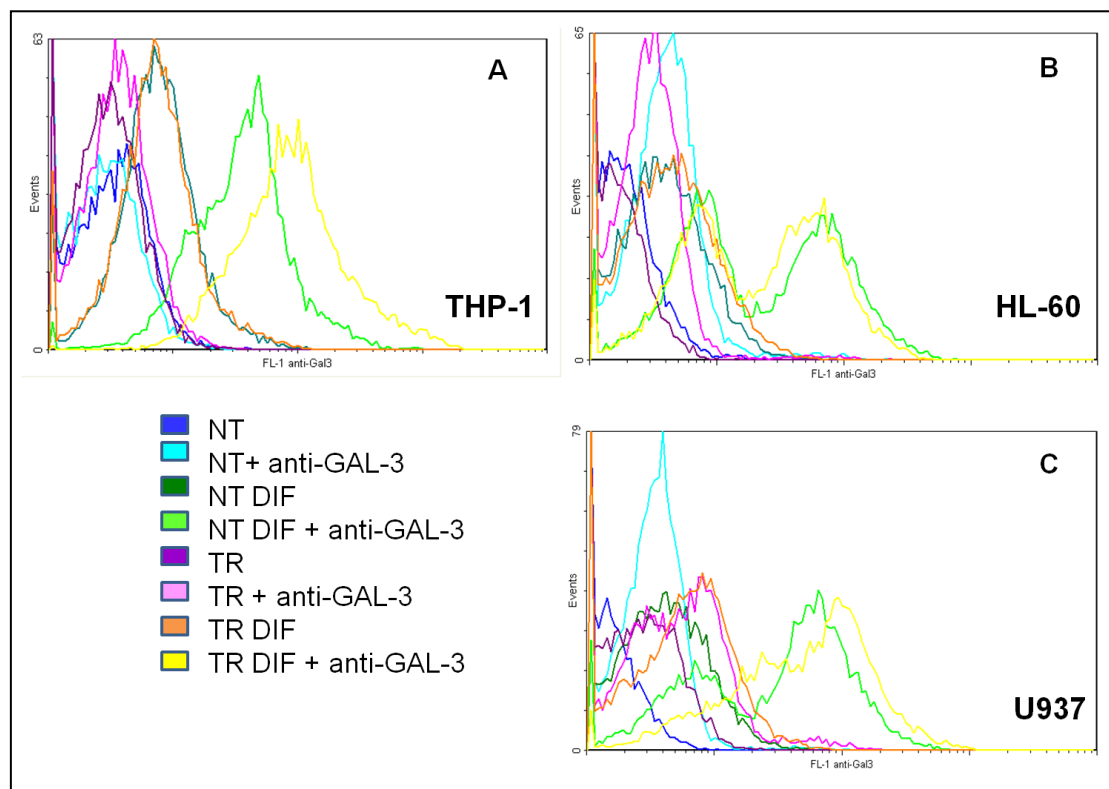


Fig. 4.42. Surface GAL-3 protein expression in THP-1, HL-60 and U937 cell lines. The transduced and non-transduced THP-1, HL-60 and U937 cell lines were differentiated with 10 ng/ml PMA for 24h. The cells were stained with rat antibody against human GAL-3 and revealed with secondary antibody anti rat IgG labelled with Alexa Fluóor 488 nm, and the fluorescence intensity of 5000 cells were analyzed by flow cytometry. For negative controls, the primary antibody was omitted. NT= Non-transduced cells, TR = Transduced cells, DIF= Differentiated cells.

Results also showed that the differentiation process increased the surface GAL-3 levels in non-transduced cells (light green line vs light blue line) and transduced cells (yellow line vs light pink line) in the three cell lines tested.

We could also observe that the *GAL-3.1* transduction process did not affect the surface GAL-3 levels in non-differentiated cell lines (light pink line vs light blue line) while in transduced cells (yellow line vs light green line) the GAL-3 expression increased to a higher extent for THP-1 cells followed by U937, and HL-60 cell lines.

4.6.6. Discussion.

Transfection of expression vectors or small interfering RNAs is widely used to study the function of gene products and has been successfully applied to many cell models. However, gene transfection in monocytes and macrophages is difficult due to their resistance compared to other cell types (Dokka *et al.*, 2000). Non-viral transfection

Resultados y Discusión

of myeloid cell lines has been described but presented problems to maintain viability and functionality during differentiation of transfected cells into macrophages, being the modified Nucleofection procedure the non-viral technique with better results (Schnoor *et al.*, 2009, Maess *et al.*, 2011). Viral transfection of myeloid cell lines has also been described (Lee *et al.*, 2004), but this approach is time-consuming, requires specially equipped laboratories with high security levels and may cause various unknown side-effects (Thomas *et al.*, 2003).

To develop an efficient method to overexpress *LGALS3* gene in myelocytic cell lines we tested several non-viral transfection methods and different commercial available products. We tried also improved Nucleofection protocols developed by several research groups (Maess *et al.*, 2011; Schnoor *et al.*, 2009), but none of them provided successful results. We then employed viral approaches that have the ability to mediate potent transductions and stable expressions into mammalian cells. Cells of the monocyte lineage can be infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) both during clinical infection and *in vitro*. The lentivirus have the ability to transduce human monocytes, M-DM, and dendritic cells, allowing to establish an efficient method for gene delivery to human antigen-presenting cells (Neil *et al.*, 2001, Leyva *et al.*, 2011). The gene expression levels obtained after transduction vary depending of the promoter contained in the lentivirus vector and the cell type transduced (Zhou and Huang, 2011). Then, we followed the lentivirus transduction protocol, with the SEWP vector with SSFV or CMV promoters, provided by Dr. Martín Molina (Genyo, Granada) to develop a model for GAL-3 study, overexpressing *LGALS3* gene in human monocytic cell lines.

Our results showed higher gene expression levels under SSFV promoter in this cell types in transduction assays performed with the eGFP expressing lentivirus SEWP vector. We then finally successfully transduced the THP-1, HL-60 and U937 cell lines with SEWP lentiviral vector containing *GAL-3.1* cDNA.

THP-1 was the cell line with the highest baseline GAL-3 protein expression levels. THP-1 was also the cell line with the highest number *GAL-3.1* cDNA copies integrated into its genome by lentiviral transduction and therefore it exhibited the highest GAL-3 protein expression levels after transduction.

Interestingly, the increase in GAL-3 expression observed after *GAL-3.1* transduction in the absence of macrophage differentiation process, both at mRNA and

protein level, could not be detected at cell surface level, indicating that GAL-3 protein accumulated inside the cells and is not expressed at external cell surface in this experimental conditions. This result was consistent for the three promyelocytic cell lines studied.

Total GAL-3 expression levels in cells differentiated with PMA increased significantly both in transduced in non-transduced for the three cell lines assayed, being the differences more evident in non-transduced cells. These results indicated that the differentiation process increased the GAL-3 expression level, which is in concordance with data described by other authors (Kim *et al.*, 2003; Dumic *et al.*, 2006). Only in the case of transduced THP-1 cells, we could not achieve differences in the total GAL-3 expression after differentiation; probably due to the transduction process was so efficient that it reached the maximal capacity to synthesize this protein in this cell line. Nevertheless, the increases at the surface GAL-3 levels were evident either in non-transduced or transduced cells in the three cell lines tested, including THP-1.

Therefore these results indicated that, *GAL-3.1* transduction increases the total GAL-3 protein, which is accumulated inside the cells, and only after the differentiation process, which also increased the total GAL-3 protein by itself, is distributed between the interior and the cell surface in all cell lines assayed. This suggests GAL-3 bind to proteins expressed at molecular surface level preferentially in differentiated status. In this sense, it has been described the association of GAL-3 to TLR2 at the plasmatic membrane, expressed only after differentiation induced with PMA in THP-1 cells, and their role in *C. albicans* phagocytosis, (Jouault *et al.*, 2006).

In summary, we have successfully transduced with lentiviral vector under SSFV promoter the *GAL-3.1* cDNA in the THP-1, HL-60 and U937 human cell lines, with different expression levels depending of the cell line, being the highest GAL-3 overexpression levels registered in THP-1 cell line. Studies are in progress to elucidate the consequences of the GAL-3 overexpression in their biological activities.

5. CONCLUSIONES

- 1- M-DMs from patients with decompensated hepatic cirrhosis are in a primed inflammatory status in absence of detectable antigens, which would facilitate a fast response, probably controlled by IL-6, against subsequent events of bacterial translocation.
- 2- A positive correlation exists between basal IL-6 levels and ERK phosphorylation in peritoneal M-DM from patients with cirrhosis.
- 3- Ascites M-DM are “differently primed” by the *in vivo* pathophysiological environment and preserve their inflammatory differentiation profile for at least 24 h, being more pro-inflammatory in alcoholic respect HCV infected cirrhotic patients.
- 4- The number of PMNs, M-DMs and T lymphocytes in the ascites depends on the cirrhosis etiology suggesting that leukocyte migration towards the peritoneal cavity is not a passive process.
- 5- In peritoneal M-DM isolated from the ascites of cirrhotic patients, the release of TNF- α and IL-6 pro-inflammatory cytokines depends on MAPK signaling pathways and differ depending on the microbial stimuli, whereas PI3K-Akt pathway has a prominent role in the modulation of IL-10 mediated anti-inflammatory function.
- 6- Inhibition of MEK1 and JNK reduced IL-1 β secretion, while p38 MAPK inhibitor had no effect on that process. On the contrary, inhibition of PI3K increased the secretion of IL-1 β in M-DM, mainly by the enhancement of the release of intracellular IL-1 β and CASP-1 content toward the extracellular medium.
- 7- Inhibitors of MAPK pathways could be potential therapeutic tools for pharmaceutical intervention to prevent hepatic damage by reducing the inflammatory response associated to liver failure. On the contrary PI3K-Akt inhibitors are not recommended as those drugs enhance the inflammatory response by increasing the IL-1 β release and suppressing the production of IL-10.
- 8- *GAL-3.1* and *GAL-3.2* spliced variants of *LGALS3* gene are expressed in M-DM from ascites and this expression is modulated after stimulation.

Conclusiones

- 9- The differential gene and protein GAL-3.1 expression levels and behavior in response to stimulation related to M-DM from healthy donors, signals to a polarization to a alternatively activated macrophage phenotype in that pathological scenario, involved in the fibrosis enhancement
- 10- An *in vitro* model of GAL-3 overexpression has been developed by transduction with lentivirus vectors containing *GAL-3.1* in THP-1, HL-60 and U937 cell lines to study its role in human macrophages.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. Séptima Edición, 2012.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. Sexta Edición, 2008.

Albillos A, Cuervas Mons V, Millan I, Cantón T, Montes J, Barrios C, Garrido A, Escartín P. Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1990; 98:134–40.

Alessandri AL, Sousa LP, Lucas CD, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol. Ther.* 2013 Aug;. 139.2 : 189-212.

Antoniv TT, Ivashkiv LB. Interleukin-10-induced gene expression and suppressive function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway. *Immunology* 2011; 132(4): 567-577.

Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut* 2009; 58:41–8.

Barton BE, Jackson JV. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immun* 1993; 61:1496–9.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115:209-218.

Bellot P, Francés R, Such J. Bacterial translocation in cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2008 Oct; 31(8):508-14.

Benson, D., Lipman, D. J., Ostell, J. GenBank. *Nucleic acids research.* 1993, 21(13), 2963–5.

Bibliografía

Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; 23:217–44.

Bonacini M, Govindarajan S, Kohla M, Lai MM, Lindsay KL. Intrahepatic lymphocyte phenotypes in hepatitis C virus infection: a comparison between cirrhotic and non-cirrhotic livers. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007; 53(1): 1-7.

Braddock M, Quinn A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2004 Apr; 3 (4) : 330-39.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7; 72:248-54.

Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G.. Hepatitis C virus activates interleukin-1beta via caspase-1-inflammasome complex. *J.Gen.Virol.* 2012 Feb; 93 (Pt 2): 235-46.

Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993; 104:1492–7.

Casafont Morencos F, de las Heras Castaño G, Martín Ramos L, López Arias MJ, Ledesma F, Pons Romero F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 1996 Mar; 41(3):552-6.

Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 1998 Nov; 28(5):1187-90.

Chen CM, Yoon YH, Yi HY, Lucas DL. Alcohol and hepatitis C mortality among males and females in the United States: a life table analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31(2): 285-292.

Cheng SC, Van de Veerdonk FL, Lenardon M, Stoffels M, Plantinga T, Smeekens S, Rizzetto L, Mukaremera L, Preechasuth K, Cavalieri D, Kanneganti TD, van der Meer JW, Kullberg BJ, Joosten LA, Gow NA, Netea MG. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J.Leukoc.Biol.* 2011 Aug; 90 (2): 357-66.

Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg.* 1964; 1:1-85.

Coant N, Simon-Rudler M, Gustot T, Fasseu M, Gandoura S, Ragot K, Abdel-Razek W, Thabut D, Lettéron P, Ogier-Denis E, Ouziel R, Devière J, Lizard G, Tellier Z, Lebrech D, Moreau R. Glycogen synthase kinase 3 involvement in the excessive proinflammatory response to LPS in patients with decompensated cirrhosis. *J.Hepatol.*2011 Oct; 55 (4): 784-93.

Cook R, Wu CC, Kang YJ, Han J. The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell Mol Immunol.* 2007 Aug; 4(4):253-9.

Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med* 2009; 15(8): 369-379.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008 May 1; 180(9):5771-7.

Dabelic S, Novak R, Goreta SS, Dumic J. Galectin-3 expression in response to LPS, immunomodulatory drugs and exogenously added galectin-3 in monocyte-like THP-1 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2012 Sep; 48(8):518-27.

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 2010 Jan 13; 5 (1):e8668.

Bibliografía

Dasarathy S. Inflammation and liver. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2008; 32(6): 660-666.

De Franchis R, Dell'Era A. Non-invasive diagnosis of cirrhosis and the natural history of its complications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007; 21(1):3-18. Review.

Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res.* 2007 Aug 15; 13(16):4677-85. Review.

Delhem N, Cottrez F, Carpentier A, Miroux C, Morales O, Francois V, Groux H, Auriault C, Pancre V. Role of the Regulatory T lymphocytes in hepatitis C fibrosis progression. *Bull Cancer* 2008; 95(11): 1029-1038.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986 May 22; 89(2):271-7.

Diao H, Kohanawa M. Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor alpha production. *Infect. Immun,* 2005; 73:3745– 8.

Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol.* 2011 May; 41(5):1203-17.

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu.Rev.Immunol.* 2009; 27: 519-50.

Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011 Apr; 117 (14): 3720-32.

Dokka S, Toledo D, Shi X, Ye J, Rojanasakul Y. High-efficiency gene transfection of macrophages by lipoplexes. *Int J Pharm.* 2000 Sep 25; 206(1-2):97-104.

Dolganiuc A, Garcia C, Kodys K, Szabo G. Distinct Toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12(8): 1198-1204.

Dowling D, Hamilton CM, O'Neill SM. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine* 2008; 41:254–62.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Apr; 1760(4):616-35.

Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson AJ, Rossi AG, Haslett C, Sethi T. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol.* 2008 Feb; 172(2):395-405.

Ferri S, Lalanne C, Lanzoni G, Bassi M, Asioli S, Cipriano V, Pappas G, Muratori P, Lenzi M, Muratori L. Redistribution of regulatory T-cells across the evolving stages of chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis* 2011, Oct;43(10):807-13.

Findlay BB, Hancock REW. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nature Rev Microbiol.* 2004 Jun 2, 497-504.

Francés R, Benloch S, Zapater P, González JM, Lozano B, Muñoz C, Pascual S, Casellas JA, Uceda F, Palazón JM, Carnicer F, Pérez-Mateo M, Such J. A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology* 2004; 39:484–91.

Frances R, Muñoz C, Zapater P, Uceda F, Gascón I, Pascual S, Pérez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004; 53:860–4.

Bibliografía

Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreu R Pascual S, Bellot P, Pérez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008; 47:978–85.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008; 88:125-172.

Gao B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Mar; 27 Suppl 2:89-93.

Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, Scheller J. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012 Jun; 23(3):85-97.

García-Buey L. González-Mateos, F.; Moreno-Otero, R. Hepatic cirrhosis *Medicine.*2012; 11:625-33.

Garcia-Tsao G, Angulo P, Garcia JC, Groszmann RJ, Cadelina GW. The diagnostic and predictive value of ascites nitric oxide levels in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 1998 ; 28:17–21.

Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(6): 453-460.

Gielsing RG, Wallace K, Han YP. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* 2009 Jun; 296 (6): G1324-G1331.

Ginés P, Rimola A, Planas R, Vargas V, Marco F, Almela M, Forné M, Miranda ML, Llach J, Salmerón JM. Norfloxacin prevents spontaneous bacterial peritonitis recurrence in cirrhosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology.* 1990 Oct; 12(4 Pt 1):716-24.

Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, Theelen B, van der Vlist M, Boekhout T, Geijtenbeek TB. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1 β via a noncanonical caspase-8 inflammasome. *Nat Immunol.* 2012 Jan 22; 13(3):246-54.

Hattori S, Dhar DK, Hara N, Tonomoto Y, Onoda T, Ono T, Yamanoi A, Tachibana M, Tsuchiya M, Nagasue N. FR-167653, a selective p38 MAPK inhibitor, exerts salutary effect on liver cirrhosis through downregulation of Runx2. *Lab Invest* 2007; 87(6): 591-601.

Haudek KC, Spronk KJ, Voss PG, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb; 1800 (2):181-9. Review.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003 Aug 15; 374(Pt 1):1-20. Review.

Heller J, Sogni P, Barrière E, Tazi KA, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, Bories PN, Poirel O, Moreau R, Lebrech D. Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33:376–81.

Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar; 103 (13): 5060-5.

Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev.* 2009 Jul; 230(1):160-71. Review.

Heymann F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8(4): 307-318.

Bibliografía

Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J, Hattori K, Tomiyama Y, Raz A, Kubo T. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec; 6(12):4635-40.

Hoque R, Vodovotz Y, Mehal W. Therapeutic strategies in inflammasome mediated diseases of the liver. *J Hepatol.* 2013 May; 58(5):1047-52.

Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 1999 May 17; 81(4):519-26.

Imler JL, Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* 2001 Jul; 11(7):304-11. Review.

Inamura T, Miura S, Tsuzuki Y, Hara Y, Hokari R, Ogawa T, Teramoto K, Watanabe C, Kobayashi H, Nagata H, Ishii H. Alteration of intestinal intraepithelial lymphocytes and increased bacterial translocation in a murine model of cirrhosis. *Immunol Lett.* 2003 Nov 15; 90(1):3-11.

Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ.* 2003 Jul; 327(7407):143-7. Review.

Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 989–96.

Ivashkiv LB. Inflammatory signaling in macrophages: transitions from acute to tolerant and alternative activation states. *Eur J Immunol* 2011; 41(9): 2477-2481.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.

Jiang JX, Chen X, Hsu DK, Baghy K, Serizawa N, Scott F, Takada Y, Takada Y, Fukada H, Chen J, Devaraj S, Adamson R, Liu FT, Török NJ. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Feb 15; 302(4):G439-46.

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 2005; 175:3463–8.

Jouault T, El Abed-El Behi M, Martínez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, Chamaillard M, Trottein F, Poulain D. Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol.* 2006 Oct 1; 177(7):4679-87.

Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B, Poulain D. Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 2009; 11(7): 1007-1015.

Karin M. Inflammation-activated protein kinases as targets for drug development. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2(4): 386-390.

Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):637-50. Review.

Kim K, Mayer EP, Nachtigal M. Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Jun 17; 1641(1):13-23.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 1995;86:1243–54.

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:709-60. Review.

Bibliografia

Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG. Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol.* 2006 Oct 1;177(7):4718-26.

Kuiper JJ, De Man RA, Van Buuren HR. Management of ascites and associated complications in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Dec;26 Suppl 2:183-93. Review.

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat.Rev.Immunol.* 2013 Jun; 13 (6): 397-411.

Lederer SL, Walters KA, Proll S, Paeper B, Robinzon S, Boix L, Fausto N, Bruix J, Katze MG. Distinct cellular responses differentiating alcohol- and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Virology* 2006; 3: 98.

Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Marechal R, Degre D, Demetter P, de NP, Geerts A, Quertinmont E, Vercruyse V, Le MO, Deviere J. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 49(2): 646-657.

Leyva FJ, Anzinger JJ, McCoy JP Jr, Kruth HS. Evaluation of transduction efficiency in macrophage colony-stimulating factor differentiated human macrophages using HIV-1 based lentiviral vectors. *BMC Biotechnol.* 2011 Jan 31; 11:13.

Li WY, Jiang YF, Jin QL, Zhang H, Feng XW, Niu JQ. Immunologic characterization of posthepatitis cirrhosis caused by HBV and HCV infection. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 138237.

Lin CY, Tsai IF, Ho YP, Huang CT, Lin YC, Lin CJ, Tseng SC, Lin WP, Chen WT, Sheen IS. Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2007; 46(5): 816-826.

Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol.* 1995 Oct;147(4):1016-28.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method. *Methods.* 2001 Dec; 25(4):402-8.

Lorenzo-Zúñiga V, Bartolí R, Planas R, Hofmann AF, Viñado B, Hagey LR, Hernández JM, Mañé J, Alvarez MA, Ausina V, Gassull MA. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats. *Hepatology.* 2003 Mar; 37(3):551-7.

Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K, Demols A, Goldman M, Le Moine O, Geerts A, Devière J. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology.* 1998; 28:1607–15.

Lukey PT, Perry HC, Yang S, Parry S, Dickson MC, Norris VH, Russell PG, Watissée M, Rioja I, Ray KP, Crowe S, Binks M. Single doses of p38 MAP kinase inhibitors or prednisolone affect CRP and IL-6 in patients with active Rheumatoid Arthritis (RA). *Open Journal of Immunology.* 2012, Vol.2, No.3, 85-97

MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, Sethi T. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol.* 2008 Feb;180(4):2650-8.

Maess MB, Buers I, Robenek H, Lorkowski S. Improved protocol for efficient nonviral transfection of premature THP-1 macrophages. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011 May 1; 2011(5):pdb.prot5612.

Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol.* 2009 Jun;50(6):1258-66. Review

Bibliografía

Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.* 2005 Aug; 6(8):777-84.

Martin-Llahi M, Guevara M, Torre A, Fagundes C, Restuccia T, Gilabert R, Solá E, Pereira G, Marinelli M, Pavesi M, Fernández J, Rodés J, Arroyo V, Ginès P. Prognostic importance of the cause of renal failure in patients with cirrhosis. *Gastroenterology.* 2011 Feb; 140.(2): 488-96.

Mas VR, Fassnacht R, Archer KJ, Maluf D. Molecular mechanisms involved in the interaction effects of alcohol and hepatitis C virus in liver cirrhosis. *Mol Med* 2010; 16(7-8): 287-297.

Mascanfroni ID, Cerliani JP, Dergan-Dylon S, Croci DO, Ilarregui JM, Rabinovich GA. Endogenous lectins shape the function of dendritic cells and tailor adaptive immunity: mechanisms and biomedical applications. *Int Immunopharmacol.* 2011 Jul; 11(7):833-41. Review.

Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 693-9.

McClain CJ, Song Z, Barve SS, Hill DB, Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(3): G497-G502.

Miller AM, Horiguchi N, Jeong WI, Radaeva S, Gao B. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35(5): 787-793.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16; 65(1-2):55-63.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(12): 958-969.

Mozer-Lisewska I, Sluzewski W, Kaczmarek M, Jenek R, Szczepanski M, Figlerowicz M, Kowala-Piaskowska A, Zeromski J. Tissue localization of Toll-like receptors in biopsy specimens of liver from children infected with hepatitis C virus. *Scand J Immunol* 2005; 62(4): 407-412.

Muñoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledó L, Monserrat J, Sanz E, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology*. 2005 Aug; 42(2):411-9.

Neil S, Martin F, Ikeda Y, Collins M. Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes. *J Virol*. 2001 Jun; 75(12):5448-56.

Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009 Mar; 113 (10): 2324-35.

Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*. 2013 Mar 15; 93(6):875-8.

Osna NA. Hepatitis C virus and ethanol alter antigen presentation in liver cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15(10): 1201-1208.

Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012; 5(Suppl 1): S26.

Bibliográfia

Pengal RA, Ganesan LP, Wei G, Fang H, Ostrowski MC, Tridandapani S. Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt. *Mol Immunol* 2006; 43(10): 1557-1564.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan; 8(1):49-62.

Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, Barrieau M, Min SY, Kurt-Jones EA, Szabo G. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J.Clin.Invest.* 2012 Oct; 122 (10): 3476-89.

Pietrella D, Bistoni G, Corbucci C, Perito S, Vecchiarelli A. *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2006 Apr; 8(4):602-12.

Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci.* 2008 Feb 1, 121; 249-253.

Poulain, D, Jouault, T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004, **7**: 1-8.

Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH, Jang MK, Guenther ND, Mederacke I, Friedman R, Dragomir AC, Aloman C, Schwabe RF. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2013 Oct; 58(4):1461-1473.

Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60:646.

Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol.* 2002 May; 71(5):741-52.

Ramachandran P, Iredale JP. Macrophages: Central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *J. Hepatol.* 2012 Jun; 56, 6: 1417-1419.

Ramachandran P, Iredale JP. Macrophages: central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *J Hepatol* 2012; 56(6): 1417-1419.

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273:117–23.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004 Mar 15;117 (Pt 8) :1281-3.

Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune.* Tercera edición, 2004.

Ribera J, Pauta M, Melgar-Lesmes P, Tugues S, Fernandez-Varo G, Held KF, Soria G, Tudela R, Planas AM, Fernandez-Hernando C, Arroyo V, Jimenez W, Morales-Ruiz M. Increased nitric oxide production in lymphatic endothelial cells causes impairment of lymphatic drainage in cirrhotic rats. *Gut* 2012.

Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology.* 1984 Jan-Feb; 4(1):53-8.

Riordan SM, Williams R. The intestinal flora and bacterial infections in cirrhosis. *J Hepatol.* 2006; 45:744–57.

Roberts TL, Dunn JA, Terry TD, Jennings MP, Hume DA, Sweet MJ, Stacey KJ. Differences in macrophage activation by bacterial DNA and CpG-containing oligonucleotides. *J Immunol* 2005; 175:3569–76.

Bibliografia

Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988; 95:1351–5.

Runyon BA. Paracentesis of ascitic fluid: a safe procedure. *Arch Intern Med* 1986; 146:2259–61.

Runyon BA. Patients with deficient ascitic fluid opsonic activity are predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1988; 8:632–5.

Sale EM, Sale GJ. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jan; 65(1):113-27.

Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest.* 2003 Aug; 112 (3):389-97.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011; May;1813(5):878-88. Review

Schnoor M, Buers I, Sietmann A, Brodde MF, Hofnagel O, Robenek H, Lorkowski S. Efficient non-viral transfection of THP-1 cells. *J Immunol Methods.* 2009 May 31; 344(2):109-15.

Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; 48(1): 322-335.

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 421-452.

Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol.* 2007 Jan; 12; 8:1.

Simera I, Moher D, Hoey J, Schulz KF, Altman DG. A catalogue of reporting guidelines for health research. *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 35–53.

Smith SJ, Fenwick PS, Nicholson AG, Kirschenbaum F, Finney-Hayward TK, Higgins LS, Giembycz MA, Barnes PJ, Donnelly LE. Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *Br J Pharmacol* 2006; 149(4): 393-404.

Song S, Ji B, Ramachandran V, Wang H, Hafley M, Logsdon C, Bresalier RS. Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *PLoS One*. 2012;7(8):e42699.

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol* 1997; 27(7): 1671-1679.

Sreenarasimhaiah J, Jaramillo A, Crippin J, Lisker-Melman M, Chapman WC, Mohanakumar T. Lack of optimal T-cell reactivity against the hepatitis C virus is associated with the development of fibrosis/cirrhosis during chronic hepatitis. *Hum Immunol* 2003; 64(2): 224-230.

Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; 36:135–41.

Such J, Guardiola JV, De Juan J, Casellas JA, Pascual S, Aparicio JR, Solá-Vera J, Pérez-Mateo M. Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Apr;14(4):371-6.

Such J, Guarner C, Enriquez J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F. Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988; 6:80–4.

Bibliografía

Such J, Hillebrand DJ, Guarner C, Berk L, Zapater P, Westengard J, Peralta C, Soriano G, Pappas J, Francés R, Muñoz C, Runyon BA. Nitric oxide in ascitic fluid is an independent predictor of the development of renal impairment in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16:571–7.

Such J, Hillebrand DJ, Guarner C, Berk L, Zapater P, Westengard J Peralta C, Soriano G, Pappas J, Runyon BA. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and nitric oxide in sterile ascitic fluid and serum from patients with cirrhosis who subsequently develop ascitic fluid infection. *Dig Dis Sci* 2001; 46:2360–6.

Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Clin Infect Dis* 1998; 27:669–74.

Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J.Hepatol.* 2012 Sep; 57(3): 642-54.

Tayal V, Kalra BS. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jan 28; 579(1-3):1-12. Review.

Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells.* 2006 Oct; 24(10):2292-8.

Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.* 2008 Feb; 172(2):545-53.

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy *Nat. Rev. Genet.*, 4 (2003), p. 346

Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of receptor p55circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994 Jan 1; 83(1):113-8.

Tudhope SJ, Finney-Hayward TK, Nicholson AG, Mayer RJ, Barnette MS, Barnes PJ, Donnelly LE. Different mitogen-activated protein kinase-dependent cytokine responses in cells of the monocyte lineage. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:306–12.

Turchyn LR, Baginski TJ, Renkiewicz RR, Lesch CA, Mobley JL. Phenotypic and functional analysis of murine resident and induced peritoneal macrophages. *Comp. Med.* 2007; 57:574–80.

Uchimura Y, Sata M, Kage M, Abe H, Tanikawa K. A histopathological study of alcoholics with chronic HCV infection: comparison with chronic hepatitis C and alcoholic liver disease. *Liver* 1995; 15(6): 300-306.

Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology.* 1997 Oct;113(4):1246-57.

Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Jun; 7(6):424-38.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Reviews* 2002; 2:489-501.

Wang B, Cleary PP, Xu H, Li JD. Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable Haemophilus influenzae via p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Infect Immun* 2003; 71(10): 5523-5530.

Wendling D, Racadot E, Wijdenes J. Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody. *J Rheumatol* 1993; 20:259–62.

Bibliografía

Wise M, Bialek S, Finelli L, Bell B P, Sorvillo F. Changing trends in hepatitis C-related mortality in the United States, 1995-2004. *Hepatology* 2008; 47(4): 1128-1135.

Zapater P, Frances R, Gonzalez-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, Montoliu S, Vila C, Escudero A, Torras X, Cirera I, Llanos L, Guarner-Argente C, Palazón JM, Carnicer F, Bellot P, Guarner C, Planas R, Solá R, Serra MA, Muñoz C, Pérez-Mateo M, Such J. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008; 48:1924–31.

Zhang M, Schekman R. Cell biology. Unconventional secretion, unconventional solutions. 2013 May 3; 340(6132):559-61.

Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol.* 2008 Jan; 214(2):161-78.

Zhou Y, Huang QH. Exploration of the variance in exogenous gene expression driven by the different promoters in leukemia cells. *Yi Chuan.* 2011 Aug; 33(8):879-85.

Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One* 2011; 6(6): e21381.

Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, Tischendorf JJ, Luedde T, Weiskirchen R, Trautwein C, Tacke F. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* 2010; 5(6): e11049.

Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol.* 2012 Oct 19; 3:56.



PhD THESIS SUMMARY

Study of the inflammatory profile of peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. Potential therapeutic targets.

PhD Student: Ana Tapia Abellán

Address: Department of biochemistry, Molecular Biology and Immunology.
School of Medicine, University of Murcia.
Campus de Espinardo. Murcia, SPAIN

Advisor: Prof. María Concepción Martínez-Esparza Alvargonzález.

Advisor during external stay: Prof. Thierry Jouault.

INTRODUCTION

Hepatic cirrhosis is a liver disease caused in 80 % by viral infections such as hepatitis C virus or excessive alcohol consumption. Several complications appeared during the disease progression, due to the structural changes of the liver and the portal hypertension generated. The most characteristic complication of hepatic cirrhosis is ascites, which consist in an accumulation of fluid in the peritoneal cavity. The presence of ascitic fluid constitutes an additional problem because it can be infected by a phenomenon known as bacterial translocation. This idea suggests that gut bacteria can go through the intestine wall to the mesenteric lymph nodes and other organs reaching to the ascitic fluid and then develop spontaneous bacterial peritonitis.

Liver cirrhosis is an end stage hepatic derangement characterized by a progressive replacement of the functional hepatic architecture by non-functional fibrotic tissue. The innate immune system implication in the pathogenesis of liver cirrhosis has been largely described. In this respect, chronic hepatic inflammation and fibrosis are the key features associated with macrophage accumulation in the liver. These cells are involved in many of the pathophysiological events associated with cirrhosis, so they are good candidates to be current targets for anti-inflammatory therapy intended to avoid progression of liver damage.

Macrophages have important pleiotropic function as phagocytic, immune-regulatory and antigen-presenting cells, and are able to produce a large number of inflammatory factors such as cytokines and reactive oxygen species. These cells present a remarkable plasticity which allows them to change the phenotype and physiology to efficiently respond depending on the environmental signals. They are subdivided in three groups attending to their biological function: classically activated macrophages (M1), wound-healing macrophages (M2a) and regulatory macrophages (M2b).

Cirrhosis is associated with increased hepatic and systemic inflammatory mediators, including pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , as well as anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β that are produced by these macrophage populations. Also, monocyte-macrophage lineage produce another protein called as GAL-3, a multifaceted protein that may regulate inflammatory responses through its function on cell activation, cell migration and regulation of apoptosis in immune cells.

Macrophages are able to recognize pathogens and endogenous danger signals through several receptors, which trigger the activation of intracellular signaling

pathways leading to the macrophage activation which induces cytokine secretion. Inflammation is implicated in most of the chronic diseases and huge efforts and resources are dedicated to quest of new targets for the development of anti-inflammatory drugs. Considerable attention has been given to molecules involved in intracellular signaling pathways, such as MAPK as likely targets for the development of novel anti-inflammatory therapeutics.

A fuller understanding of the molecular mechanism of macrophage activation in the hepatic cirrhosis pathologic scenario is clearly desirable to delineate novel targets for pharmaceutical intervention to prevent hepatic damage.

AIMS

1. Analyze the activation state of peritoneal macrophages obtained from an unexplored and pathological scene, the ascites from patients with decompensated hepatic cirrhosis.
2. Identify functional differences in the inflammatory profile of macrophages from patients with cirrhosis and ascites with different etiology (ALC or HCV).
3. Explore the relative importance of MAPKs and PI3K-Akt pathways in the release of pro- and anti-inflammatory cytokines in these ascites macrophages from cirrhotic patients.
4. Study the GAL-3 expression profile in ascites macrophages from cirrhotic patients and compare with a reference population derived from healthy blood monocytes.
5. Generate a GAL-3 overexpression model to study its function in macrophages, using lentivirus to transduce human cell lines.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Patients.

Cirrhosis was diagnosed by histology or by clinical, laboratory, and/or ultrasonographic findings. Exclusion criteria were: patients with detectable levels of LPS in ascites (AF), presence of a positive blood or AF culture, an ascites PMN count equal or higher than 250/ μ l (Albillos et al., 1990), signs or symptoms of systemic inflammatory response syndrome (Rangel-Frausto et al., 1995), upper gastrointestinal bleeding, hepatocellular carcinoma fulfilling Milan criteria (Mazzaferro et al., 1996)

and/or portal thrombosis, previous liver transplantation, transjugular intrahepatic portosystemic shunt, norfloxacin treatment as prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis, age older than 80 or younger than 18, etiology other than chronic alcohol intake or HCV chronic infection and refusal to participate in the study.

Blood and AF samples.

Peripheral blood and AF were collected from 61 patients with cirrhosis. A large-volume paracentesis was performed on all patients at admission in aseptic conditions following the usual procedures to obtain AF (Runyon, 1986). All patients received intravenous albumin after paracentesis (8 g/L of AF) as routine protocol, if the volume of AF evacuated was greater than 5 L. Samples for routine biochemical study and PMN count were obtained. Total protein, albumin, leukocyte and PMN counts were performed in all AF specimens. Both blood and AF were inoculated at bedside in aerobic and anaerobic blood culture bottles, 10 mL each (Runyon et al., 1988).

Flow cytometry analysis.

Cells from AF were stained with monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry to determine cell types. Antibodies were mouse anti-human CD14-FITC (eBioscience, USA), CD3-FITC, CD19-PE Cy5, CD14-PE and CD16-PE Cy5, CD54-PE, CD86-PE, HLA-DR-FITC (BD-Pharmingen, USA). Mouse IgG1-PE, mouse IgG1-FITC, mouse IgG1-PE Cy5, mouse IgG2b-FITC and mouse IgG2b-PE antibodies were used as isotype controls all from BD-Pharmingen. To GAL-3, indirect staining was done with rat anti-human GAL-3 (hybridoma TIB 166) and as a secondary antibody chicken anti-rat IgG Alexa Fluor 488 nm. In brief, 0.3×10^6 cells/condition in a volume of 100 μ l were stained with 5 μ l of the corresponding monoclonal antibodies and incubated in the dark on ice fixed in solution p (Becton Dickinson, USA) and then washed, resuspended in PBS and kept at 4°C in the dark until data acquisition. When the staining was indirect we used 1 μ l of secondary antibody.

Flow cytometry analyses were performed on three-color fluorescence Epics XL (Beckman Coulter) using Cytomics RXP analysis software. At least 50,000-100,000 gated events/conditions were acquired and analyzed. Leukocytes were gated based on FCS vs SSC (Forward vs Side Scatter) on a lineal scale. Then, leukocyte subpopulations were gated on the base of morphology and CD14⁺ expression for peritoneal M-DM, CD3⁺ expression for T lymphocytes, CD19⁺ expression for B lymphocytes and CD3⁻CD14⁻CD19⁻CD16⁺ expression for NK cells.

Isolation and stimulation of M-DM.

Ascites samples were centrifuged at 1500 rpm and cells were collected, washed in PBS, and then resuspended in DMEM (GIBCO Invitrogen, UK). Cells from ascites were stained with mouse anti-human CD14-FITC (eBioscience, CA) antibody, and mouse IgG1-FITC antibody was used as isotype control (BD-Pharmingen). Flow cytometry analyses were performed to determine percentage of CD14⁺ cells in the ascites. Cells were then seeded for panning at a ratio of 0.2×10^6 M-DM/well in 96-well plates for ELISA, or $1-2 \times 10^6$ M-DM/well in 6-well plates for immunoblotting or mRNA extraction, according to the percentage of CD14⁺ cells in the sample. After an overnight incubation at 37° C in DMEM containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (CCM), cells were washed with CCM to eliminate non-adhered cells, including lymphocytes. The purity of the M-DM in cell culture was more than 95%. Then M-DM were treated directly with 0.1 µg/ml LPS (*E coli* serotype 0111.B4, Sigma Aldrich Co, USA) or heat-killed *C. albicans* SC5314 strain at ratio 1/5 cell/yeasts, and a synthetic ODNs (PD-ODN or PS-ODN) at 1 µg/ml presenting the following sequence 5' TGA CTG TGA ACG TTC GAG ATG A 3' (Trilink Biotechnologies, USA). After 24 h of incubation cell culture supernatants were collected for cytokine detection, or maintained for 3 h in serum starvation conditions and treated for 15 min with 5 µg/ml LPS or heat-killed *C. albicans* at ratio 1/5 cell/yeasts for immunoblotting analysis of cell lysates. When needed, the cells were treated with 50 µM of intracellular signaling inhibitors 30 min before stimulation. The intracellular signaling inhibitors, PD98059 (MEK1 inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor), and Ly294002 (PI3K inhibitor) were obtained from Sigma Aldrich Co, USA.

Blood from 20 healthy donors was collected to obtain control M-DM, diluted with sterile PBS and layered in tubes containing Ficoll (Axis-Shield PoC As, Norway). Lympho/monocytes fractions were collected and washed with DMEM. Before seeding for panning, the percentage of monocytes present in the lympho/monocyte fraction was determined by flow cytometry. Cells were seeded for 24 h and then treated as described above for ELISA, mRNA extraction and immunoblotting tests.

Human cellular lines: THP-1, HL-60 and U937 were culture in suspension at 37° C in RPMI medium containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (CCM). PMA was used at 10 ng/ml for 24 h to differentiated the cells into M-DM.

HEK293T cells were cultured in CCM at 37 °C 10 % CO₂ in 10 cm diameter plates to develop transfection assays.

When needed, cell viability was measured in triplicate by MTT assay (Mossman, 1983). Briefly, 50 µL of MTT (2 mg/mL) in MCC was added to each well and incubated at 37°C for 4 h. The formed formazan crystals were solubilized in 100 µL isopropanol, 0.04 N HCl, 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich Co, USA), and then measured the absorbance at 550 nm using a micro-plate reader and corrected at 690 nm.

Cellular lysates and Immunoblotting.

Protein extracts were obtained and treated as described elsewhere. Primary antibodies against phosphorylated ERK1/2 (Thr202/Tyr204), phosphorylated p65 NF-κB (Ser 536) phosphorylated ATF-2 (Thr71), phosphorylated c-Jun (Ser63), phosphorylated protein kinase B (PKB)-Akt (Ser473), phosphorylated p38 MAPK (Thr180/Tyr182), and their correspondent totals (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), and IL-1β, GAL-3 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), caspase-1 (Invitrogen Co, USA) and β-actin (Sigma Aldrich Co, USA) were used before incubation with the corresponding peroxidase-conjugated secondary antibody. The activity of membrane-bound peroxidase was detected by using an enhanced chemiluminescent detection method (Enhanced ChemiLuminescence system, (©Amersham Pharmacia Biotech, USA). Protein bands were quantified by densitometry using Scion Image software and expressed relative to β-actin.

Enzyme-linked immunosorbent assays

AF and cell culture supernatants were assayed by ELISA kits for TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 and IL-12. The assay was performed in triplicate following the manufacturer's instructions (©R&D Systems Inc., USA; eBioscience, USA). The absorbance in each well was measured with a microplate reader at 450 nm and corrected at 570 nm.

mRNA expression analysis.

Total cellular RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). The cDNA was reverse transcribed from 1 µg total RNA using “first strand reverse transcription kit” (Invitrogen Co, USA). qRT-PCR was carried out by using SYBR green master mix on 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) and specific primer sets. Amplification reactions were performed under the following

conditions: 10 min 95° C, 40 cycles for 15 s at 95° C and 1 min at 60° C. Each sample was run in triplicate and normalized to *GAPDH*. The specificity of primers was confirmed by melt curve analysis. Data were collected and analyzed using the software 7500 System SDS 1.4 (Applied Biosystems). Relative transcript levels were calculated using $\Delta\Delta C_t$ method. Primer sequences were as follows:

- *CASP1* forward primer, 5'-TTTCCGCAAGGTTTCGATTTTCA-3'
- *CASP1* reverse primer, 5'-GGCATCTGCGCTCTACCATC-3'
- *IL-1 β* forward primer, 5'-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3'
- *IL-1 β* reverse primer, 5'-GTCGGAGATTTCGTAGCTGGAT-3'
- *GAPDH* forward primer, 5'-CATGTTCCAATATGATTCCACC-3'
- *GAPDH* reverse primer, 5'-CCTGGAAGATGGTGATGG-3'
- *GAL-3.1* and *GAL-3.2* forward primer, 5'-GTGAAGCCCAATGCAAACAGA-3'
- *GAL-3.1* reverse primer, 5'-CCCAGTTATTATCCAGCTTTTGT-3'
- *GAL-3.2* reverse primer, 5'-AGTGAACATGAAACCTTTACACA-3'

To check transduction for *GAL-3*, primers were:

- *GAL-3* forward primer, 5'-GTGAAGCCCAATGCAAACAGA-3'
- *GAL-3* reverse primer, 5'-AGCGTGGGTAAAGTGGAAGG-3'

Lentiviral transduction.

Lentiviral transduction was done to overexpress *GAL-3* protein in human cellular lines. First, sequence of *GAL-3.1* was introduced in a lentiviral vector abbreviated as SEWP. HEK293T was used to produce complete virions (TUs) performing triple transfection with LipoD293 (Signagen Laboratories, USA) with the three lentiviral vectors, that encodes: SEWP vector encodes *GAL-3.1* sequence, HIV-pCMVDR8.91 vector encodes gag, pol, tat and rev genes and VSV-G pMD.G encodes the viral envelope. Once transfection was done TUs were recollected after 48 h of incubation at 37° C. Then, human cellular lines were seeded at a ratio of 0.1×10^6 cell/well in 24-well plates and transduced with 30, 100, or 300 μ L of TUs and were incubated for 48 h at 37° C, 5% CO₂.

Statistical analysis

Results are either reported as: median and interquartile range (IQR), graphically represented as box plots, where the top and bottom of the box are the 25th and 75th percentile (the lower and upper quartiles, respectively), and the band inside the box is

the 50th percentile (the median), the end of the whiskers represents the lowest datum still within 1.5 IQR of the lower quartile, and the highest datum still within 1.5 IQR of the upper quartile; or histograms representing mean \pm standard error of the mean SEM. Statistic differences were analyzed using Mann-Whitney U test and Wilcoxon signed-rank test. All reported p values are two-sided, and p values lower than 0.05 were considered to indicate statistical significance. All calculations were performed using the SPSS 19.0 software (Chicago, USA).

Reporting of the study conforms to STROBE and EQUATOR guidelines (Simera et al., 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Peritoneal macrophage priming in cirrhosis is related to ERK phosphorylation and IL-6 secretion.

Peritoneal macrophages in patients with cirrhosis and ascites showed at baseline: higher expression of HLA-DR, CD86 and CD54 (Fig. 1A); increased phosphorylated levels of ERK 1/2, PKB-Akt, and c-Jun (Fig 1B); and augmented IL-6 production, compared with donor's blood M-DM (1C).

A positive correlation was established between basal IL-6 levels and ERK phosphorylation in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis ($r=0.9$, $p=0.005$). Ascites M-DM responded differently to several bacterial products. Addition of LPS increased phosphorylation levels of all studied signaling intermediates (ERK, PKB-Akt, c-Jun, p38 MAPK, p65 NF- κ B) in higher extent than synthetic-oligodeoxynucleotides (PD-ODN or PS-ODN).

In conclusion, a sustained immune response is present in ascitic fluid of cirrhotic patients, where peritoneal macrophages remain in a chronic primed status, even in the temporal absence bacterial antigens. This would facilitate a fast response, probably controlled by IL-6, against subsequent events of bacterial translocation in liver chronic inflammation.

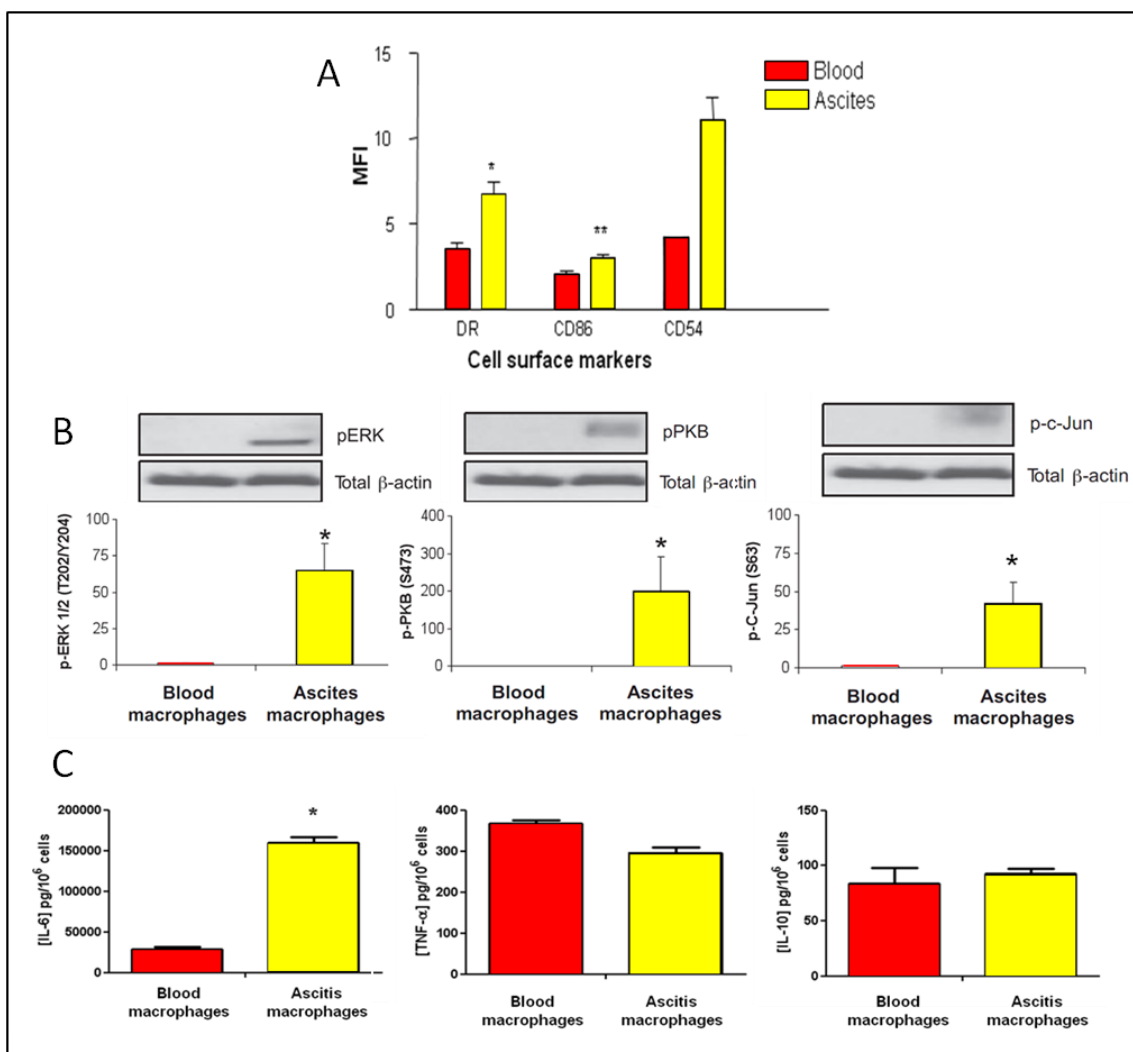


Fig.1. A) Expression of cell surface activation markers in peritoneal M-DM obtained from patients with advanced cirrhosis and in blood monocytes from donors. **B)** Representative immunoblots for phosphorylated ERK, PKB, c-Jun, in peritoneal M-DM *versus* blood monocytes at baseline. Immunoblots were quantified and the average \pm SEM ratios represented as histograms referred to phosphorylated levels at blood monocytes (normalized as 1). **C)** Secreted levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 in peritoneal and blood monocytes at baseline. Data are represented as average \pm SEM ratios. * P <0.05, ** P <0.01 compared with blood monocytes.

2. The peritoneal macrophage inflammatory profile in cirrhosis depends on the alcoholic or hepatitis C viral etiology and is related to ERK phosphorylation.

A different pattern of leukocyte migration to peritoneal cavity and differences in the primed status of macrophages in cirrhosis were observed depending on the viral or alcoholic etiology. Whereas no differences in peripheral blood cell subpopulations cell

populations could be observed, T lymphocyte, monocyte and polymorphonuclear cell populations in ascitic were more abundant in HCV than the alcohol etiology (Table I).

Cell type/mm ³	Etiology	
	ALC-C	HCV-C
PMNs	0.5 (4.4)	3.4 (7)*
M-DM	6.95 (12.6)	14.8 (19.9)*
T Lymphocytes	7.37 (12.6)	14.66 (22.6)*
B Lymphocytes	0.16 (0.5)	0.21 (0.3)
NK cells	1.22 (2.2)	2.01 (5.6)

*Results are expressed as median (IQR). Mann-Whitney U test: *p<0.05.*

HCV-related cirrhosis (HCV-C) was associated with a decreased inflammatory profile in ascitic compared with the alcoholic etiology (ALC-C). Higher levels of IL-10 and lower levels of IL-6 and IL-12 were observed in ascitic fluid from HCV group (Fig. 2A). Isolated peritoneal M-DM maintained their primed status *in vitro* throughout the 24h culture period in the presence or absence of stimulation. The level of ERK1/2 phosphorylation was higher in ALC peritoneal macrophages at baseline than in HCV patients, although the addition of LPS induced greater increase in ERK1/2 phosphorylation in HCV than in ALC patients (Fig 2B).

These results: 1) confirm and extend the positive correlation established between basal IL-6 levels and ERK phosphorylation in peritoneal M-DM from patients with cirrhosis; 2) they indicate that M-DM are “differently primed” by the *in vivo* pathophysiological environment and preserve their inflammatory differentiation profile for at least 24h, being more pro-inflammatory in the case of ALC-C. This “alert state” could provide an advantage for preventing the development of SBP in intermittent events of intestinal bacterial translocation in ALC-C patients; 3) they confirm the predominantly immune inhibited status of M-DM in the end-stages of HCV-induced hepatic damage compared with ALC-C, which may be intended to prevent immune-mediated decompensation; 4) the drop of significant differences in IL-10 levels with respect to M-DM concentration in ascites strongly suggests that other immune cells are contributing to the total amount of this anti-inflammatory cytokine in ascites of the HCV-C group, especially regulatory Th subpopulations. However, this does not mean that M-DM from HCV-C are functionally exhausted or endotoxin-tolerant, since they are able to further respond to stimulation by several PAMP agonists.

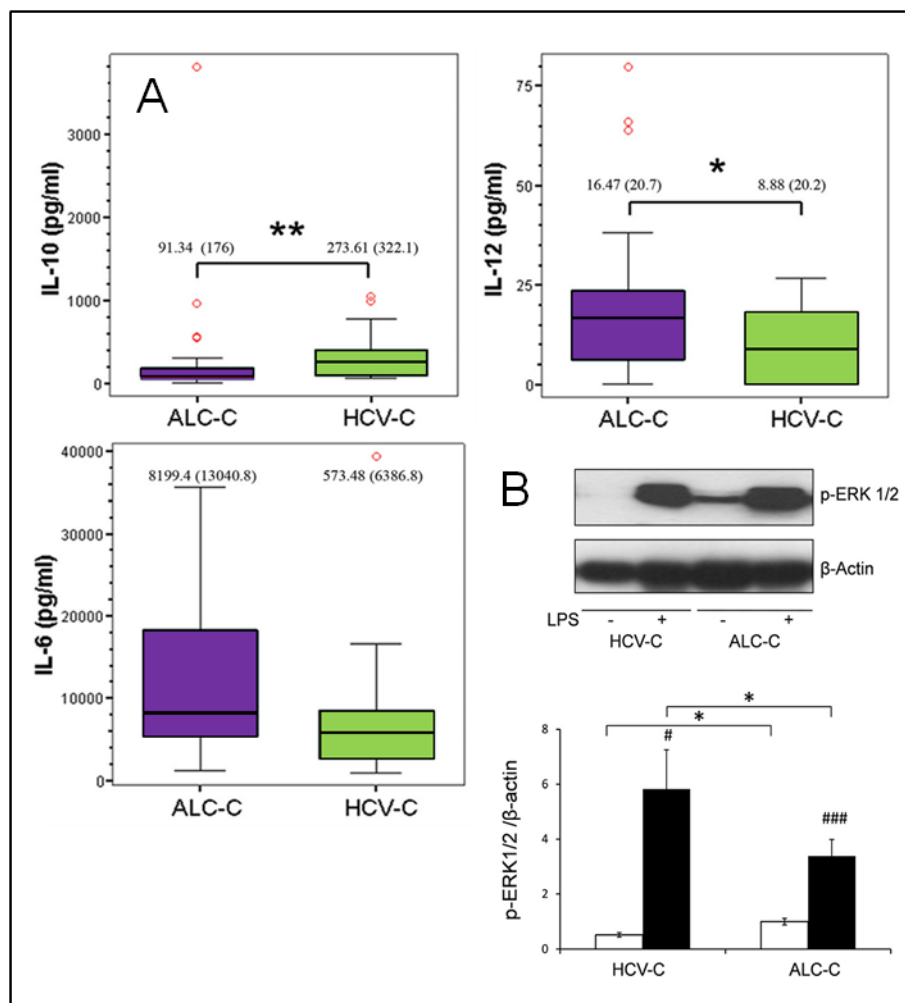


Fig.2 A) Levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in ascites from patients with HCV-C or ALC-C. Cytokine concentration was measured by ELISA in ascites from patients with HCV-C (n=15) or ALC-C (n=30). Results are expressed in pg/mL and represented as box plot. Circles out of the boxes correspond to outliers. The median and IQR (percentile 75-percentile 25) are indicated for each box. Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **B). ERK1/2 phosphorylation levels in M-DM from ascites of patients with HCV-C or ALC-C.** Representative immunoblots for p-ERK1/2 of peritoneal M-DM from patients with HCV-C (n=4) or ALC-C (n=12) at baseline and following LPS treatment. β -actin was measured as loading control. Immunoblots were quantified and the average \pm SEM ratios of phosphorylation are represented as bar graphs referred to β -actin. Wilcoxon signed-rank test: # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, between control (normalized as 1) and treatments. Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$, between ALC-C and HCV-C.

3. Role of MAP Kinases and PI3K-Akt on the cytokine inflammatory profile of peritoneal macrophages from ascites of cirrhotic patients.

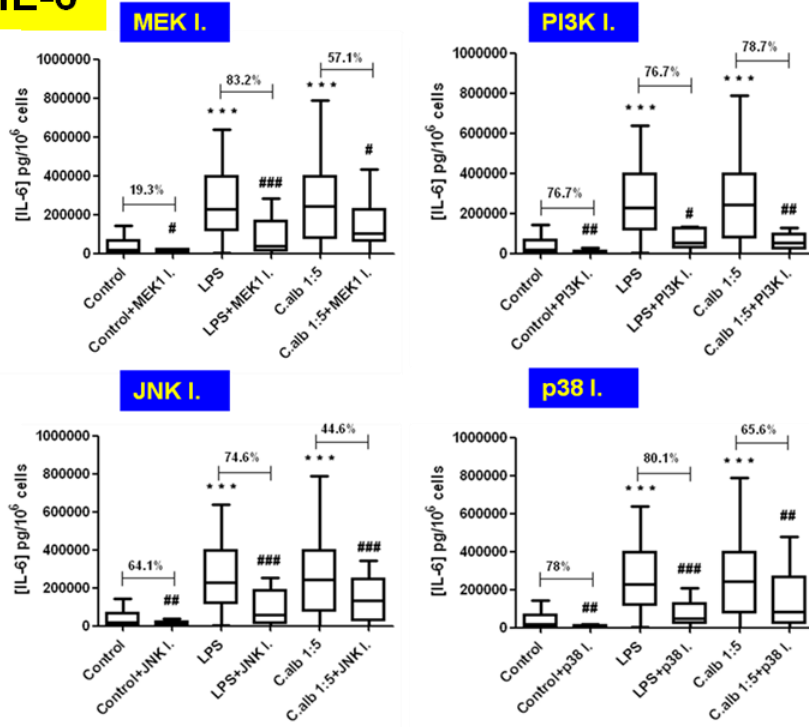
We found that the release of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α at baseline by peritoneal M-DM from ascites of cirrhotic patients, was more effectively reduced by the MAPK inhibitors, while the basal IL-10 anti-inflammatory cytokine secretion, was only and strongly (90.3%) affected by the PI3K inhibitor.

The incubation of peritoneal M-DM in the presence of LPS and *C. albicans* increased the release of IL-6, TNF- α , and IL-10 (Fig. 3). LPS-induced pro-inflammatory cytokines secretion was more sensitive to MAPK inhibitors, while that induced by *C. albicans* was more susceptible to inhibition of PI3K. Inhibition of PI3K almost completely suppressed the secretion of IL-10 in stimulated M-DM (Fig. 3).

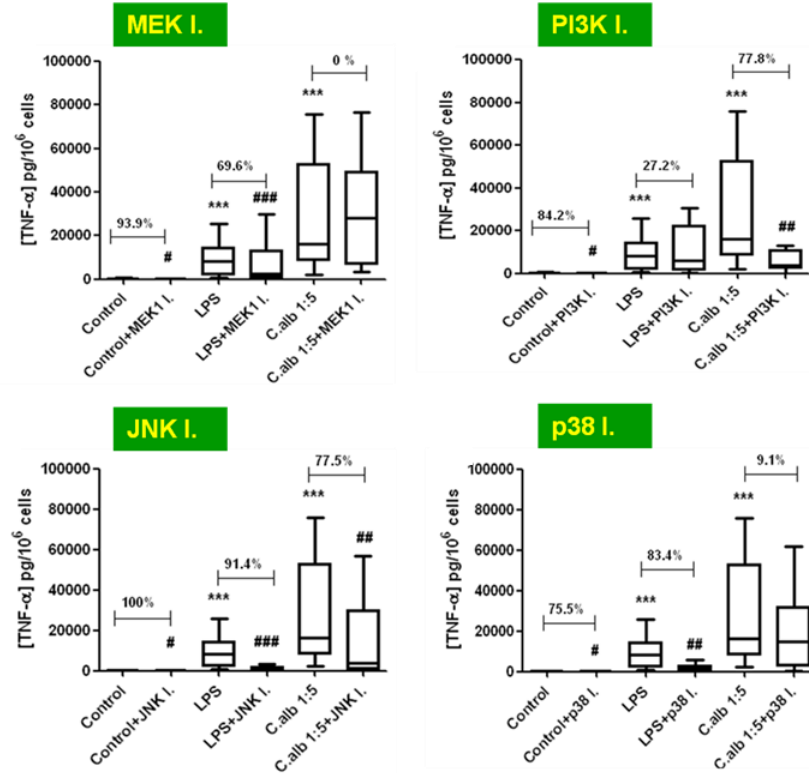
Inhibition of MEK1 and JNK, reduced the basal and stimulated IL-1 β secretion, while the p38 MAPK inhibitor had no effect on IL-1 β levels. On the contrary, inhibition of PI3K increased the secretion of IL-1 β in stimulated M-DM from cirrhotic patients (Fig. 3). The activating effect of PI3K inhibitor on IL-1 β release was mediated by the enhancement of the intracellular IL-1 β and caspase-1 content release to the extracellular medium and not by augmented IL-1 β or caspase-1 mRNA and protein expression levels (Fig. 4).

These results demonstrate that pro-inflammatory cytokines release in M-DM from this clinical setting strongly depends on the MAPK signaling pathways, differs depending on the microbial stimulus added, and confirms the prominent role of the PI3K-Akt pathway in the modulation of IL-10 mediated anti-inflammatory function. In this way, these data signal inhibitors of the MAPK pathway as potential therapeutic tools for pharmaceutical intervention to prevent hepatic damage reducing the inflammatory response associated to liver failure, in contrast with the effect of PI3K-Akt inhibitors that would enhance the inflammatory response, suppressing the secretion of IL-10 and increasing the IL-1 β release.

IL-6



TNF- α



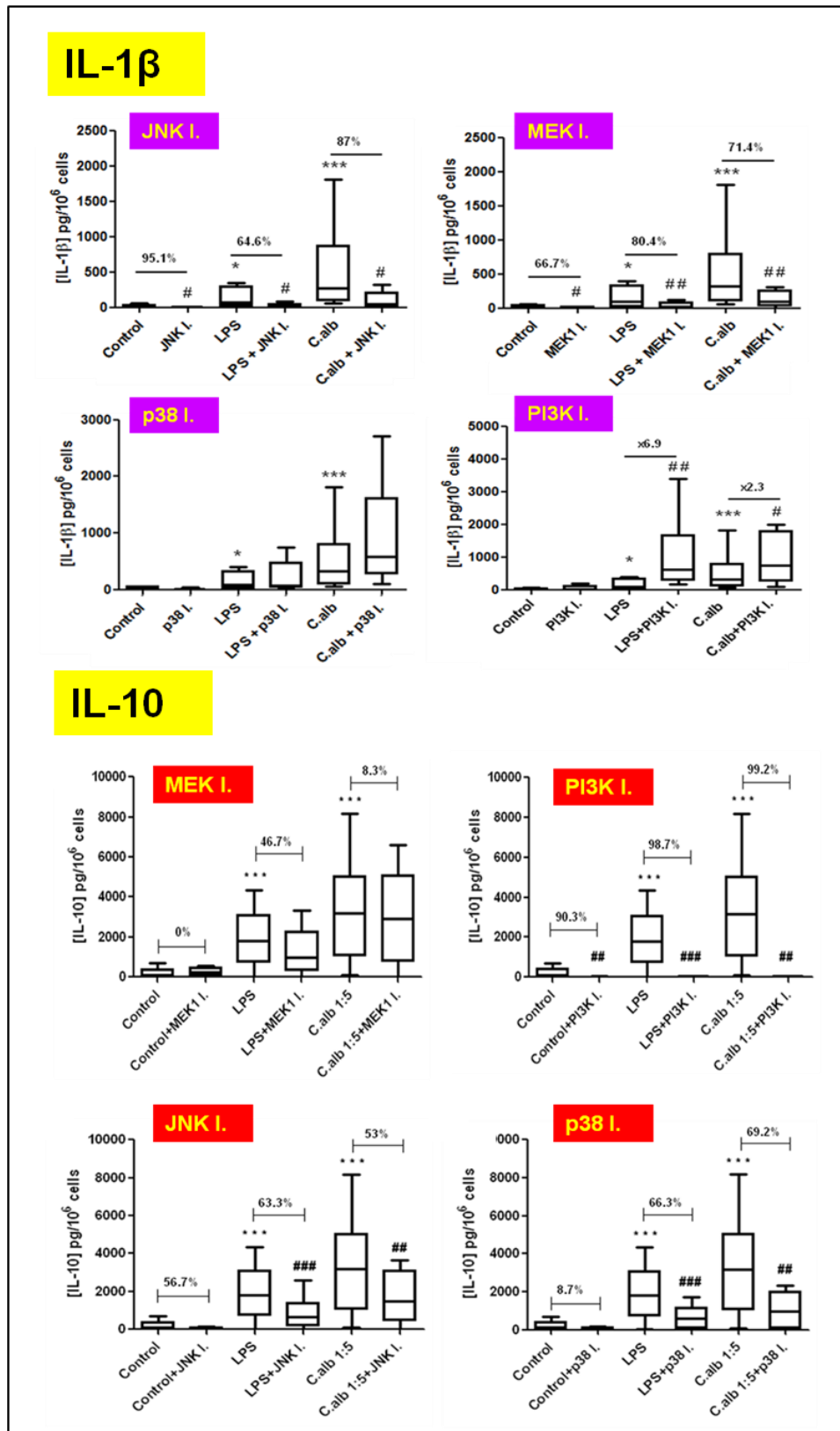


Fig. 3. Effect of cell signaling inhibitors on the, IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-10 release from peritoneal M-DM. Peritoneal M-DM from patients with cirrhosis and ascites were isolated and the IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-10 concentration was measured by ELISA in 24 h cell culture supernatants at baseline or following treatment with *C. albicans*, or LPS with or without co-treatment with the signaling inhibitors for MEK1, PI3K, JNK, and p38 MAPK. Results are expressed as pg cytokine/10⁶ cells and represented as box plot. Wilcoxon signed-rank test: *** p < 0.001 between control and LPS or *C. albicans*

treatments; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ between absence and presence of signaling inhibitors for each condition (resulting % of inhibition are indicated over the boxes).

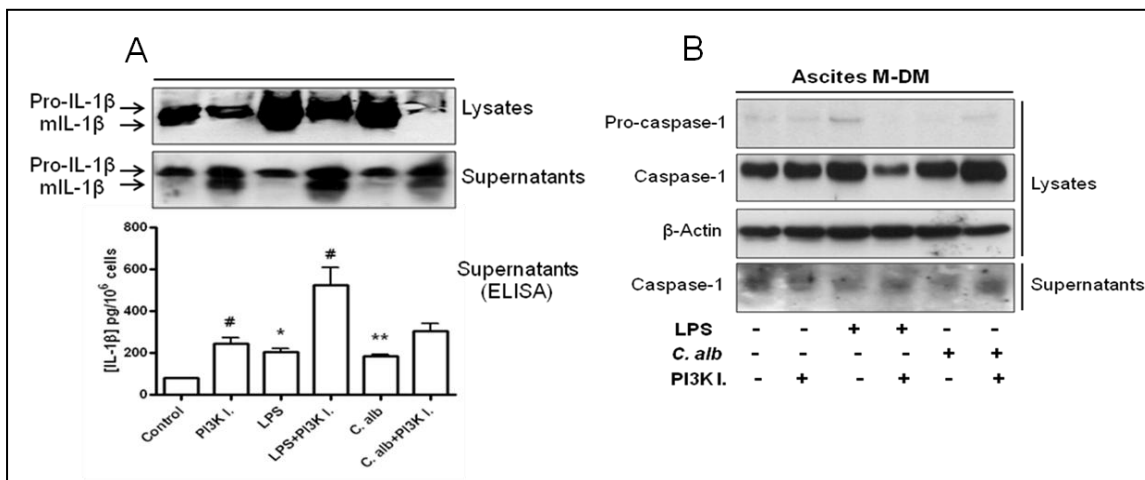


Fig. 4. IL-1 β and CASP1 protein expression in M-DM obtained from ascites. M-DM were isolated from patients with cirrhosis and ascites and stimulated for 24 h with LPS or heat-killed *C. albicans* in the presence or absence of the PI3K inhibitor (I.) Ly294002. IL-1 β ELISA quantification of the supernatant of M-DM from cirrhotic patients and a representative Western blot of lysates and cell culture supernatants for IL-1 β (A) and CASP-1 (B) are shown. β -actin was used as loading control. Wilcoxon signed-rank test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, between control and LPS or *C. albicans* treatments; # $p < 0.05$, between absence or presence of the PI3K I.

4. Galectin-3 in decompensated hepatic cirrhosis.

GAL-3 has recently become an attractive therapeutic target due to it modulates many immune reactions and affects various immune cells, particularly those of monocyte-macrophage lineage and a marked upregulation of its expression is detected in human cirrhotic liver.

M-DM from cirrhotic patients and M-DM from blood of healthy donors expressed two mRNA spliced variants of *LGALS3* gene (*GAL-3.1* and *GAL-3.2*), encoding the isoforms GAL-3.1 and GAL-3.2 respectively, being their baseline expression higher in M-DM blood population (Fig. 5A). In contrast, stimulation with LPS or *C.albicans* for 24 h increased *GAL-3.1* expression in M-DM from ascites whereas in blood M-DM it was decreased (Fig 5B).

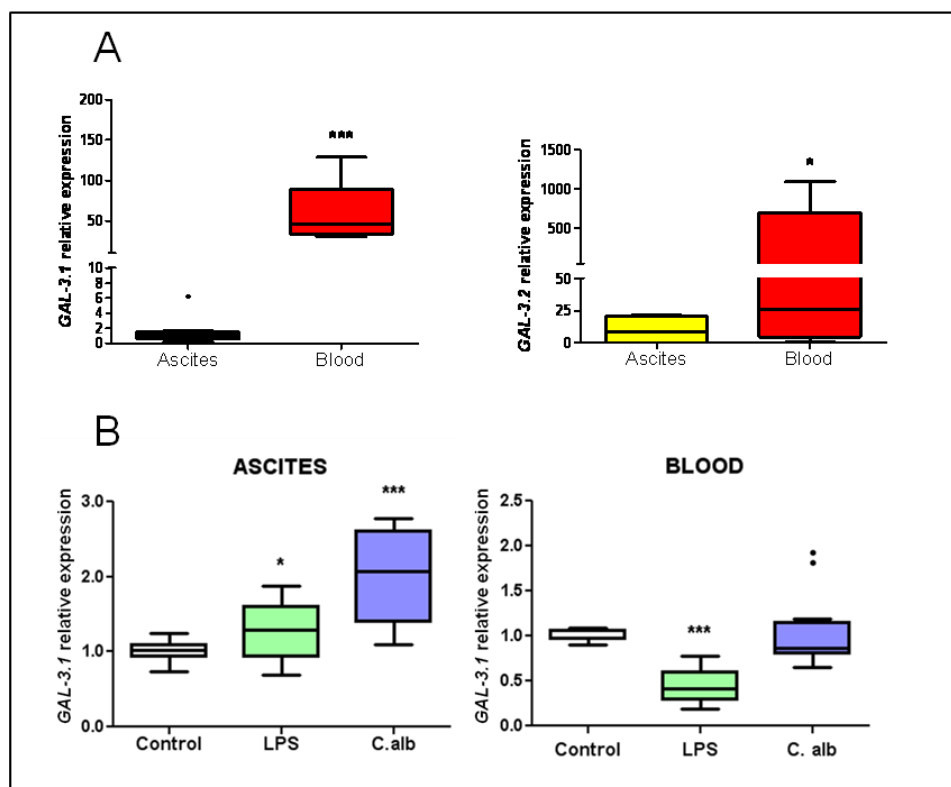


Fig. 5. Relative expression of *LGALS3* mRNA variants in ascites and blood M-DM. Total RNA were obtained from ascites (n=10) or healthy donors (n=5) M-DM and the *GAL-3.1* and *GAL-3.2* mRNA expression were analyzed by qRT-PCR and referred to the ascites M-DM expression (normalized as 1) at baseline (A) or after 24 h treatment with LPS or *C. albicans* and referred to their untreated controls (normalized as 1) (B). The assays were done by triplicate. Results are represented as box plot. Circles out of the boxes correspond to outliers. The median and IQR are indicated for each box. Mann-Whitney U test: * p < 0.05, *** p < 0.001.

Then, the GAL-3 protein expression correlated with results obtained for *LGALS3* mRNA expression (Fig 6 A and B).

These results showed for first time, expression and modulation in response to stimulation, of spliced mRNA variants of *LGALS3* gene in peritoneal M-DM from ascites of patients with decompensated cirrhosis. The differential gene and protein GAL-3 expression levels and behavior in response to stimulation related to M-DM from healthy donors, could be related to a polarization to a alternatively activated macrophage phenotype in that pathological scenario, involved in the fibrosis enhancement. Gaining further understanding of GAL-3 regulation and function in M-DM will set the basis to identify new molecular targets for the hepatic damage prevention controlling the inflammatory and fibrogenic response associated to liver cirrhosis.

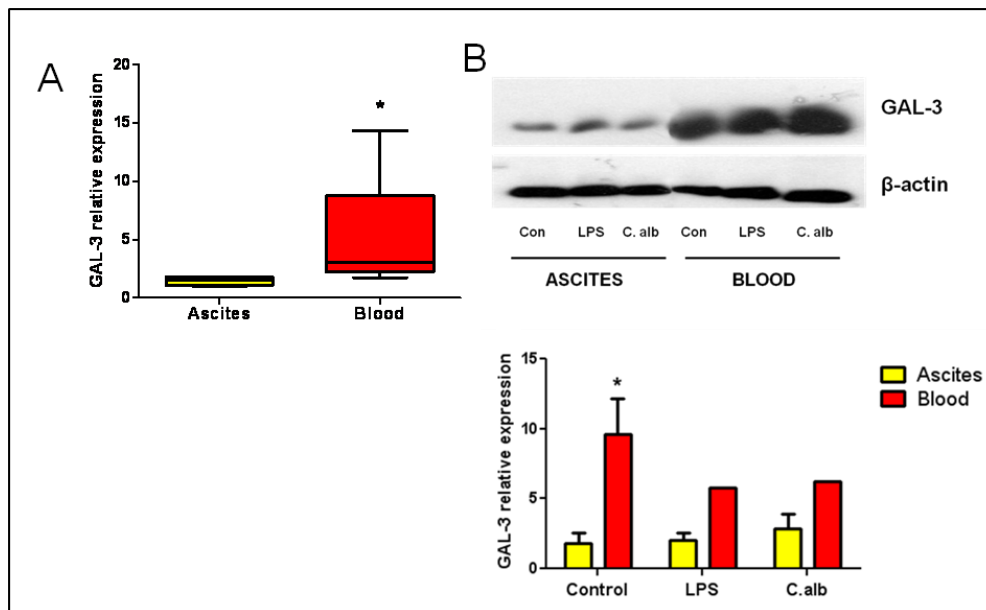


Fig. 6. Baseline and after treatment GAL-3 expression in ascites and healthy blood M-DM. A) Baseline GAL-3 expression levels was studied by Western blot in total protein extracts obtained from ascites (n=6) and blood donors (n=5) M-DM and referred to ascites M-DM expression (normalized as 1). Immunoblots were quantified and the median \pm IQR represented as box plot. B) GAL-3 protein expression in response to LPS or *C. albicans* stimulation in ascites and healthy blood M-DM. Representative immunoblot for GAL-3 expression after 24h treatment with LPS and *C. albicans* in ascites and blood M-DM (n=2). β -actin was used as loading control. Immunoblots were quantified, GAL-3 expression was normalized to β -actin and referred to ascites M-DM basal level (normalized as 1) and the average \pm SEM represented as histograms in arbitrary units. Mann-Whitney U test: * $p < 0.05$ between ascites and blood M-DM.

5. Searching for a model to study the role of GAL-3 in human macrophages.

To deep inside of the molecular mechanisms of GAL-3 role in human macrophages, we decide to develop an *in vitro* model with modified the *LGAS3* gene expression using lentiviral vectors that have the ability to mediate potent transduction in three myelocytic cellular lines (THP-1, HL-60 and U937). We analyzed and compared the efficiency of several transduction methods finding that the most effective was lentivirus transduction with SEWP vector with SFFV promoter.

We successfully transduced the THP-1, HL-60 and U937 cell lines with SEWP lentiviral vector containing *GAL-3.1* cDNA with SFFV promoter. THP-1 was the cell line with the highest baseline GAL-3 protein expression levels and the cell line with the highest number *GAL-3.1* cDNA copies integrated into its genome by lentiviral

transduction and therefore it exhibited the highest GAL-3 protein expression levels after transduction (Fig. 7).

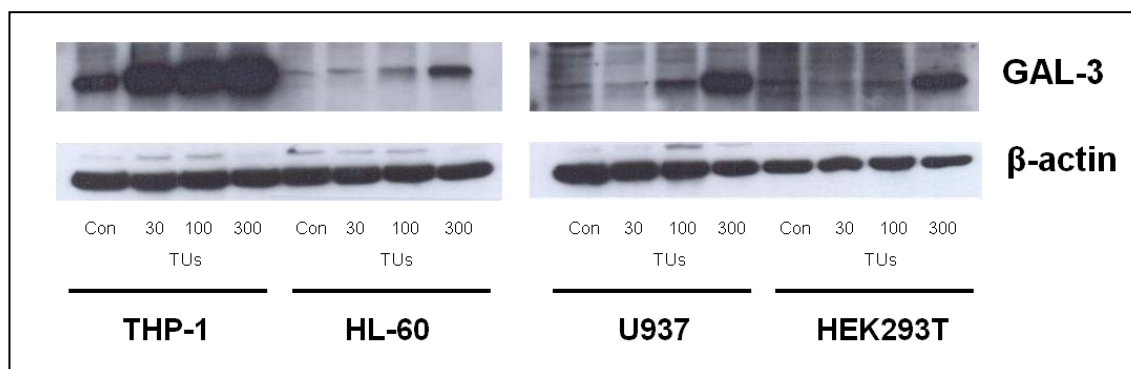


Fig. 7. Analysis of GAL-3 protein expression in myelocytic cell lines after lentiviral transduction. Representative immunoblots for GAL-3 protein expression in THP-1, HL-60, U937 and control HEK293T cell lines non-transduced (Con, from control) or transduced with 30, 100 or 300 μ L TUs containing SEWP+ *GAL-3.1* vector. Total β -actin was used as loading control.

Differentiation process induced by PMA addition, increased the GAL-3 expression level. Interestingly, the increase in GAL-3 expression observed after *GAL-3.1* transduction in the absence of macrophage differentiation process, both at mRNA and protein level, could not be detected at cell surface level, indicating that GAL-3 protein accumulated inside the cells and is not expressed at external cell surface in this experimental conditions. This result was consistent for the three promyelocytic cell lines studied.

Therefore these results indicated that, *GAL-3.1* transduction increases the total GAL-3 protein, which is accumulated inside the cells, and only after the differentiation process, which also increased the total GAL-3 protein by itself, is distributed between the interior and the cell surface in all cell lines assayed. This suggests GAL-3 bind to proteins expressed at molecular surface level preferentially in differentiated status, as TLR2. Studies are in progress to elucidate the consequences of the GAL-3 overexpression in their biological activities.

CONCLUSIONS.

- 1- M-DMs from patients with decompensated hepatic cirrhosis are in a primed inflammatory status in absence of detectable antigens, which would facilitate a fast response, probably controlled by IL-6, against subsequent events of bacterial translocation.

- 2- A positive correlation exists between basal IL-6 levels and ERK phosphorylation in peritoneal M-DM from patients with cirrhosis.
- 3- Ascites M-DM are “differently primed” by the *in vivo* pathophysiological environment and preserve their inflammatory differentiation profile for at least 24 h, being more pro-inflammatory in alcoholic respect HCV infected cirrhotic patients.
- 4- The number of PMNs, M-DMs and T lymphocytes in the ascites depends on the cirrhosis etiology suggesting that leukocyte migration towards the peritoneal cavity is not a passive process.
- 5- In peritoneal M-DM isolated from the ascites of cirrhotic patients, the release of TNF- α and IL-6 pro-inflammatory cytokines depends on MAPK signaling pathways and differ depending on the microbial stimuli, whereas PI3K-Akt pathway has a prominent role in the modulation of IL-10 mediated anti-inflammatory function.
- 6- Inhibition of MEK1 and JNK reduced IL-1 β secretion, while p38 MAPK inhibitor had no effect on that process. On the contrary, inhibition of PI3K increased the secretion of IL-1 β in M-DM, mainly by the enhancement of the release of intracellular IL-1 β and CASP-1 content toward the extracellular medium.
- 7- Inhibitors of MAPK pathways could be potential therapeutic tools for pharmaceutical intervention to prevent hepatic damage by reducing the inflammatory response associated to liver failure. On the contrary PI3K-Akt inhibitors are not recommended as those drugs enhance the inflammatory response by increasing the IL-1 β release and suppressing the production of IL-10.
- 8- *GAL-3.1* and *GAL-3.2* spliced variants of *LGALS3* gene are expressed in M-DM from ascites and this expression is modulated after stimulation.
- 9- The differential gene and protein GAL-3.1 expression levels and behavior in response to stimulation related to M-DM from healthy donors, signals to a polarization to a alternatively activated macrophage phenotype in that pathological scenario, involved in the fibrosis enhancement

- 10- An *in vitro* model of GAL-3 overexpression has been developed by transduction with lentivirus vectors containing *GAL-3.1* in THP-1, HL-60 and U937 cell lines to study its role in human macrophages.