

# OBJETIVOS DE LA JORNADA

- Identificar el procedimiento de solicitud y cesión de muestras
- Conocer las condiciones de almacenamiento, uso y gestión de las muestras con fines de identificación
- Mejorar la accesibilidad a las muestras por los investigadores



Todo que se constata como veraz para *E. coli*  
también debe ser cierto para los elefantes

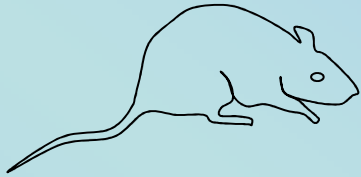
(Jacques Monod)

[akifrases.com](http://akifrases.com)

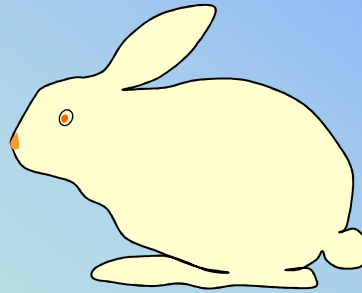
**Of Mice and Not Men: Differences  
between Mouse and Human  
Immunology**

*Javier Mestas and Christopher C. W.  
Hughes*

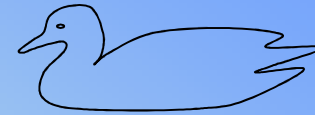
*J Immunol* 2004; 172:2731-2738



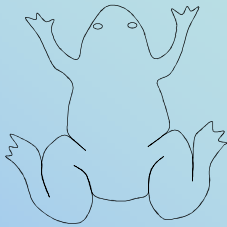
***Mus musculus***



***Oryctolagus cuniculus***



***Anser anser***



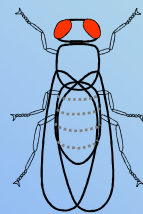
***Xenopus laevis***



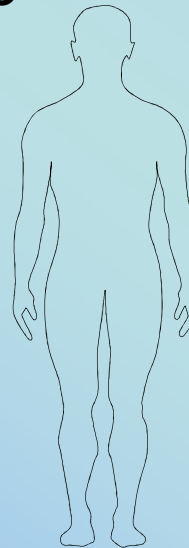
***Danio rerio***



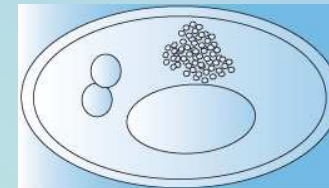
***Rattus norvegicus***



***Drosophila melanogaster***



***Homo sapiens***



***Levaduras***

## El ejemplo de la *Trained innate immunity*

- Los estudios que se iniciaron en palomas y *Drosophila* se pueden continuar en leucocitos humanos con muestras de Biobancos

# Respuesta inmune innata

- Previene la entrada de microorganismos en los tejidos y/o los elimina antes de que se desarrolle la enfermedad.
- **Características I**
- Presente desde el nacimiento.
- No es específica puesto que actúa sobre muchos microorganismos.
- No se hace más eficiente en exposiciones sucesivas al mismo microorganismo (?)

# Características II

- Incluye mecanismos como fagocitosis, opsonización y respuesta a patrones moleculares.
- Se asocia a la respuesta inflamatoria clásica, aunque ésta pueda ser inaparente

# The adaptative response

- IMMUNOLOGICAL RECOGNITION
- SELF/NON-SELF DISCRIMINATION
- IMMUNOLOGICAL SPECIFICITY
- IMMUNOLOGICAL MEMORY

La inmunidad adaptativa requiere el desarrollo previo de la respuesta inmune innata

***PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns)***  
***Evolutionary conserved molecules on infectious nonself organisms***

Janeway, C.A., Jr (1989) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54, 1-13

**The immune system evolved to discriminate infectious nonself  
from noninfectious self.**

***Immunol Today.* 13:11-16. 1992**



Charlie Parker



Polly Matzinger



**Charles A. Janeway Jr.**



Frank Macfarlane Burnet

This notion has been updated by the evidence that Damage-Associated Molecular Patterns also activate PRR (Polly Matzinger)

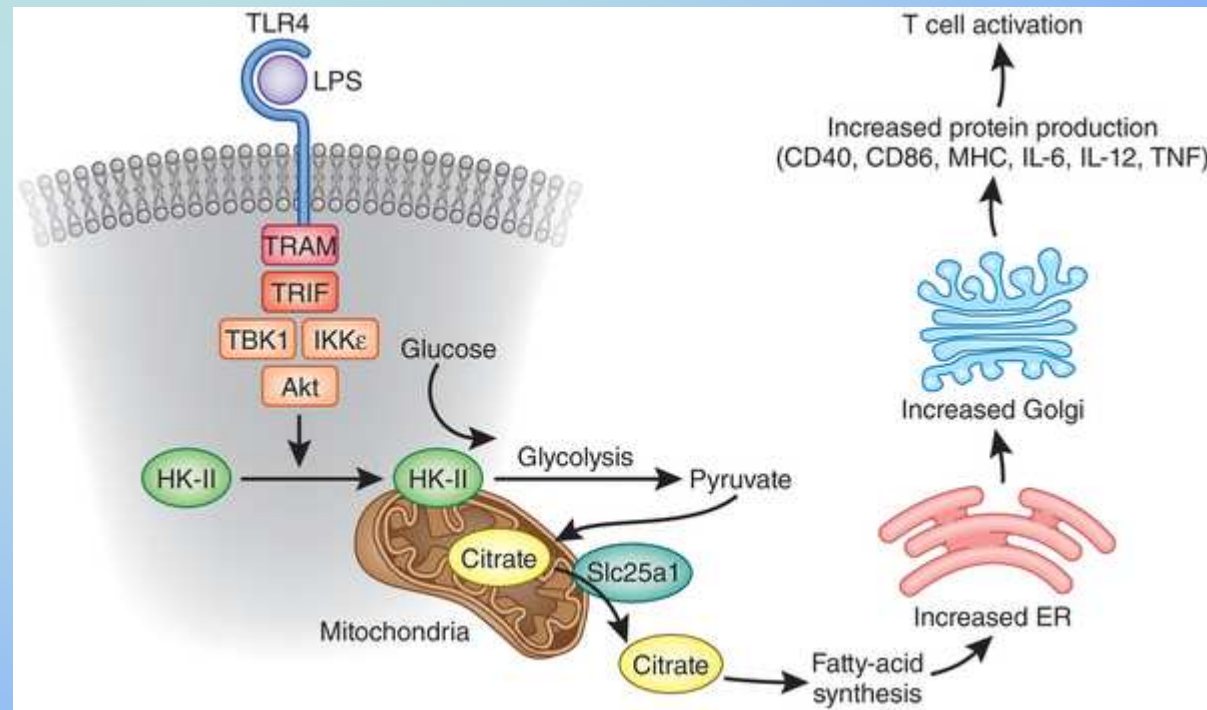


# Los receptores Toll se descubrieron en *Drosophila*

- Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M.; Hoffmann, J. A. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults". *Cell* **86** (6): 973–983

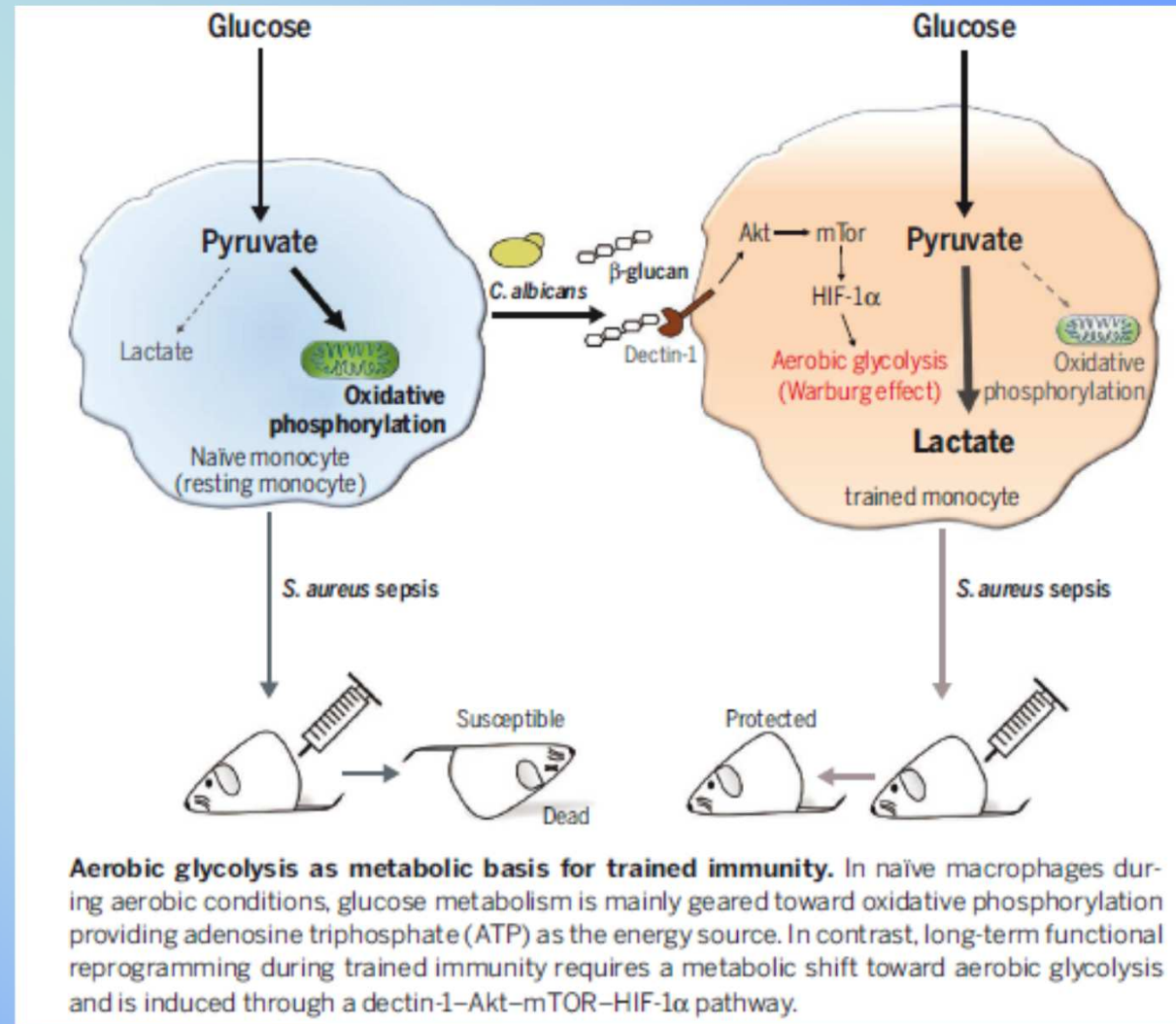
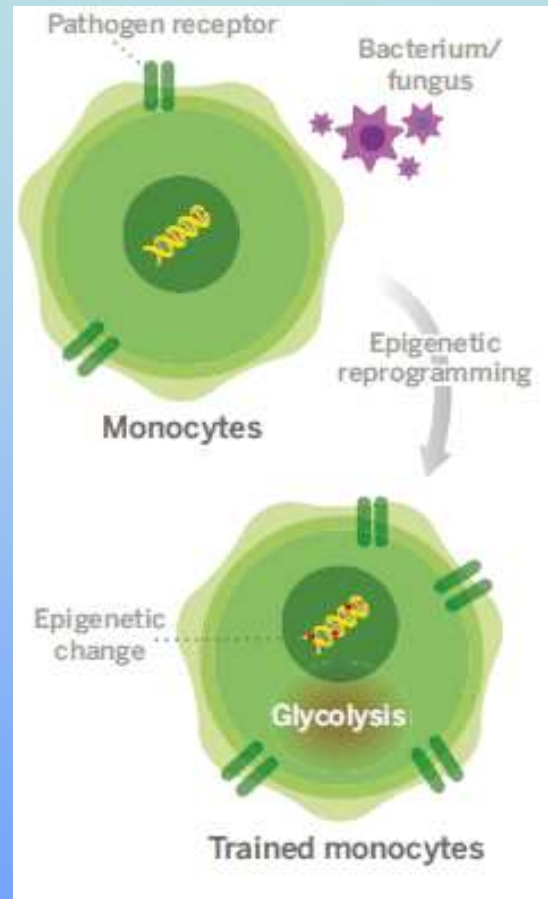
**FROM: Glycolytic reprogramming by TLRs in dendritic cells**  
**LUKE A J O'NEILL**

Nature Immunology 15, 314-315, 2014

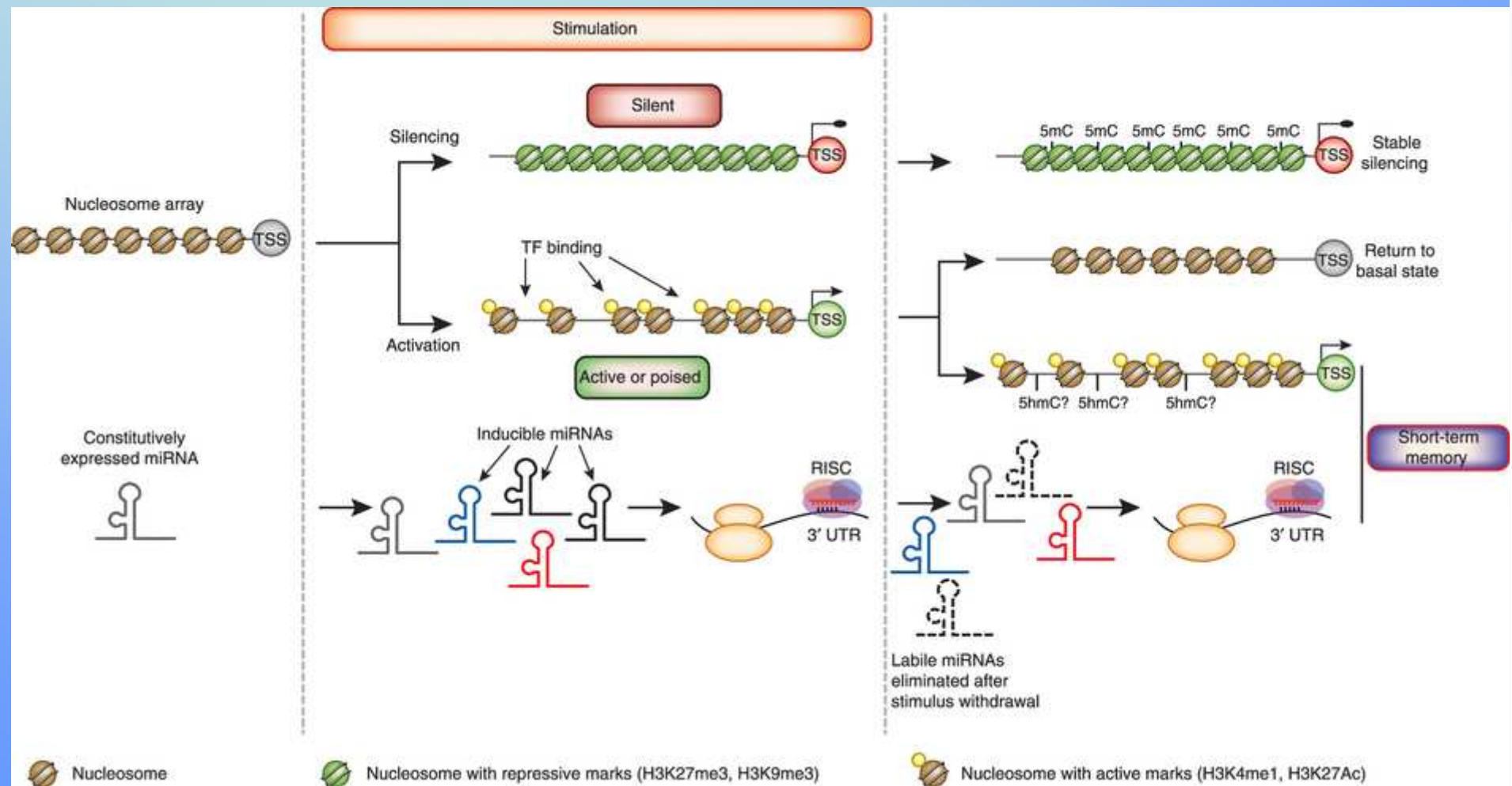


El ciclo de Krebs se describió en el músculo pectoral de palomas y los receptores TLR se identificaron en *Drosophila*. Ahora se estudian en las células dendríticas humanas y de ratón

## La glicolisis aeróbica es la base de la “trained immunity”



¿Se puede entrenar la inmunidad innata?  
¿Tiene que ver con la glicolisis?  
¿Se puede estudiar en leucocitos humanos?



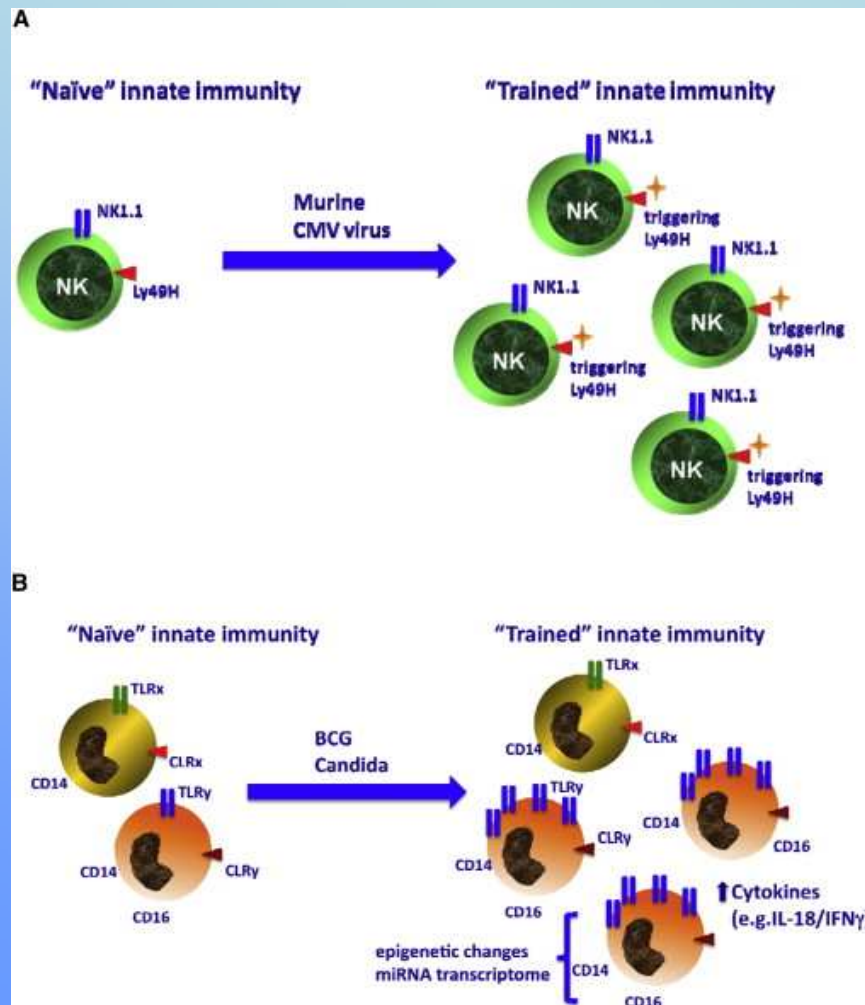


## *A major change in our understanding of innate and adaptive immune responses*

We now posit that mammalian innate immunity also exhibits an immunological memory of past insults, for which we propose the term "trained immunity."

Netea, Quintin, and van der Meer

Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense  
Cell Host & Microbes 9:355-361, 2011



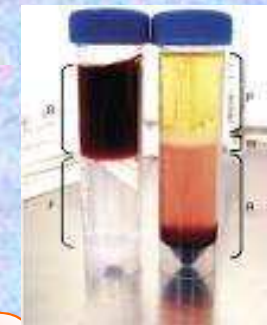
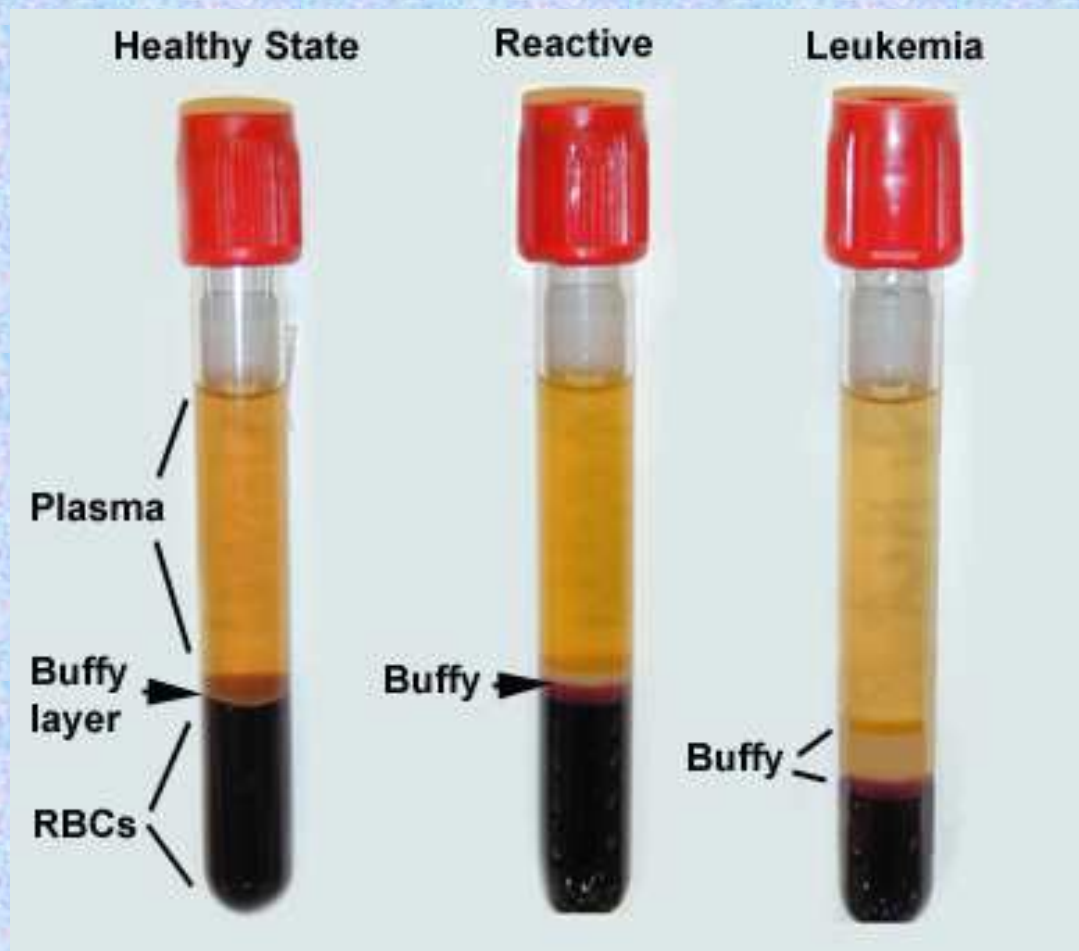
### Trained Immunity:

Schematic representation of the potential changes in innate host mechanisms that could lead to trained immunity to viruses (via NK cells, A) or bacteria or fungi (through macrophages, B). NK cells can display an increased efficiency to activate the LY49H receptor (shown in the figure as a star next to the receptor). While similar properties have been suggested for monocytes and macrophages, much less is known regarding the mechanisms responsible. In macrophages, putative mechanisms range from differences in the monocyte/macrophage cell subpopulations (e.g., CD14+CD16<sup>-</sup> and CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>), to changes of PRR expression on cell membrane, functional phenotype (e.g., cytokines), and molecular mechanisms responsible for these effects (e.g., epigenetic changes, modulation of miRNA transcriptome).

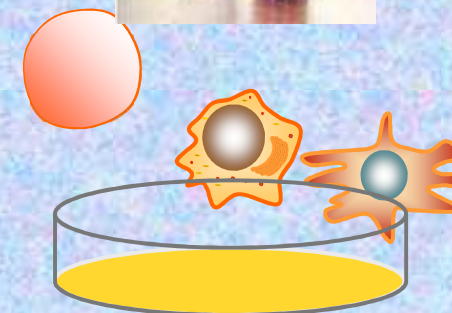
¿Cómo hacemos los estudios en células humanas?

Centrifugación diferencial y gradientes de Ficoll

## Buffy coats

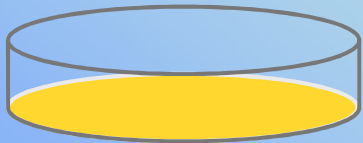
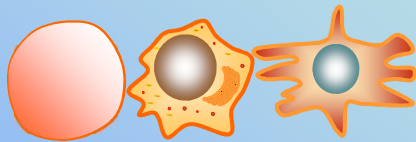
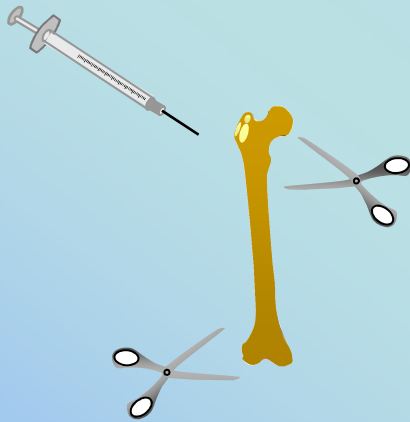
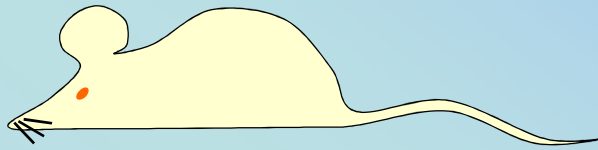


PRP  
Buffy coat  
PMN y  
eritrocitos



$5 \times 10^6$  leucocitos/ml

## Médula ósea de ratón



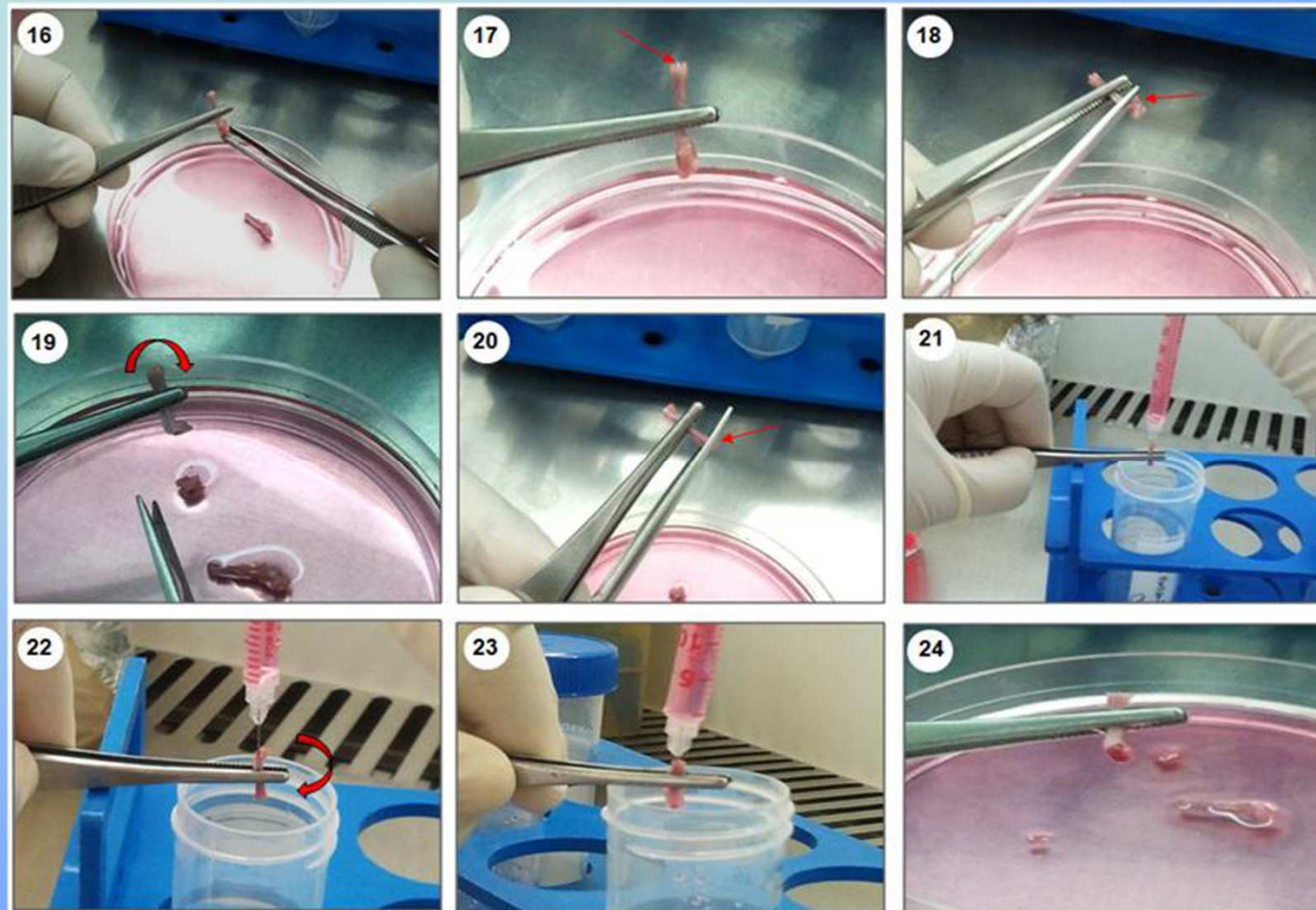
$3-4 \times 10^7$  Células  
Células intersticiales,  
Macrófagos y CD mieloides



Obtención de células de rata o ratón  
por lavado peritoneal.  
Principalmente macrófagos

Se pueden hacer timectomías,  
esplenectomías y aislamiento  
de ganglios mesentéricos







# Protocolo de Diferenciación Fagocitos

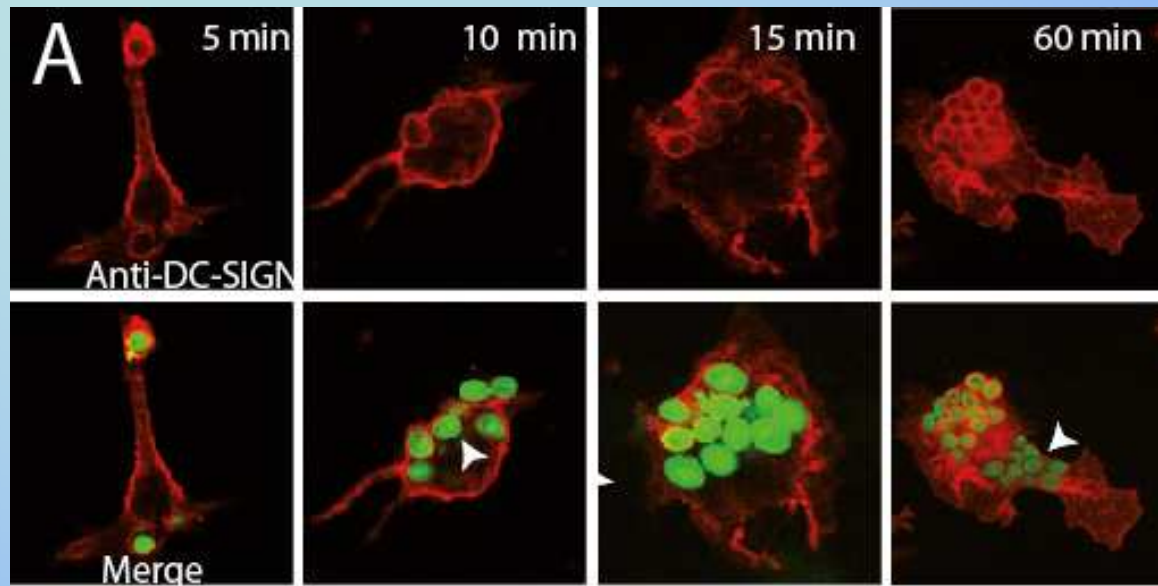
- Diferenciación macrófagos: Suero humano normal al 10%, que contiene M-CSF. El Biobanco nos proporciona suero de pacientes AB+
- Diferenciación CD: GM-CSF más IL-4

# Ventajas del acceso a BioBanco

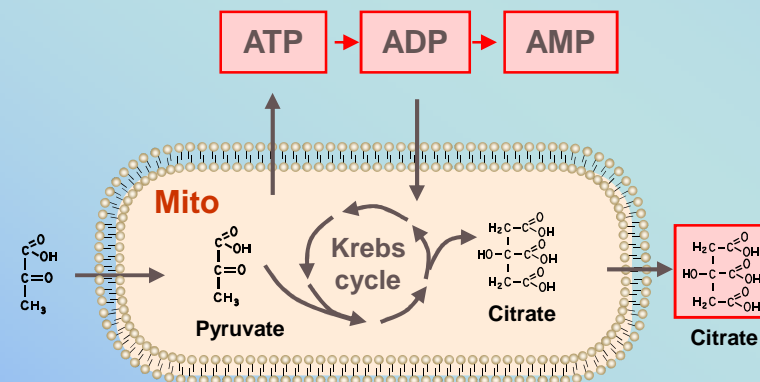
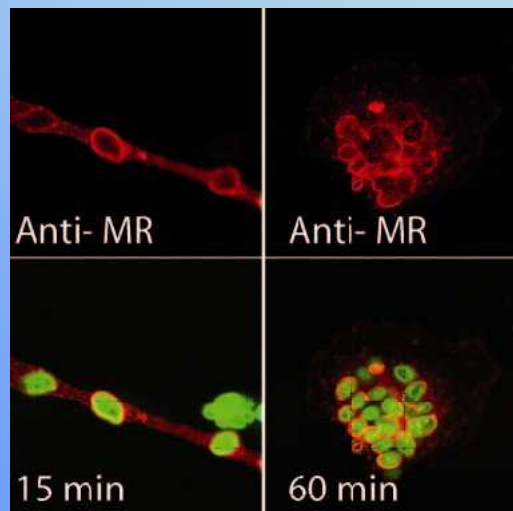
- Evita una penosa alternativa: Sangrar al personal del laboratorio o a estudiantes
- La disponibilidad de material abundante permite técnicas como inmunoprecipitaciones y ChIP
- Se dispone de muestras con control microbiológico. Aunque toda muestra deba tratarse como potencialmente infecciosa

# ¿Qué estudiamos con las muestras del BioBanco?

- Las células dendríticas son células fagocíticas cuya misión es la captación de antígenos por fagocitosis, su procesamiento y presentación a linfocitos T y la producción de citocinas que generan el ambiente adecuado para la polarización de la respuesta inmune a los tipos Th1, Th2 o Th17



¿Cúanto pesan las partículas fagocitadas?



Fagocitosis de hongos por receptores reconocedores de glucanos

# The Unfolded Protein Response and the Phosphorylations of Activating Transcription Factor 2 in the *trans*-Activation of *il23a* Promoter Produced by $\beta$ -Glucans\*

Received for publication, September 26, 2013, and in revised form, June 23, 2014 Published, JBC Papers in Press, June 30, 2014, DOI 10.1074/jbc.M113.522656

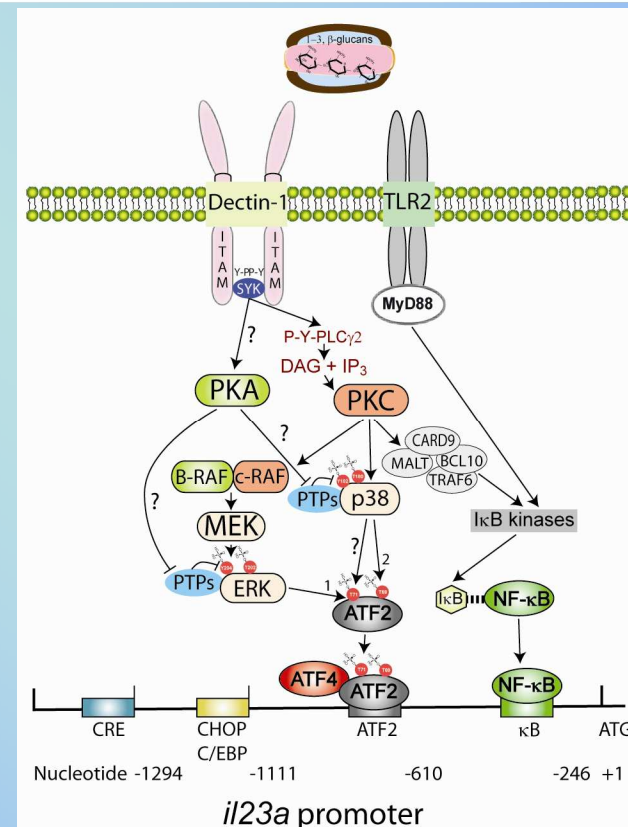
Mario Rodríguez<sup>‡</sup>, Esther Domingo<sup>§</sup>, Sara Alonso<sup>§</sup>, Javier García Frade<sup>¶</sup>, José Eiros<sup>||</sup>, Mariano Sánchez Crespo<sup>§1</sup>, and Nieves Fernández<sup>‡</sup>

From the <sup>‡</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, 47005-Valladolid, the <sup>§</sup>Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 47003-Valladolid, the <sup>¶</sup>Division of Hematology, Hospital Universitario Río Hortega, 47012-Valladolid, and the <sup>||</sup>Division of Microbiology, Hospital Universitario Río Hortega, 47012-Valladolid, Spain

**Ethics Statement**—This study was approved by the Bioethical Committee of the Spanish Council of Research (CSIC), and the written informed consent of all healthy donor subjects was obtained at Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León Biobank. The participants received written consent according to the regulations of the Biobank. The researchers received the samples in an anonymous way. The process is documented by the Biobank authority according to the specific Spanish regulations. The ethics committee approved this procedure before starting the study.

**Acknowledgments**—Dr. Jesús Pla is thanked for the gift of *Candida albicans*. Dr. John Patterson is thanked for providing the IRE1 $\alpha$  inhibitors MKC3946 and MKC8866. Drs. Carlos R. Vázquez de Aldana and Francisco del Rey are thanked for the gift of nigeran. The staff from Centro de Hemoterapia de Castilla y León is thanked for help with blood cell purification.

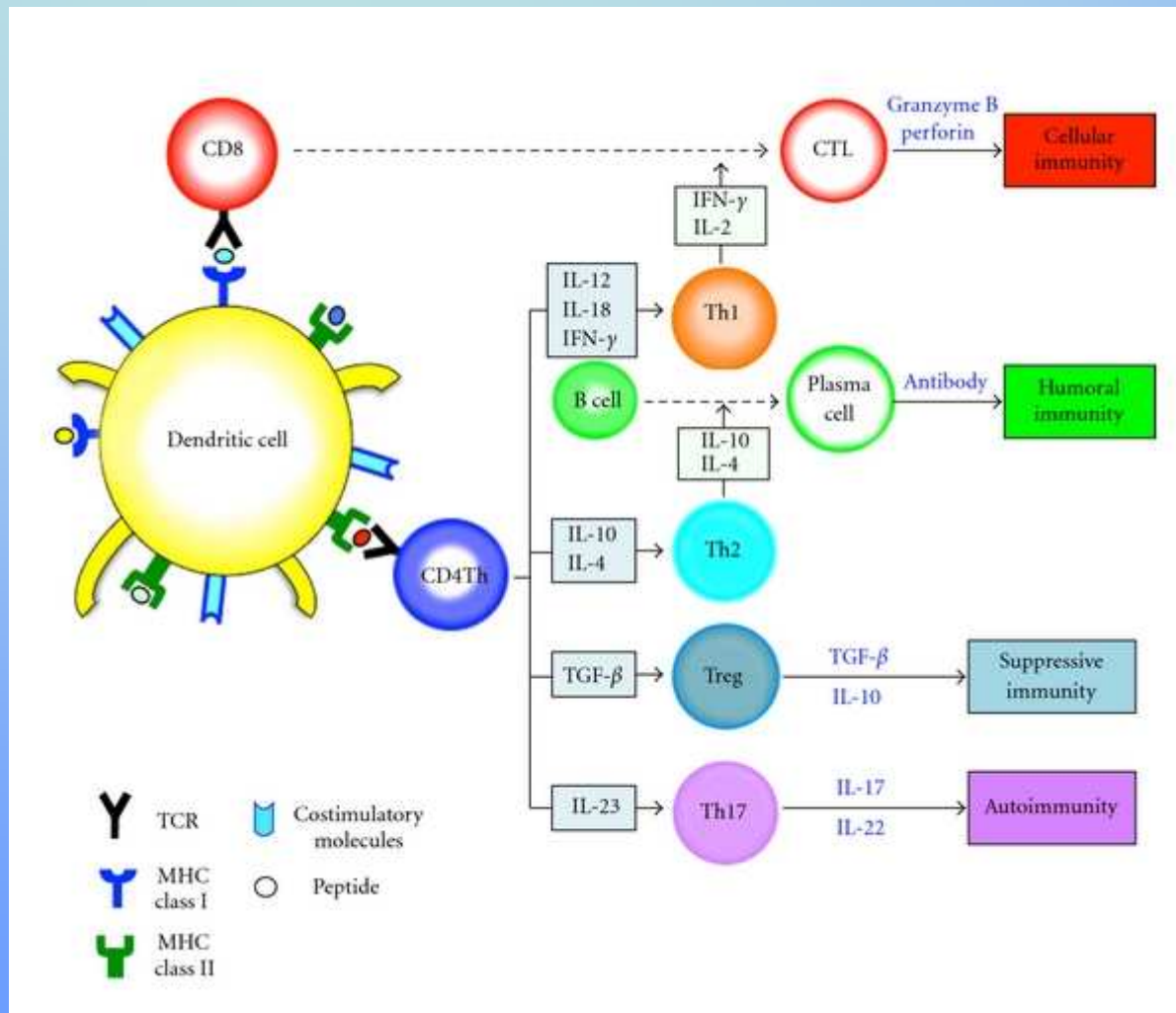
Cumpliendo los términos de la colaboración





# ¿Para qué estudiamos esto?

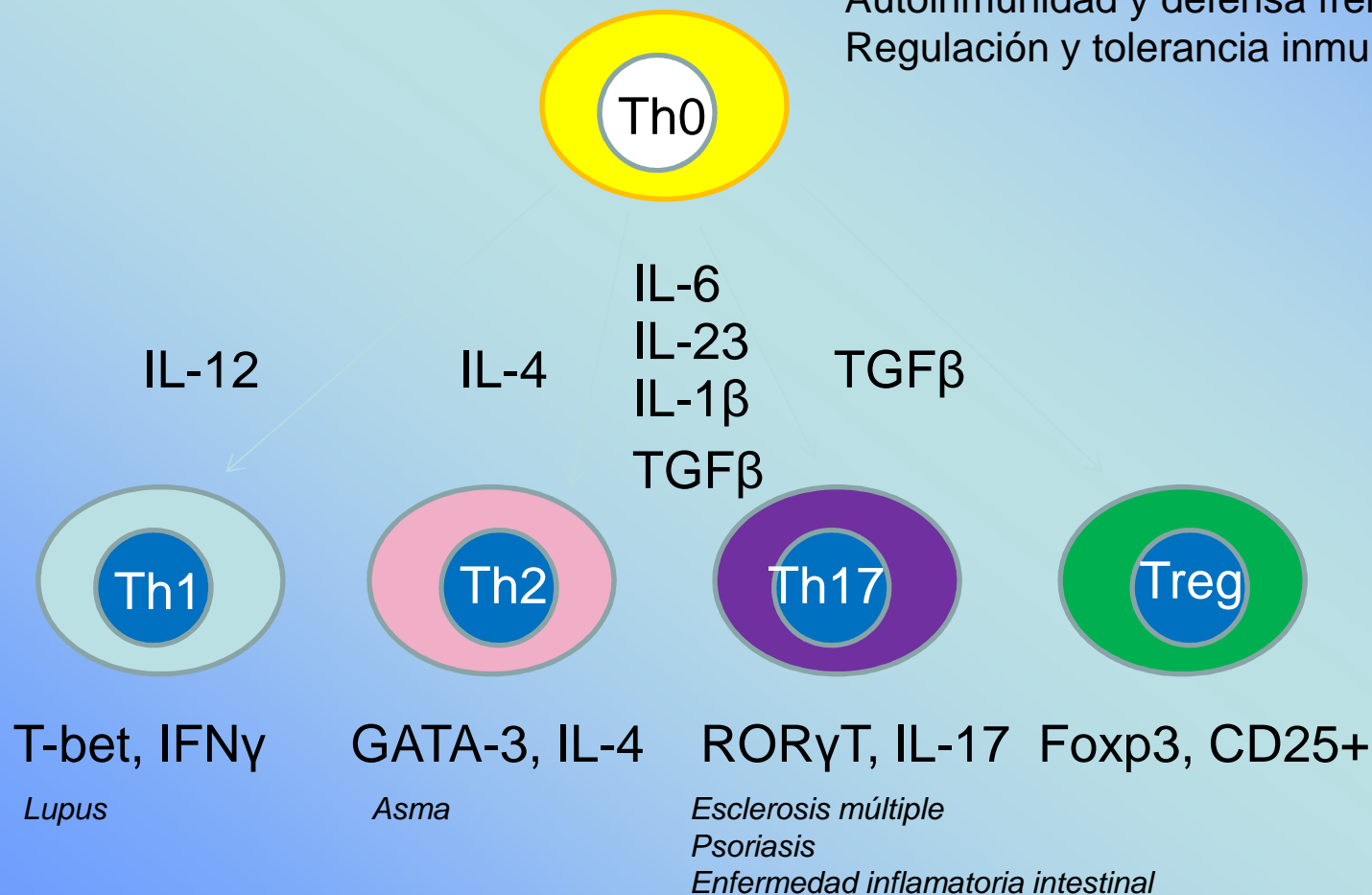
## La polarización de la respuesta inmune depende del patrón de citocinas



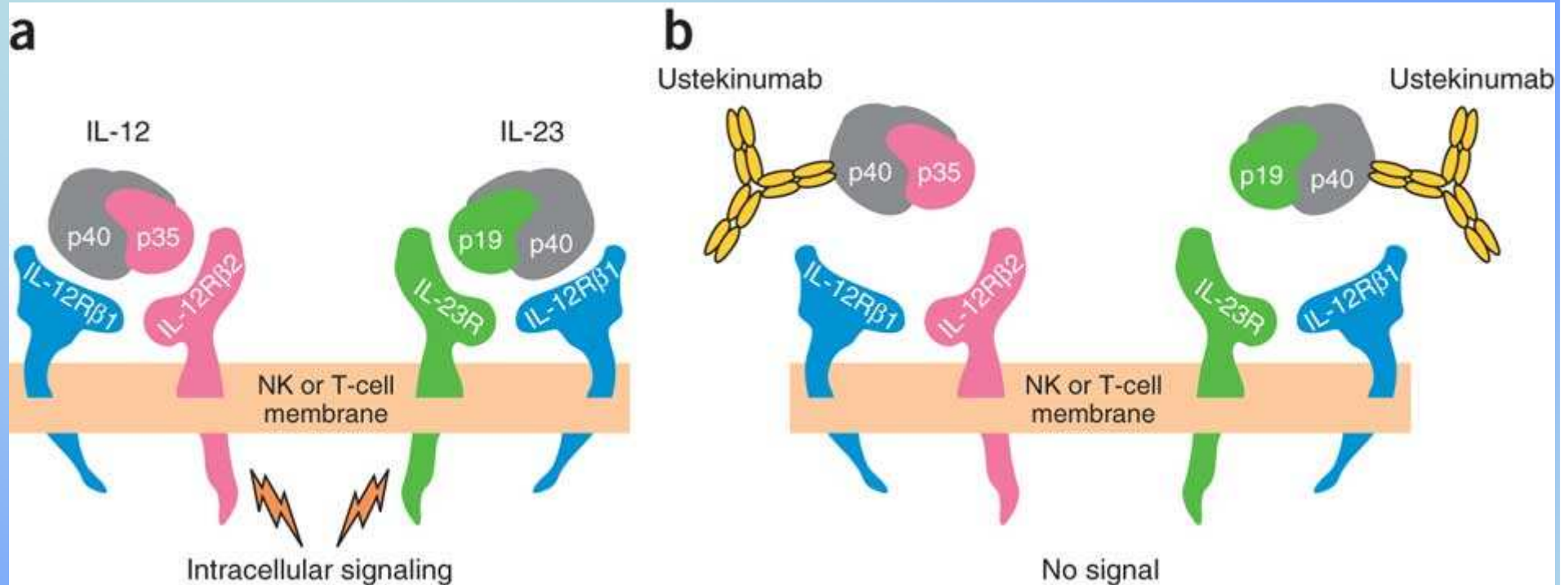
Defensa frente a Micosis sistémicas

# ¿Por qué es importante el balance IL-12 p70/IL-23

Inmunidad protectora,  
Alergia y defensa frente a parásitos  
Autoinmunidad y defensa frente a hongos  
Regulación y tolerancia inmune

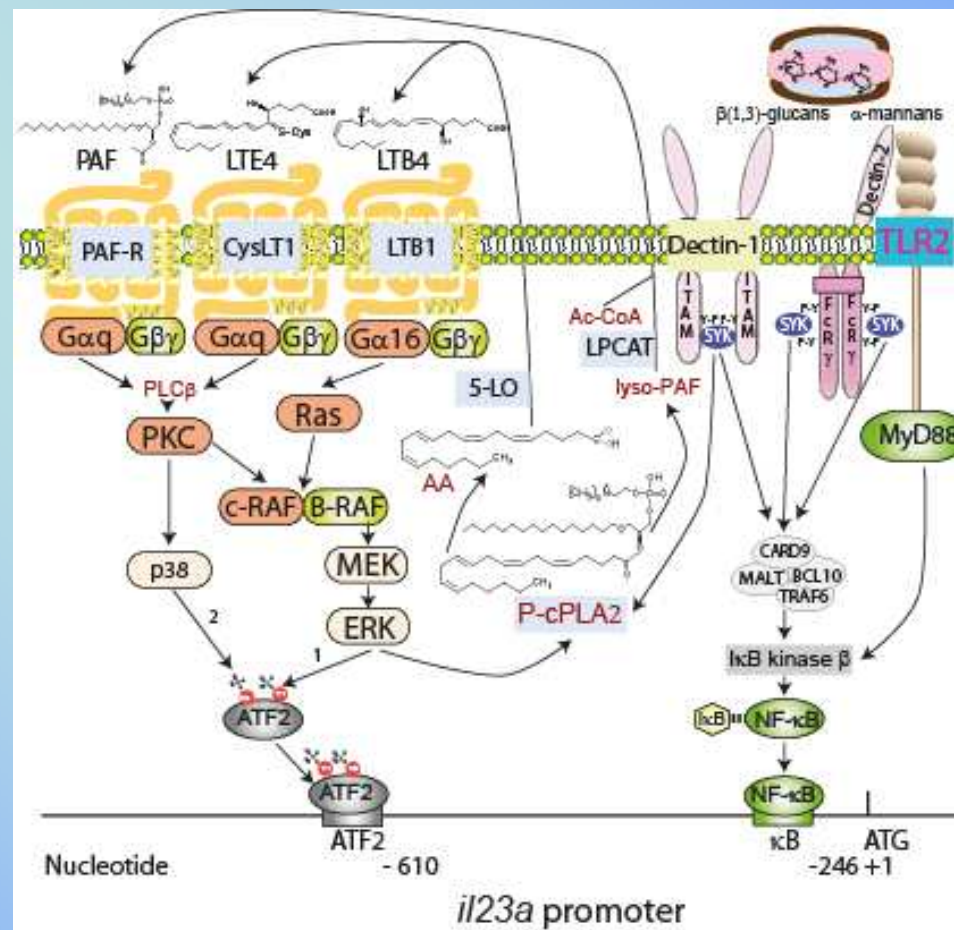


# El bloqueo de IL-23 en clínica



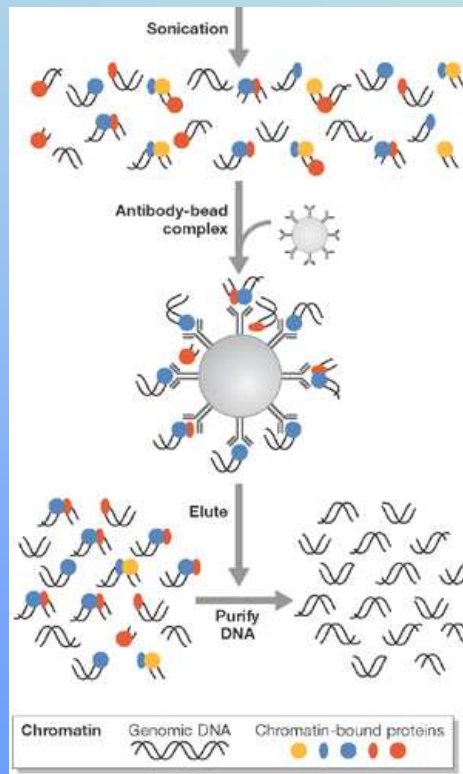
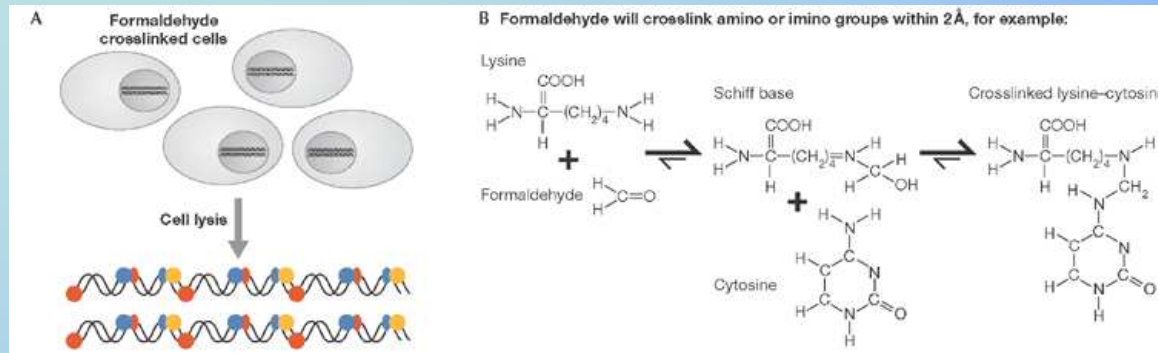
El bloqueo de p19 (gen *il23a*) es más específico que el uso de ustekinumab (Stelara), aprobado por la FDA para el tratamiento de la artritis psoriásica **N Engl J Med.** 2010 Jan 14;362(2):118-28. y enfermedad de Crohn refractaria **N Engl J Med.** 2012 Oct 18;367(16):1519-28



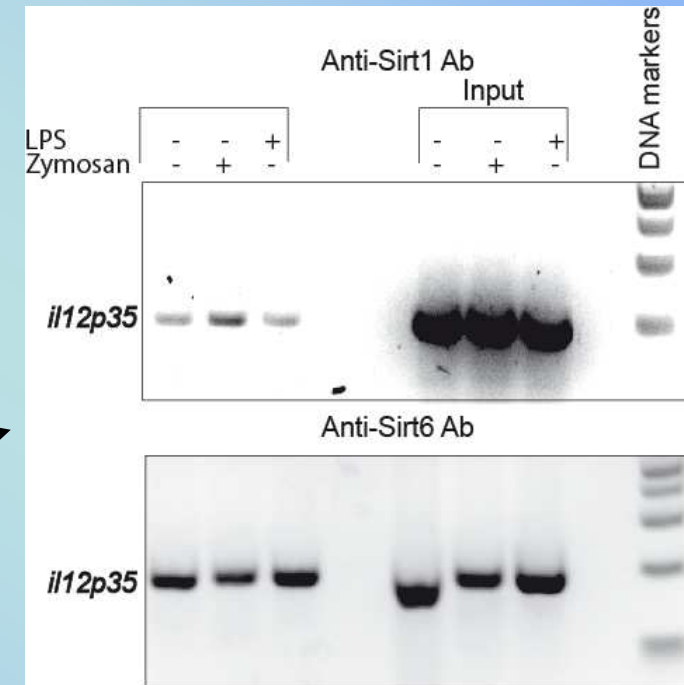


¿Es posible modular farmacológicamente la producción de IL-23 sin usar anticuerpos como Ustekinumab?

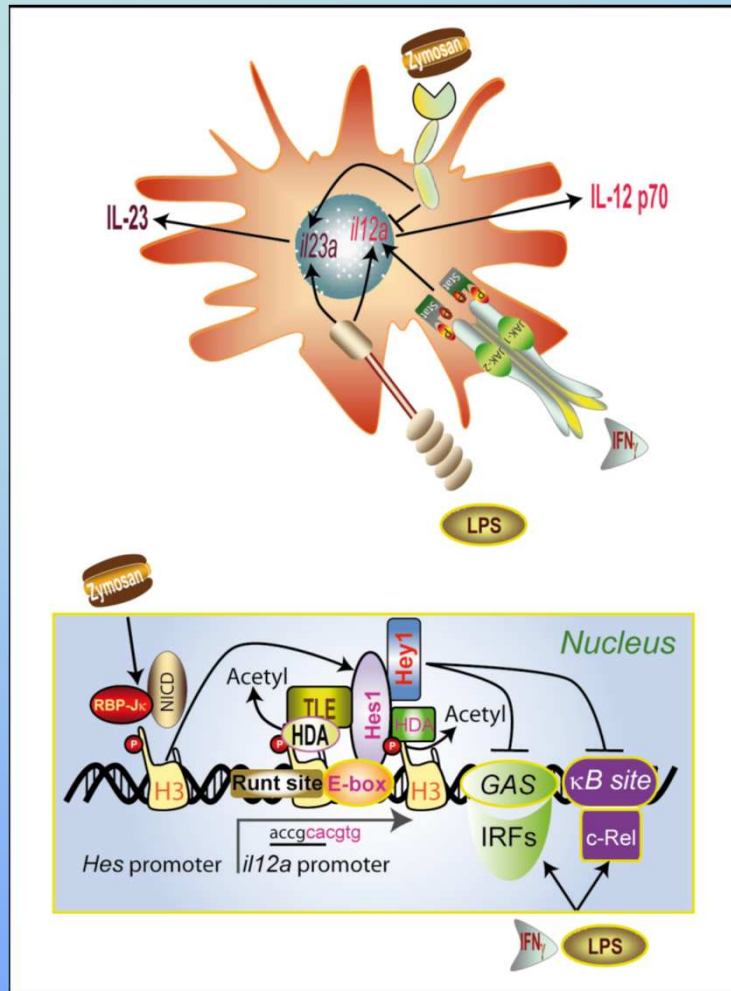
# Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP): El arte de inmunoprecipitar las regiones promotoras de los genes



PCR con primers de los promotores



¡La técnica funciona bien con abundante proteína por eso es importante disponer de los buffy coats humanos!



¿Cómo se bloquea la transcripción de *il12a* cuando se estimulan las células dendríticas con patrones moleculares de las paredes de los hongos?

¿Puede extenderse el modelo a la tolerancia al LPS a través del reclutamiento de sirtuinas y el incremento de su actividad por la presencia de cofactores?

Yolanda Alvarez , Cristina Municio et al., Notch and Transducin-like Enhancer of Split (TLE)-Dependent Histone Deacetylation Explain IL-12 p70 Inhibition by Zymosan. *J. Biol. Chem.* doi: 10.1074/jbc.M111.222158

- El acceso a muestras de BioBancos (Centros de Hemoterapia y Hemodonación) permite la realización de estudios en las áreas de Biología Leucocitaria/Señalización bioquímica que serían muy difíciles de realizar en otras condiciones por falta de material suficiente

- Los estudios se realizan con material que se deshecha y por lo tanto no se reduce la disponibilidad de material para su uso en clínica
- Del resultado de estos estudios es posible obtener la base conceptual para el desarrollo de tratamientos farmacológicos alternativos al empleo de terapias biológicas, que resultan extremadamente caras