

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Estudios fenotípicos y funcionales inducidos en células
dendríticas humanas por vacunas de origen bacteriano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Cirauqui Armendáriz

Director

Óscar Palomares Gracia

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Estudios fenotípicos y funcionales
inducidos en células dendríticas humanas
por vacunas de origen bacteriano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Cirauqui Armendáriz

Director

Oscar Palomares Gracia

Madrid, 2017

A mis padres y mi hermano

A Santi

AGRADECIMIENTOS

Tantas veces pensando en los agradecimientos de mi Tesis, y ya ha llegado el momento de escribirlos. Siempre he creído que está es la página más importante de una Tesis, ya que sin la ayuda y el apoyo tanto profesional como emocional de muchas personas, hubiese sido imposible escribir el resto de páginas. Han sido cuatro años muy intensos, con sus momentos buenos y no tan buenos, pero desde luego en todos he aprendido y crecido no sólo profesionalmente sino personalmente.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de Tesis Oscar por darme la oportunidad de realizar esta Tesis, por su implicación en el proyecto, por todo lo que me ha enseñado y por su exigencia, que ha hecho que cada día sea una superación y un nuevo reto que lograr. También quiero agradecer a todo el equipo de Inmunotek y en especial al Dr. José Luis Subiza por dejarme forma parte de este proyecto. Gracias también al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la UCM por permitirme realizar esta Tesis.

Muchísimas gracias a la Dra. Silvia Sánchez-Ramón y a la Dra. Juliana Ochoa por su implicación en este trabajo, reclutando los pacientes que tan valiosos han sido en esta Tesis. Mil gracias a Beatriz y a Lourdes por ayudarme con el Gene Array y por siempre estar dispuestas a resolver cualquier duda que me ha surgido. Tampoco me puedo olvidar de Irene, Juan y Carmen, muchas gracias por vuestra ayuda y disposición.

Gracias también al servicio del CAI de la UCM, y quiero hacer un especial agradecimiento a Amalia, por su preocupación en este trabajo, por los consejos y ánimos que me ha dado.

Gracias a las personas que me acogisteis en el lab, Annatina y Belén. A Sofía, Iván y Javi, gracias por vuestra ayuda y apoyo, y por enseñarme parte de la gastronomía de Madrid: Vips, Fridays, Fosters,A Chiara, sólo coincidimos tres meses pero te cogí mucho cariño. A Alba, Cristina y Leticia os deseo lo mejor y mucho ánimo con vuestras tesis y máster.

Millones de gracias a mi gran tesoro de Madrid, esa Comu que siempre me habéis apoyado, escuchado y aconsejado. Es un regalo teneros cerca. ¡Sois geniales!

Dicen que uno no valora lo que tiene hasta que toma distancia de ello, en estos cuatro años he echado mucho de menos mi ciudad natal, Pamplona. Mil gracias a las amigas de toda la vida, las que te hacen sentir como en casa y son capaces de darte pequeños empujones y “chutes” de energía para seguir trabajando. Aunque cada vez sea más difícil vernos, gracias por seguir compartiendo y celebrando los momentos más importantes de nuestras vidas, y este no va a ser menos. Además, quiero aprovechar para dar muchos ánimos a Ceci y Miriam con sus Tesis.

Tampoco me puedo olvidar de mis amigos científicos, millones de gracias por vuestros consejos y momentos de risas, y por hacer siempre un hueco para tomar unas cañas o ir al monte cada vez que iba a Pamplona.

Millones de gracias a mis padres y mi hermano, creo que no hay suficientes palabras para expresar todo lo que habéis hecho por mí, por vuestro apoyo incondicional, y por creer siempre en mí. A pesar de estar a 500 km siempre os he sentido muy cerca. Sois un referente y un ejemplo a seguir porque no podéis ser mejores personas. Gracias por los valores que me habéis inculcado: trabajo, esfuerzo, humildad, superación, constancia, generosidad,... Mamá, gracias por estar siempre que lo he necesitado, por tus palabras de ánimo, por tu paciencia, por tus llamadas a primera hora de la mañana para desearme un buen día. Papá, gracias por tu apoyo, por ayudarme a superarme ante las dificultades, por animarme siempre y creer en mí. Os quiero mucho.

Por último, millones de gracias a Santi, la persona que quiero tener a mi lado el resto de mi vida. Esta Tesis tiene mucho de ti. Mil gracias por tu infinita paciencia, tu serenidad, tu optimismo y por todo lo que me has ayudado. Estos últimos meses no han sido fáciles y tú has estado al pie del cañón, y siempre con una sonrisa. Dentro de poco te va a tocar a ti terminar esta aventura que empezamos juntos. Te doy todo mi apoyo y espero recompensarte. ¡Mucho ánimo! Te quiero.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	VII
TABLA DE CONTENIDOS	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS	XIII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XIX
ABREVIATURAS	XXIII
INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedades infecciosas del tracto respiratorio y del tracto urinario	3
1.1. Infecciones respiratorias (RTIs)	3
1.1.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	4
1.1.2. Infecciones recurrentes del tracto respiratorio (RRTIs)	4
1.2. Infecciones del tracto urinario (UTIs)	5
2. Resistencia a los antibióticos	7
2.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	8
3. Vacunas bacterianas administradas en la mucosa	9
3.1. Mucosa y sistema inmune asociado a las mucosas	9
3.2. Vacunas de origen bacteriano	10
3.3. Vías de administración: mucosa sublingual	12
3.4. Modo de acción: vacunas bacterianas empleadas en la práctica clínica	13
4. Mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de las vacunas bacterianas	15
4.1. El papel de las células dendríticas en la iniciación y mantenimiento de respuestas inmunes	15
4.1.1. Células dendríticas mieloides (mDCs) humanas	17
4.1.2. Células dendríticas plasmacitoides (pDCs) humanas	17
4.1.3. Células dendríticas humanas derivadas de monocitos	18
4.2. Principales tipos de PRRs (<i>pattern recognition receptors</i>) en DCs	18
Receptores de tipo Toll (TLRs)	19
Receptores lectina tipo C (CLRs)	20
4.3. Polarización de las células T CD4 ⁺ vírgenes	23
4.3.1. Células T colaboradoras de tipo 1 (Th1)	24
4.3.2. Células T colaboradoras de tipo 2 (Th2)	24
4.3.3. Células T colaboradoras de tipo 17 (Th17)	25
4.3.4. Células T reguladoras (Treg)	25
5. Técnicas ómicas	27
OBJETIVOS	31

MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Preparaciones bacterianas polivalentes	39
2. Pacientes con infecciones recurrentes respiratorias y donantes sanos	39
3. Medios de cultivos y reactivos	40
4. Líneas celulares THP1 y THP1-XBlue™	41
5. Aislamiento de las distintas poblaciones celulares	41
5.1. Obtención de PBMC a partir de sangre periférica	41
5.2. Purificación de monocitos a partir de PBMC	42
5.3. Obtención de DCs humanas derivadas de monocitos (hmoDCs)	42
5.4. Purificación de células T CD4 ⁺ vírgenes	42
5.5. Aislamiento de células dendríticas totales sanguíneas	43
5.6. Obtención de mDCs y pDCs sanguíneas	43
6. Cultivos celulares	43
6.1. Caracterización fenotípica de hmoDCs estimuladas con MV130, MV140 y sus componentes	43
6.2. Experimentos de inhibición	44
6.3. Experimentos de co-cultivo con células T CD4 ⁺ vírgenes	45
6.3.1. Análisis de proliferación de células T CD4 ⁺ mediante experimentos de dilución con CFSE	45
6.3.2. Re-expansión clonal	45
7. Citometría de flujo	46
Tinción superficial	46
Tinción intracelular	46
8. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA	47
9. Inmunodetección de proteínas	48
10. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)	49
11. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	50
12. Gene array: análisis global comparativo del transcriptoma	51
13. Análisis estadístico	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
BLOQUE I:	
PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE MV130 (BACTEK®)	
EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS	57
1. Estudios para optimizar las condiciones de ensayo (dosis y tiempo de respuesta) en células THP1	57
2. Estudio de la capacidad de MV130 para inmunomodular la función de las DCs de pacientes con RRTIs e individuos sanos	58
2.1. Análisis de la frecuencia de monocitos, mDCs y pDCs en PBMC aislado a partir de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con RRTIs	58
2.2. Estudio de la capacidad de MV130 para inducir maduración y producción de citoquinas en hmoDCs	60
2.3. Estudios de la capacidad de hmoDCs activadas con MV130 para polarizar respuestas T	64
3. Estudio de la capacidad de MV130 para activar células dendríticas totales sanguíneas	67
3.1. Producción de citoquinas por tDCs activadas con MV130	67
3.2. Estudios de la capacidad de tDCs activadas con MV130 para polarizar respuestas T	68
4. Estudio de la capacidad de MV130 para activar mDCs y pDCs	69

5. Estudio de la capacidad de MV130 para modular respuestas en PBMC de individuos sanos y pacientes con RRTIs.	71
6. Estudio de los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV130 en DCs humanas	73
6.1. Análisis comparativo global del transcriptoma en DCs humanas activadas con MV130 respecto al control	73
7. Validación de los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV130 sobre DCs humanas	80
7.1. Estudio del papel de IL-10 en el mecanismo de acción de MV130	83
7.2. Contribución del inflammasoma en el modo de acción de MV130 en hmoDCs	85
8. Estudio de la contribución de los componentes Gram positivas y Gram negativas de MV130 en los efectos ejercidos en hmoDCs	86
 BLOQUE II:	
PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE MV140 (UROMUNE®) EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS	91
1. Estudios para optimizar las condiciones de ensayo (dosis y tiempo de respuesta) en células THP1	91
2. Estudio de la capacidad de MV140 y sus componentes para inmunomodular la función en DCs humanas	93
3. Estudios de la capacidad de hmoDCs activadas con MV140 y componentes individuales para polarizar respuestas T	95
4. Estudio de la capacidad de MV140 para activar células dendríticas totales sanguíneas	99
5. Estudios de los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV40 en DCs humanas	100
6. Mecanismos de señalización de TLRs y CLRs que contribuyen en el modo de acción de MV140 en DCs	102
 DISCUSION FINAL	107
 CONCLUSIONES	115
 BIBLIOGRAFÍA	121
 ANEXOS	143

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1	4	Figura R.38	74
Figura I.2	6	Figura R.39	75
Figura I.3	7	Figura R.40	77
Figura I.4	8	Figura R.41	78
Figura I.6	12	Figura R.42	79
Figura I.7	19	Figura R.43	81
Figura I.8	20	Figura R.44	82
Figura I.9	21	Figura R.45	83
Figura I.10	22	Figura R.46	84
Figura I.11	23	Figura R.47	84
Figura I.12	24	Figura R.49	85
Figura I.13	26	Figura R.48	85
Figura I.14	28	Figura R.50	86
Figura M.15	42	Figura R.51	87
Figura M.16	52	Figura R.52	88
Figura M.17	52	Figura R.53	89
Figura M.18	53	Figura R.54	91
Figura R.19	57	Figura R.55	92
Figura R.21	59	Figura R.56	93
Figura R.20	59	Figura R.57	95
Figura R.22	60	Figura R.58	96
Figura R.23	61	Figura R.59	96
Figura R.24	62	Figura R.60	97
Figura R.25	64	Figura R.61	97
Figura R.26	65	Figura R.62	98
Figura R.27	65	Figura R.63	98
Figura R.28	66	Figura R.65	99
Figura R.29	67	Figura R.64	99
Figura R.30	68	Figura R.66	100
Figura R.31	68	Figura R.67	100
Figura R.32	69	Figura R.68	101
Figura R.34	70	Figura R.69	103
Figura R.33	70	Figura R.70	104
Figura R.35	71	Figura D.71	112
Figura R.36	72		
Figura R.37	73		

LISTA DE TABLAS

Tabla I.1	14
Tabla I.2	16
Tabla M.3	39
Tabla M.4	40
Tabla M.5	47
Tabla M.6	48
Tabla M.7	51
Tabla R.8	76

RESUMEN

Las infecciones recurrentes de las vías respiratorias (RRTIs, *recurrent respiratory tract infections*) y de las vías urinarias (RUTIs, *recurrent urinary tract infections*) figuran como las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial con una alta tasa de mortalidad. Por ello, las RRTIs y RUTIs representan un problema de salud global muy serio con un gran impacto socioeconómico. Hasta la fecha, el tratamiento de referencia para combatir estas infecciones consiste en la administración repetida y prolongada de numerosos ciclos de antibióticos. Estos tratamientos han demostrado eficacia clínica en muchos casos pero su uso indiscriminado conlleva una serie de efectos adversos. Entre ellos, cabe destacar el incremento de resistencias a antibióticos asociado a un consumo abusivo de los mismos o su efecto perjudicial en el microbioma, lo que favorece las infecciones por hongos y bacterias. Por ello, según los últimos informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras instituciones competentes existe y urge la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos alternativos para prevenir y tratar las RRTIs y RUTIs. En este sentido, las vacunas bacterianas administradas a través de la mucosa sublingual han demostrado una alta eficacia, ya que son capaces de potenciar el sistema inmune asociado a las mucosas de manera local y en órganos distantes, mejorando así los mecanismos de defensa del organismo frente a patógenos que afectan distintos tipos de tejidos.

Estudios recientes indican que la inmunización sublingual con MV130 (Bactek®) o MV140 (Uromune®), preparaciones bacterianas polivalentes (PBPs) compuestas por bacterias enteras inactivadas por calor comercializadas por Inmunotek S.L., reducen drásticamente la tasa de infecciones en los pacientes que sufren RRTIs y RUTIs, respectivamente. MV130 está formada por bacterias enteras inactivadas por calor causantes del mayor número de infecciones respiratorias en Europa (90% Gram positivas: 60% *Streptococcus pneumoniae*, 15% *Staphylococcus aureus* y 15% *Staphylococcus epidermidis*; y 10% Gram negativas: 4% *Klebsiella pneumoniae*, 3% *Moraxella catarrhalis* y 3% *Haemophilus influenzae*). Por otro lado, MV140 está formada por bacterias enteras inactivadas por calor causantes de un gran número de infecciones urinarias (75% Gram negativas: 25% *Escherichia coli*, 25% *Proteus vulgaris*, 25% *Klebsiella pneumoniae*; y 25% Gram positivas: *Enterococcus faecalis*)

A pesar del beneficio clínico demostrado por ambas PBPs, los mecanismos inmunológicos que subyacen al modo de acción de MV130 y MV140 son totalmente desconocidos hasta la fecha. Aunque los mecanismos moleculares particulares son desconocidos, el beneficio clínico resulta de la contribución cooperativa de mecanismos inmunológicos específicos de antígeno y también de mecanismos inmunomoduladores inespecíficos. La mucosa sublingual contiene una densa red de células dendríticas (DCs) bajo el epitelio esencial en la iniciación, mantenimiento y conexión de respuestas inmunes innatas y adaptativas. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el objetivo

de esta Tesis Doctoral se ha centrado en la dilucidación de los mecanismos inmunológicos que contribuyen al modo de acción y beneficio clínico de MV130 y MV140. En particular, en este trabajo se han estudiado a nivel molecular los mecanismos inmunológicos implicados en la capacidad de MV130 y MV140 para inmunomodular el fenotipo y función de las DCs humanas, incluyendo su capacidad para polarizar respuestas T.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran, por primera vez, que MV130 y MV140 actúan directamente sobre las DCs humanas favoreciendo la generación de respuestas de tipo Th1 y Th17 potencialmente implicadas en la eliminación de patógenos intracelulares y extracelulares, respectivamente. Ambas PBP también inducen, en DCs humanas, la producción de elevados niveles de IL-10 y favorecen la generación de células T productoras de IL-10, lo que contribuye a crear un entorno antiinflamatorio tras las respuestas efectoras iniciales, evitando así respuestas inmunes excesivas que podrían ser perjudiciales para el organismo y contribuyendo a la eliminación completa de los patógenos. Nuestros resultados revelan que, aunque ambas PBPs generan respuestas fenotípicas y funcionales similares, los mecanismos inmunológicos implicados son diferentes dependiendo de la composición bacteriana de cada uno de los preparados. Utilizando técnicas ómicas combinadas con experimentos inmunológicos funcionales tanto *in vitro* como *ex vivo*, nuestros resultados demuestran que MV130 (90% Gram positivas, 10% Gram negativas) es capaz de modular la función de las DCs humanas actuando a través de TLRs (*toll-like receptors*) y NLRs (*NOD-like receptors*) que señalizan por medio de MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) y RIPK2 (*receptor interacting serine/threonine kinase 2*), respectivamente. Por otro lado, MV140 (25% Gram positivas, 75% Gram negativas) actúa fundamentalmente vía CLR (C-type lectin receptors) acoplados a Syk (*spleen tyrosine kinase*) en cooperación con TLRs que señalizan vía MyD88.

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que MV130 y MV140 inducen la generación de respuestas Th1, Th17 y células T productoras de IL-10 que podrían contribuir a eliminar patógenos y a mantener homeostasis en el tracto respiratorio y urinario, respectivamente. Nuestros resultados demuestran que los mecanismos inmunológicos implicados a nivel molecular son diferentes para cada PBP y dependientes de la composición bacteriana de los preparados. La investigación traslacional de los hallazgos moleculares descritos en esta Tesis Doctoral podría contribuir, en un futuro, a diseñar nuevas vacunas específicas en cuanto a composición bacteriana y mecanismos de acción se refiere. El conocimiento de los mecanismos inmunológicos que subyacen al modo de acción de MV130 y MV140 podría ser también de gran utilidad para su utilización y/o diseño de nuevos preparados que pudieran emplearse en el tratamiento de otras patologías donde las infecciones recurrentes jueguen un papel determinante en el pronóstico del paciente. La utilización de estas vacunas específicas de composición y mecanismos de acción definido podría contribuir, en un futuro próximo, a implementar el concepto de medicina personalizada.

ABSTRACT

Recurrent respiratory tract infections (RRTIs) and recurrent urinary tract infections (RUTIs) are the most common infections worldwide with a significant mortality rate. RRTIs and RUTIs represent a major health problem with a very high socioeconomic impact. Up to date, antibiotics remain the mainstay of treatment and they show clinical efficacy in many cases. However, RRTIs and RUTIs require repeated and prolonged antibiotic cycles, further increasing the risk to develop antibiotic resistances. Other negative factors associated to the overuse of antibiotics include deleterious effects for the normal microbiome, which favour pathogen invasion and subsequent bacterial and fungal superinfections. Therefore, the last reports from the World Health Organization (WHO) stated that there is an urgent need for new alternative approaches to antibiotics for the prevention and treatment of RRTIs and RUTIs able to overcome the main drawbacks associated to the overuse of antibiotics. At this regard, mucosal bacterial vaccines have demonstrated efficacy in the prevention and treatment of recurrent infections as they can potentiate immune responses both at the site of administration as well as in distant tissues, thus contributing to avoid the pathogen colonization and infection at their natural site of entrance.

Recent studies showed that sublingual immunizations with MV130 (Bactek®) and MV140 (Uromune®), polybacterial preparations (PBPs) based on whole inactivated components from Immunotek S.L., significantly reduced the infection rates in patients suffering from RRTIs and RUTIs, respectively. MV130 is composed of different proportions of whole heat-inactivated Gram-positive and –negative bacteria often present in the respiratory tract and causing the majority of upper and lower respiratory infections in Europe (90% Gram-positive: 60% *Streptococcus pneumoniae*, 15% *Staphylococcus aureus*, 15% *Staphylococcus epidermidis*; 10% Gram-negative: 4% *Klebsiella pneumoniae*, 3% *Moraxella catarrhalis* and 3% *Haemophilus influenzae*). MV140 is composed of different proportions of whole heat-inactivated Gram-positive and –negative bacteria often causing urinary infections (75% Gram-negative bacteria: 25% *Escherichia coli*, 25% *Proteus vulgaris*, 25% *Klebsiella pneumoniae*; and 25% Gram-positive bacteria: *Enterococcus faecalis*). Clinical data showed that both MV130 and MV140 significantly reduced the rate of infections in RRTIs and RUTIs patients, respectively. However, the immunological ways of action remain fully elusive. Both specific and nonspecific mechanisms might well cooperatively contribute to the observed clinical benefits. The sublingual epithelium contains a dense network of dendritic cells (DCs) that play an essential role linking innate and adaptive immune responses. Considering all these aspects, the global aim of this Doctoral Thesis is focused on the elucidation of the immunological mechanisms of action involved in the clinical benefit reported for MV130 and MV140. In particular, in this work we focused on the study of the immunological mechanisms involved in the capacity of MV130 and MV140 to immunomodulate the phenotype and function of human DCs, including their capacity to polarize T cell responses at the molecular level.

The results obtained in this Doctoral Thesis demonstrated for the first time that MV130 and MV140 directly act on human DCs promoting the generation of Th1 and Th17 responses, which could contribute to enhance immune responses against intracellular and extracellular pathogens, respectively. Both PBPs also induced the production of high levels of IL-10 by human DCs and the generation of IL-10-producing T cells, which favor an anti-inflammatory environment that avoid excessive deleterious responses harmful for the tissues and contribute to the final clearance of pathogens. Although MV130 and MV140 generate very similar phenotypic and functional immune responses, the underlying molecular mechanisms are different depending on the bacteria composition of each preparation. By combining omic techniques with functional immunological *in vitro* and *ex vivo* experiments, our data uncovered that MV130 (90% Gram positive, 10% Gram negative) is able to modulate the function of human DCs through TLRs (toll-like receptors) and NLRs (NOD-like receptors) down-stream signaling pathways regulated by MyD88 (myeloid differentiation primary response 88) and RIPK2 (receptor Interacting serine/threonine kinase 2), respectively. In contrast, MV140 (75% Gram negative, 25% Gram positive) mainly act on Syk (spleen tyrosine kinase)-coupled CLR (C-type lectin receptors) in cooperation with MyD88-coupled TLRs.

In summary, in this Doctoral Thesis we showed that MV130 and MV140 induce the generation of Th1, Th17 and IL-10-producing T cells that could contribute to pathogen clearance and to keep homeostasis in the respiratory and urinary tracts, respectively. Our data uncover that the immunological mechanisms underlying these effects are different for each PBP and totally dependent on the specific bacteria composition. The translational research of these molecular findings could contribute, in the future, to the design of novel specific PBPs based on specific bacterial components and molecular mechanisms of action. The understanding of the immunological mechanisms underlying the clinical benefits of MV130 and MV140 at the molecular level, might well also help to the design of alternative treatments to antibiotics in many other clinical conditions with a high risk of recurrent infections. The use of these specific vaccines with well-defined composition based on the specific molecular mechanisms of action might well also contribute to implement the concept of personalized medicine in a near future.

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ag: antígeno

ARN: ácido ribonucleico

AP-1: proteína activadora 1, *activator protein-1*

APC: aloficocianina

APC: célula presentadora de antígeno

BDCA: *blood DC antigen*

BFA: brefeldina A

BSA: albúmina de suero bovino, *bovine serum albumin*

CD: grupo de diferenciación, *cluster of differentiation*

CFSE: carboxyfluorescein succinimidyl éster

CLRs: receptores de lectina tipo C, *C-type lectin receptors*

CTLD: dominios de lectina tipo C, *C-type lectin-like domains*

Ctrl: control

DCs: células dendríticas

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DO: densidad óptica

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EF1- α : factor de elongación 1 α , *elongation factor 1 α*

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FBS: suero fetal bovino, *fetal bovine serum*

FDR: tasa de falsos positivos, *false discovery rate*

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FOXP3: factor de transcripción *forkhead box P3*

g: fuerza centrífuga relativa

Gata-3: factor de transcripción *GATA binding protein 3*

GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocito macrófago

HLA-DR: *human leukocyte antigen-antigen D related*

hmoDCs: células dendríticas derivadas de monocitos

HRP: peroxidasa de rábano, *horseradish peroxidase*

Ig: inmunoglobulina

iE-DAP: *γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*

IκB: inhibidor de κB

IKK: IκB quinasa

IL: interleukina

INF: interferón

IRFs: factores reguladores de interferón, *interferon regulatory factors*

IU: infecciones urinarias

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

mDCs: células dendríticas mieloides

MDP: progenitor común de macrófagos y células dendríticas, *macrophage and dendritic cell common precursor*

MDPs: *muramyl dipeptides*

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

MyD88: *myeloid differentiation primary response 88*

NF- κ B: factor de transcripción nuclear kappa-B, *nuclear factor kappa B*

NLRs: receptores de tipo NOD, *NOD-like receptors*

NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*

OPD: *o*-fenilendiamina

PAGE-SDS: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: células sanguíneas periféricas mononucleares

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pDCs: células dendríticas plasmacitoides

PGN: peptidoglicano

PE: ficoeritrina

PerCP: *peridinin Chlorophyll Protein Complex*

PMA: forbol-12-miristato-13-acetato

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PBP: preparación bacteriana polivalente, *polybacterial preparations*

PRRs: receptores de reconocimiento de patógenos, *pattern recognition receptors*

RIN: *RNA integrity number*

RIPK2: *receptor interacting serine/threonine kinase 2*

RLRs: receptores de tipo RIG-1, *RIG-I-like receptors*

RORC2: *retinoic acid receptor-related orphan receptor C2*

RRTIs: infecciones recurrentes del tracto respiratorio, *recurrent respiratory tract infections*

RTIs: infecciones del tracto respiratorio, *respiratory tract infections*

RUTIs: infecciones recurrentes del tracto urinario, *recurrent urinary tract infections*

SAMPs: *self-associated molecular patterns*

SDS: dodecil sulfato sódico

SOCS: supresor de señalización de citoquinas, *suppressor of cytokine signalling*

SPRRs: *self-PRRs*

T-Bet: *t-box transcription factor*

TCR: receptor de células T

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

Th: célula T colaboradora

TLRs: receptores de tipo Toll, *Toll-like receptors*

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

Treg: célula T reguladora

UTIs: infecciones del tracto urinario, *urinary tract infections*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades infecciosas del tracto respiratorio y del tracto urinario

Las enfermedades infecciosas del tracto respiratorio (RTIs, *respiratory tract infections*) y del tracto urinario (UTIs, *urinary tract infections*) constituyen un problema de trascendencia extraordinaria en la salud pública (1, 2). En conjunto, estas enfermedades representan algunas de las entidades que con mayor frecuencia obligan a los pacientes a acudir a médicos de atención primaria. Algunas de estas infecciones suelen ser cuadros benignos, pero su elevada incidencia y su alto índice de contagio las colocan entre las causas principales de absentismo laboral o escolar (1, 3). No obstante, la agudización de estas infecciones está asociada con un empeoramiento significativo de la calidad de vida del paciente, provocando en los casos más extremos incluso la muerte. De forma general, estas enfermedades son causadas por microorganismos patógenos como las bacterias, los virus, los parásitos o los hongos (4-6).

1.1. Infecciones respiratorias (RTIs)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017), las infecciones de las vías respiratorias son responsables de 6,3 millones de muertes al año (1, 7). Las RTIs son las enfermedades infecciosas nosocomiales y comunitarias más comunes en niños y adultos; siendo especialmente habituales en los primeros años de vida, debido principalmente a un sistema inmune inmaduro (8, 9). Además, factores ambientales como el contacto con el humo del tabaco o la contaminación del aire, contribuyen al desarrollo de estas enfermedades ya que pueden alterar significativamente la estructura pulmonar, incrementando así el riesgo de exposición a patógenos (10-12).

Según el agente etiológico, las RTIs se pueden diferenciar en infecciones víricas o bacterianas. Por un lado, las infecciones víricas encabezan la primera causa de RTIs, y son provocadas por el virus influenza y parainfluenza, virus respiratorio sincitial, adenovirus y rinovirus. Por otro lado, estas infecciones también pueden ser originadas por diversos tipos de bacterias como *Chlamydia pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (13). Estas últimas pueden inducir o exacerbar el asma bronquial y enfermedades pulmonares pre-existentes (4, 14, 15).

Las infecciones de las vías respiratorias se pueden clasificar en infecciones de las vías respiratorias altas y bajas (**Figura I.1**). Las enfermedades de las vías respiratorias altas son las más frecuentes en niños, siendo las más comunes: rinitis, sinusitis, otitis, laringitis y faringitis.

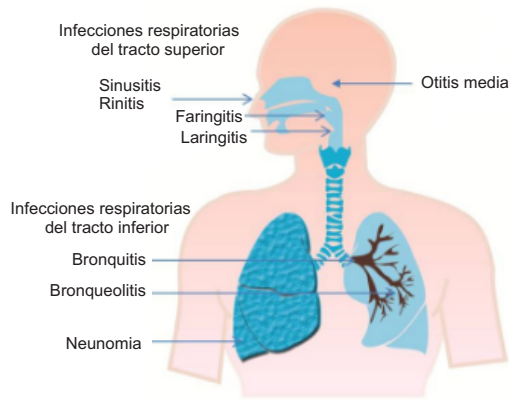


Figura I.1 Localización de las infecciones respiratorias (RRTIs) más frecuentes de las vías altas y bajas.

En cambio, las enfermedades más comunes de las vías respiratorias bajas son: neumonías, bronquitis y bronquiolitis (**Figura I.1**).

Dentro de las RTIs, las enfermedades clínicamente más relevantes son: las exacerbaciones agudas durante la bronquitis crónica o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y las infecciones respiratorias recurrentes

1.1.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

La EPOC es una enfermedad que merece especial atención debido a que es una de las principales epidemias mundiales y la tercera causa de muerte en el mundo (16). La EPOC es una enfermedad crónica inflamatoria del pulmón que se caracteriza por una progresiva e irreversible limitación del flujo de aire que suele ir acompañada de destrucción del parénquima pulmonar (9). Además, los pacientes con EPOC presentan frecuentes exacerbaciones asociadas a un deterioro del pulmón, siendo las infecciones causadas por bacterias y virus desencadenantes del 75% de las mismas. Las principales bacterias implicadas son: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Chlamydia pneumoniae* (4). Estudios recientes muestran que los pulmones de pacientes con EPOC, a diferencia de pulmones de individuos sanos, poseen una menor diversidad bacteriana; y en algunos casos, una mayor carga total bacteriana provocando una disbiosis (17). El gran consumo de antibióticos en estos pacientes puede estar asociado a disbiosis, lo que provoca una alteración significativa en la microbiota, contribuyendo al crecimiento de bacterias oportunistas (18-20).

1.1.2. Infecciones recurrentes del tracto respiratorio (RRTIs)

Las RRTIs se atribuyen a la incapacidad del sistema inmune de orquestar respuestas inmunes adecuadas, locales o sistémicas, frente a patógenos. Además, existen otros motivos como los trastornos pulmonares causados por alteraciones estructurales, funcionales o factores ambientales. Estos últimos, incluyen la deficiencia de nutrientes como el zinc, la contaminación por metales pesados, un historial de alergias y la salud materna durante el embarazo (21). Generalmente, las RRTIs se definen según el siguiente criterio: tres o más episodio de rinitis, faringitis y amigdalitis en un año; dos o más infecciones del oído y/o bronquitis en un año con ausencia de alergia; un episodio de neumonía por año durante más de un año; exacerbaciones provocadas por EPOC; infecciones víricas recurrentes (resfriados y herpes) (22). Los pacientes que sufren RRTIs suponen un gran problema de salud debido a que estas infecciones pueden

causar complicaciones tales como trastornos autoinmunes y septicemia, empeorando la calidad de vida de los pacientes. Además, el uso de recursos sanitarios en el cuidado, los largos periodos de recuperación y la atención que estos pacientes requieren, suponen un gran coste económico para el sistema sanitario (6). Por último, el consumo excesivo de antibióticos contribuye a un aumento en la frecuencia de resistencias frente a los mismos, lo que influye muy negativamente en la calidad de vida de los pacientes, y con graves consecuencias en el sector de salud pública (8). Actualmente, los antibióticos son los fármacos más recomendados. Sin embargo, las tasas crecientes de resistencia a los antibióticos y altas tasas de recurrencia de esta patología amenaza con aumentar la carga que estas infecciones suponen a la sociedad (23-25).

1.2. Infecciones del tracto urinario (UTIs)

Las UTIs son las infecciones bacterianas más comunes, siendo un gran problema de salud pública que afecta a 150-250 millones de personas cada año en todo el mundo (2, 26, 27). Estudios recientes parecen indicar que entre el 40-50% de las mujeres y un 5% de los hombres podrían desarrollar un episodio de UTIs en su vida (27, 28). Además, al menos una cuarta parte de estos pacientes podría tener una recurrencia en el año siguiente, y el 22% infecciones recurrentes del tracto urinario (RUTIs). Las RUTIs se definen como tres o más infecciones en un año, o dos o más en seis meses (29, 30).

Clínicamente, las UTIs se clasifican en no complicadas o complicadas. Las UTIs sin complicaciones suelen afectar a individuos sanos que no tienen anormalidades estructurales o neurológicas del tracto urinario. Según la localización de la infección, se diferencian en cistitis (UTIs de zonas bajas) y pielonefritis (UTIs de zonas altas). En cambio, las UTIs complicadas se definen como aquellas que están asociadas a factores que comprometen el aparato urinario o la defensa del organismo, como por ejemplo la obstrucción urinaria o la insuficiencia renal (26). La patogénesis de una UTI puede comenzar con la adherencia del uropatógeno desde el intestino a las células uroepiteliales, seguido por la colonización de la uretra y posterior migración del patógeno a la vejiga (**Figura I.2**). En la vejiga, se determinará si el uropatógeno es eliminado, o por el contrario, continua su colonización por el tracto urinario (26, 27).

Las bacterias Gram positivas, Gram negativas y algunos hongos son los principales causantes de las UTIs. Entre los organismos Gram-negativos, *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) causa la mayoría de las UTIs adquiridas en la comunidad y en los hospitales. Otros patógenos muy frecuentes son *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp*, *Enterococcus spp* y *Candida spp* (4, 26, 28, 31).

En los últimos años, se han desarrollado diversos tratamientos para prevenir las UTIs; estos se clasifican en aquellos que previenen la colonización, como los estrógenos, el lactobacilus

y la vitamina C, y tratamientos que previenen la adherencia, como por ejemplo los arándanos y la D-manosa (32). Sin embargo, el tratamiento comúnmente más usado por los pacientes que sufren UTIs son antibióticos como por ejemplo el trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) y los fluoroquinolones (28). Pero estos tratamientos pueden provocar alteraciones a largo plazo de la microbiota vaginal y del tracto gastrointestinal, aumentando el riesgo de colonización por patógenos. Además, como se ha comentado para el caso de las RRTIs, un consumo excesivo de los antibióticos da lugar al desarrollo de microorganismos resistentes a múltiples fármacos (27).

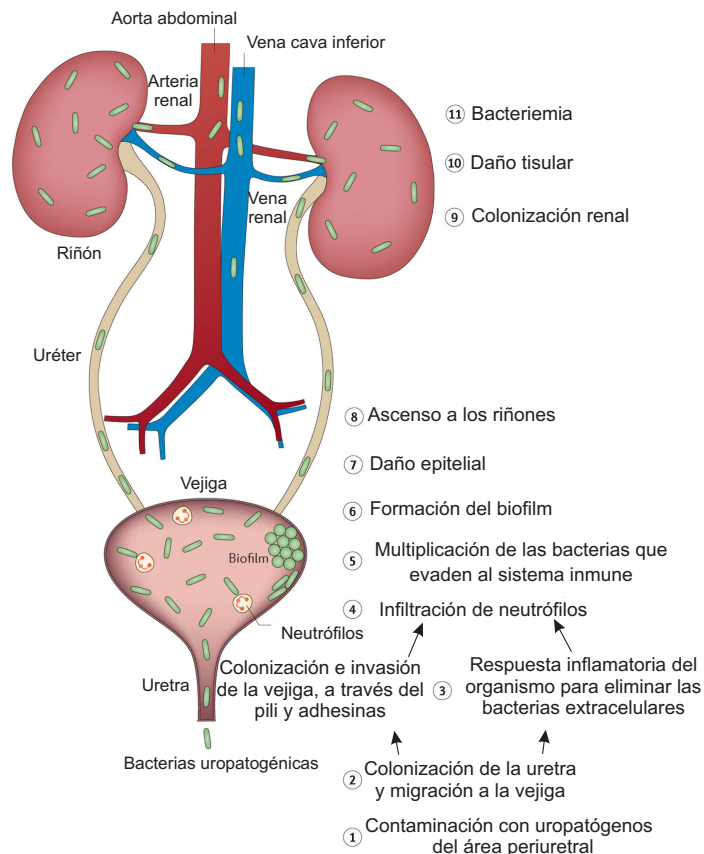


Figura 1.2 Las infecciones urinarias comienzan cuando los uropatógenos que residen en el intestino contaminan el área periuretral (etapa 1) y son capaces de colonizar la uretra. La migración a la vejiga (etapa 2) y la expresión de pili y adhesinas favorece la colonización e invasión de las células uroepiteliales (etapa 3). Las respuestas inflamatorias del organismo (etapa 4) inducen la eliminación de bacterias extracelulares. Las bacterias que escapan del sistema inmune se multiplican (paso 5) dando lugar a la formación de biofilm (paso 6). Estas bacterias producen toxinas y proteasas que inducen daño celular (paso 7), liberando nutrientes esenciales que promueven la supervivencia bacteriana y la ascensión a los riñones (paso 8). La colonización renal (etapa 9) produce daño tisular del organismo (etapa 10). Si no se trata, las IU pueden progresar a bacteriemia (etapa 11). Adaptado de *Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015;13(5):269-84 (26).*

Tanto las RRTIs como las RUTIs afectan de manera muy negativa la calidad de vida de los pacientes y producen considerables gastos económicos en la salud pública (2, 3). Hasta la fecha, el tratamiento de referencia para combatir estas infecciones consiste en la administración repetida y prolongada de numerosos ciclos de antibióticos.

2. Resistencia a los antibióticos

Desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming a finales de la década de 1920, los antibióticos han revolucionado el campo de la medicina. Éstos han salvado millones de vidas cada año, aliviado el dolor y el sufrimiento de muchos pacientes, e incluso han sido utilizados profilácticamente para la prevención de enfermedades infecciosas (33).

Según el informe *The State of the World's Antibiotics* publicado por el CDDEP (*Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*) en 2015, el consumo de los antibióticos se extiende tanto al ámbito humano como al animal (34). Por una lado, en el ámbito humano, los antibióticos presentan un amplio rango de acción; desde tratar infecciones graves hasta proteger a pacientes con cáncer, prevenir infecciones en pacientes quirúrgicos y en personas con el sistema inmune comprometido. Por otro lado, los antibióticos previenen enfermedades infecciosas en el ganado y en otros animales destinados al consumo (24).

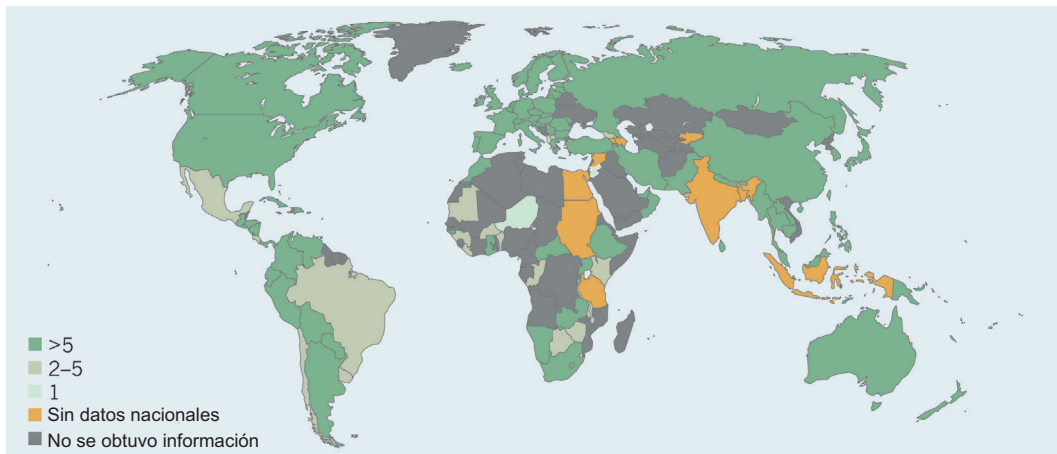


Figura I.3 Mapa mundial que refleja el número de bacterias resistentes a los antibióticos en el mundo. *Adaptado de Antibiotic resistance sweeping developing world Nature. 2014;8(509):141-2 (25).*

Sin embargo, de acuerdo con informes recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del *World Economic Forum* (WEF), actualmente, se están produciendo miles de muertes anuales debido a una pérdida en la eficacia de algunos antibióticos, originada por un aumento de las bacterias resistentes frente a estos (**Figura I.3**) (25). En el WEF celebrado en 2017 se anunció que la resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud humana (35). Se calcula que en Europa, 25.000 personas mueren cada año como resultado de bacterias resistentes a múltiples fármacos. En términos económicos las resistencias a antibióticos representan un gasto de 1.500 millones de euros anuales a la Unión Europea. En Estados Unidos más de 2 millones de personas se infectan cada año con bacterias resistentes a antibióticos de las cuales 23.000 mueren (36). La resistencia a los antibióticos es causada no sólo por su consumo excesivo, sino también por su uso en los sistemas de producción animal y en la agricultura (37-39). Por ejemplo, son especialmente preocupantes bacterias como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina,

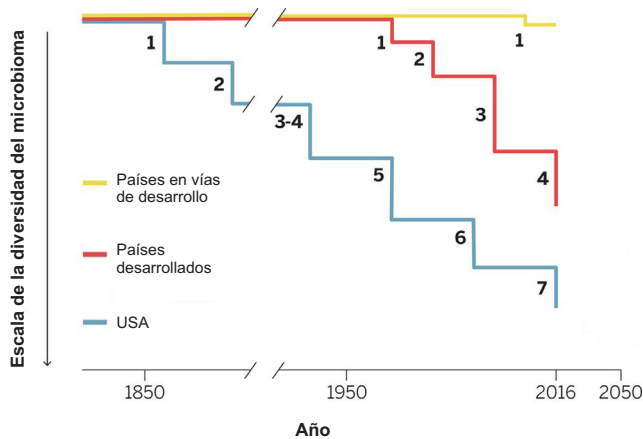


Figura I.4 Modelos de cambio de la diversidad de la microbiota en distintas sociedades. La escala es arbitraria y refleja el número de especies perdidas. Se observa una pérdida progresiva y acumulativa de diversidad. Cada línea representa un promedio. Dentro de cada generación hay variación en las posiciones individuales. Adaptado de *Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. Science. 2016;352(6285):544-5 (41).*

Clostridium difficile, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos y bacterias como *Escherichia coli* capaces de producir β -lactamasas de amplio espectro (33, 40).

Otro de los factores negativos asociados al consumo excesivo de antibióticos es el efecto perjudicial que producen en nuestro microbioma, lo que favorece la invasión y las infecciones por hongos y bacterias.

Como se observa en la **figura I.4**, desde la introducción del uso de antibióticos, en los países desarrollados se ha producido un descenso en la diversidad de la microbiota, es decir, del conjunto de microorganismos comensales que se encuentran frecuentemente en organismos sanos. De hecho, la Casa Blanca ha emitido planes de acción de lucha contra las bacterias resistentes a los antibióticos, donde incluye el papel potencial que tiene la microbiota en la lucha contra la resistencia a antibióticos (23, 24, 41, 42).

2.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes a ciertos antibióticos, o por el contrario, pueden adquirir resistencias mediante dos vías: verticalmente, transfiriendo las mutaciones cuando una célula se replica; y horizontalmente, cuando los genes se transmiten de una célula a otra en fragmentos de ADN circular llamados plásmidos (24, 43). Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para escapar de los efectos de los antibióticos:

- Inactivación enzimática: produciendo enzimas que neutralizan a los antibióticos (36, 39).
- Modificación de dianas antimicrobianas a través de mutaciones, evitando que los antibióticos las reconozcan (36, 39).
- Aumento de la salida de antibióticos: resistencia por eflujo (36, 39).
- Implantación de biofilms, previniendo la entrada de los antibióticos (39).

Los pacientes que sufren RRTIs y RUTIs necesitan repetidos y prolongados ciclos de antibióticos para combatir las infecciones que conllevan un aumento de la resistencia a estos

tratamientos y supone un gran impacto negativo en la vida del paciente. La disminución de la eficacia de los antibióticos ha pasado de ser un problema menor a una fuerte amenaza. Teniendo en cuenta estas consideraciones, urge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas (4, 5, 44). De entre ellas, las vacunas bacterianas administradas a través de las mucosas han demostrado una alta eficacia, ya que incrementa la respuesta inmune y mejoran los mecanismos de defensa innatos del organismo (4, 5, 14, 45-47).

3. Vacunas bacterianas administradas en la mucosa

Muchos estudios han demostrado que vacunas compuestas por distintas formulaciones bacterianas y administradas vía mucosas son capaces de estimular todos los brazos del sistema inmune (4). Dentro del sistema inmune se puede diferenciar entre inmunidad innata y adaptativa, aunque existe una estrecha relación entre ambas. El sistema inmune innato es un sistema universal de defensa frente a patógenos y constituye la primera línea de defensa del organismo (48). Está formado por: componentes celulares (células epiteliales, monocitos, células dendríticas (DCs), macrófagos, neutrófilos y células *Natural Killer* (NK)) y sistemas de activación como los sistemas del complemento, de la coagulación, fibrinolítico y citoquinas. A diferencia del sistema inmune innato, el sistema inmune adaptativo es altamente específico, confiere memoria e incluye componentes celulares (linfocitos T y B) y humorales (anticuerpos) (49, 50).

Las vacunas bacterianas representan herramientas prometedoras para el tratamiento y prevención de infecciones adquiridas a través de las mucosas y otras vías (4). Además, los inmunomoduladores bacterianos pueden producir una estimulación inespecífica del sistema inmune innato y específica del sistema inmune adaptativo, afectando tanto a la respuesta celular como a la humoral, por tanto, ofrecen una nueva vía para establecer terapias antimicrobianas, ya que pueden estimular los mecanismos de defensa del organismo y prevenir de esta forma determinadas enfermedades víricas, bacterianas y fúngicas (51).

3.1. Mucosa y sistema inmune asociado a las mucosas

La mucosa está formada por el epitelio y el tejido conjuntivo laxo subyacente (lámina propia) que reviste las paredes internas de los órganos y cubren los tractos aerodigestivo y urogenital, así como la conjuntiva del ojo y el oído interno (52). Representa aproximadamente una superficie de 400 m² y es la principal vía de entrada de patógenos tras ingestión, inhalación o contacto sexual (4).

El sistema inmune de las mucosas consiste en una red integrada de tejidos, células linfoides y no linfoides, y moléculas efectoras que incluyen anticuerpos, quemoquinas y citoquinas, responsables de orquestar respuestas inmunes innatas y adaptativas apropiadas frente a patógenos y agentes inocuos (52). Una característica muy importante del sistema inmune de la mucosa es que

forma una red muy compleja de componentes altamente especializados y compartimentalizados del sistema inmune innato y adaptativo, llamado MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa). El MALT incluye: el tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT), el tejido linfoide asociado al bronquio, el tejido linfoide asociado a la cavidad oral (las amígdalas) y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Este último está compuesto por las placas de Peyer y los folículos linfoides aislados (MALT tipo 1). El tejido linfoide asociado al ojo y el tejido linfoide asociado al área urogenital tienen una arquitectura inmune más difusa (MALT tipo 2) (52). El MALT mantiene un equilibrio constante con las bacterias comensales (microbiota) y permanece en alerta ante la invasión de patógenos mediante las células presentadoras de antígeno (APC) que incluyen las DCs, los macrófagos y las células B. Las cuatro funciones principales del sistema inmune de la mucosa son las siguientes (53-55):

- Protege contra la colonización e invasión de microbios potencialmente peligrosos. Para ello, la mucosa ejerce de barrera gracias a la secreción de péptidos antimicrobianos o defensinas por parte de las células epiteliales. Además, la mucosa contiene células del sistema inmune innato como neutrófilos fagocíticos y macrófagos, DCs, células NK y mastocitos que contribuyen a la defensa frente a patógenos y a la iniciación de respuestas adaptativas (52, 54).
- Previene la absorción de antígenos no degradados como proteínas derivadas de alimentos ingeridos, materia del aire, y microorganismos comensales (52, 54).
- Induce tolerancia frente a antígenos inocuos (52).
- Evita el desarrollo de respuestas dañinas para el organismo en caso de que los antígenos sean capaces de atravesar la mucosa (52).

Teniendo en cuenta todas estas características, las superficies de las mucosas representan rutas muy prometedoras para la vacunación (4, 5).

3.2. Vacunas de origen bacteriano

La vacunación es un proceso de estimulación inmune específica activa en el que se establece memoria inmunológica para combatir infecciones (56). En la actualidad, muchas vacunas que se administran vía parenteral generan linfocitos T de memoria y linfocitos B que producen anticuerpos contra el patógeno, con el fin de proteger al organismo en caso de que se produzca otra infección (4, 57). Sin embargo, las vacunas bacterianas administradas a través de las mucosas han despertado gran atención por parte de la comunidad científica y médica en los últimos años para el tratamiento de infecciones recurrentes respiratorias, urogenitales y periodontales (4). El éxito de estas vacunas se debe en gran parte a su capacidad para inducir respuestas inmunes efectoras que

permitan la eliminación del patógeno, generando posteriormente respuestas antiinflamatorias que contribuyen a mantener la homeostasis (4, 5). Estas vacunas son capaces de inducir por un lado respuestas inmunes adaptativas-específicas como la generación de anticuerpos específicos contra los componentes que forman la vacuna y por otro, la inducción de respuestas celulares. Además, los productos derivados de bacterias que componen la vacuna tienen la capacidad de actuar como inmunomoduladores no específicos (**Figura I.5**) (5, 58-60). Las vacunas bacterianas se pueden clasificar atendiendo a distintos parámetros como su composición y vía de administración.

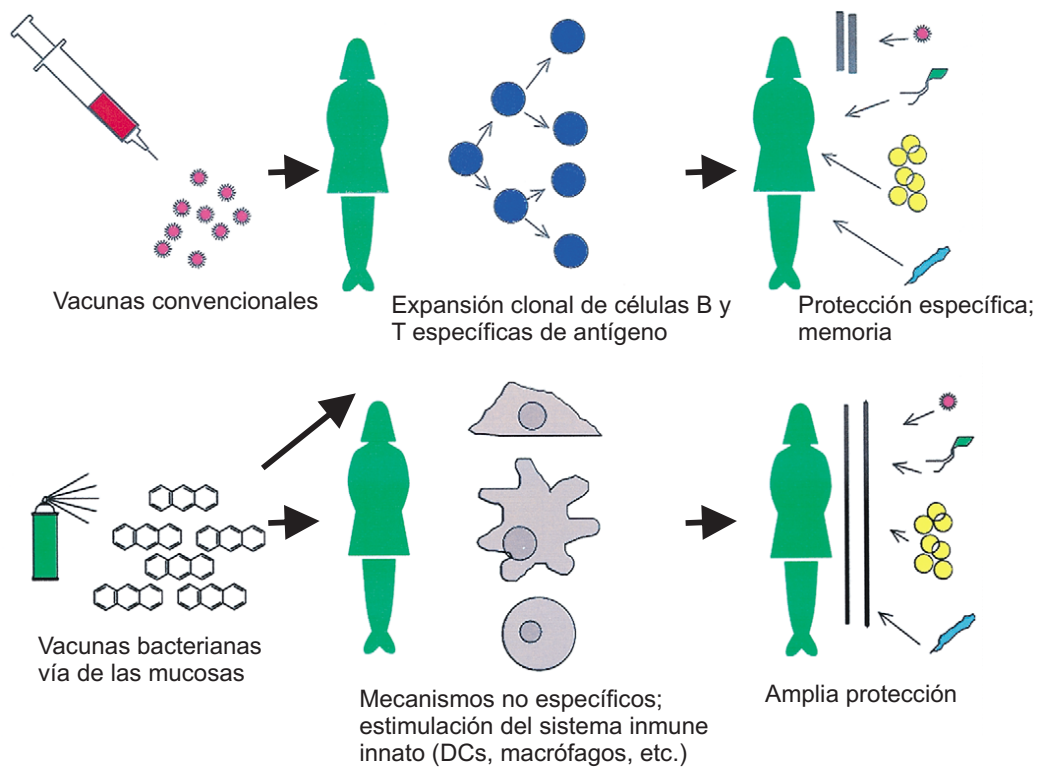


Figura I.5 Comparación de los mecanismos de la vacunación convencional con las vacunas bacterianas administradas a través de mucosas. La vacunación convencional utiliza patógenos completos atenuados o sus subunidades para expandir las células B y T específicas del antígeno, desarrollando protección específica a largo plazo y altamente eficaz. Las vacunas bacterianas vía de mucosas, además de inducir respuestas antígeno específicas, activan las células del sistema inmune de una manera no específica para proporcionar una protección rápida y amplia contra muchos otros patógenos potenciales. Adaptado de *Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy Prospects and research challenges. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2003;112(4):686-94* (51).

De acuerdo a su composición, las vacunas bacterianas pueden contener antígenos solubles (lisados bacterianos) o bacterias enteras inactivadas de una o más especies o cepas (55). Las vacunas basadas en preparaciones bacterianas polivalentes enteras e inactivadas (PBPs) conducen a una estimulación más potente y eficaz del sistema inmune comparadas con las vacunas basadas en lisados bacterianos (4, 5, 61, 62). En su ambiente natural, la mayoría de las bacterias no viven como elementos aislados unos de otros, sino que viven como organismos multicelulares y coordinados a través de distintas señales *quorum sensing*. Es por eso que la probabilidad de éxito es significativamente mayor cuando se utilizan las PBPs que vacunas formadas por bacterias únicas (63, 64).

3.3. Vías de administración: mucosa sublingual

La administración de las vacunas bacterianas a través de la mucosa, tales como la vía oral, nasal, sublingual, intrarrectal o vaginal, evita problemas relacionados con la administración parenteral (uso de agujas, dolor, empleo de personal calificado y los altos costos de infraestructura), siendo un procedimiento menos invasivo y más atractivo para su uso en niños y en pacientes inmunodeprimidos.

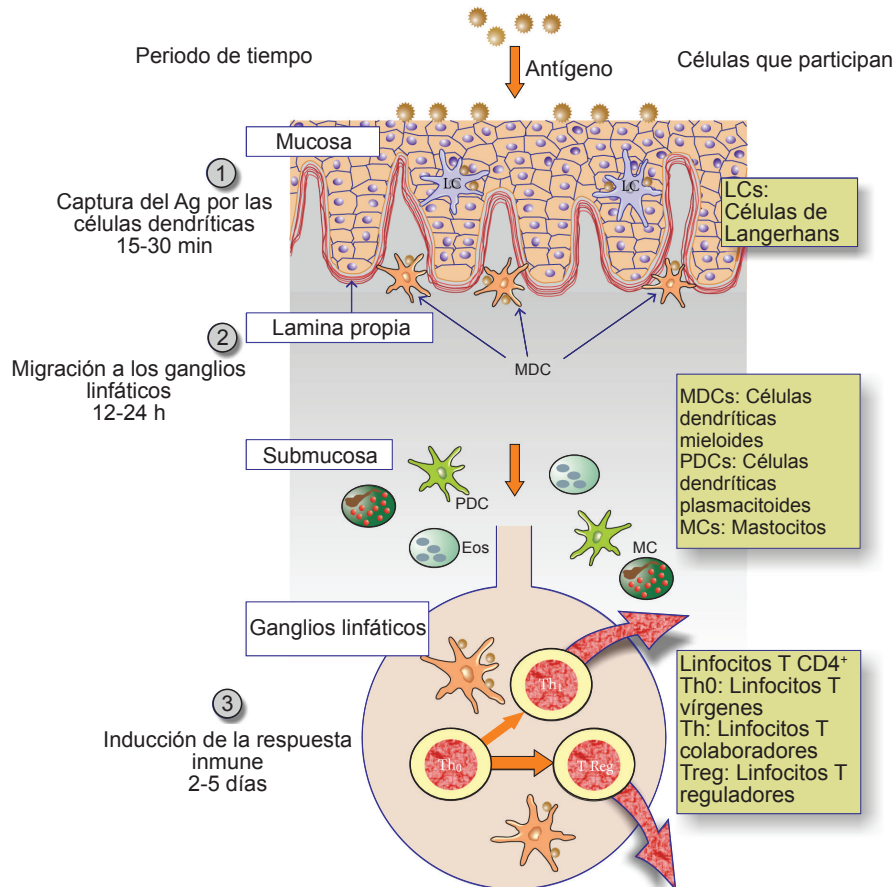


Figura I.6 Administración de antígenos por vía sublingual. El antígeno se une a las células epiteliales para cruzar la mucosa. Posteriormente, es capturado por las DCs y es procesado como péptidos pequeños presentados en asociación con moléculas de clase I y clase II (MHC) en la superficie celular. Aquellas DCs cargadas con péptidos derivados de antígenos alcanzan los ganglios linfáticos en 12-24 h, donde interactúan con células T CD4⁺ vírgenes para diferenciarse a células T colaboradoras y/o T reguladoras (2-5 días). Estas células T CD4⁺ migran posteriormente a la sangre y de vuelta a los tejidos de la mucosa, generando una respuesta inmune inflamatoria o tolerogénica. Adaptado de *Induction of Tolerance via the Sublingual Route: Mechanisms and Applications. Clinical and Developmental Immunology* 2011;2012(623474):1-8 (69).

La vía oral es una de las vías más frecuentes de administración de vacunas bacterianas, capaz de inducir una respuesta inmune local a nivel de la mucosa y una respuesta limitada en tejidos distantes. Sin embargo, esta vía está condicionada por la degradación del antígeno en el tracto gastrointestinal por las enzimas digestivas (65). En los últimos años, existe un interés creciente en el empleo de nuevas vías de administración tales como la vía nasal y vía sublingual (4). La vía intranasal ha demostrado ser eficaz para estimular el sistema inmunológico respiratorio, induciendo respuestas humorales y celulares frente a los antígenos (66). Además, una de las

grandes ventajas de esta ruta es que requiere menos carga del antígeno para inducir una respuesta inmune mayor que en la vía oral, donde el antígeno está sometido a degradación. Sin embargo, distintos estudios han demostrado que los antígenos pueden ser reconducidos al sistema nervioso central a través del epitelio olfativo, produciendo una parálisis facial en el paciente. (4, 55, 57, 67, 68).

Diversos estudios han demostrado que la vía sublingual tiene un gran potencial debido a la producción de anticuerpos IgG e IgA y una respuesta de linfocitos T citotóxicos en los órganos linfoides periféricos y los tejidos de la mucosa (57). La vía sublingual se ha utilizado con éxito durante muchos años como una inmunoterapia no invasiva y eficaz para el tratamiento de enfermedades alérgicas (52, 69). Además, se ha propuesto como una alternativa atractiva para la inmunización con vacunas bacteriana. Las respuestas generadas por la vía sublingual han demostrado una alta eficacia, ya que son capaces de potenciar el sistema inmune asociado a las mucosas de manera local y en tejidos distantes, mejorando así los mecanismos de defensa del organismo frente a patógenos que afectan distintos tipos de tejidos. Por otra parte, esta ruta en comparación con la vía oral, intranasal, intrarrectal o intravaginal de la mucosa, ofrece varias ventajas como la viabilidad y la seguridad (65, 67). El desarrollo de vacunas sublinguales de nueva generación producidas a partir de combinaciones de bacterias enteras inactivadas puede hacer posible el uso de vacunas administradas a través de la mucosa como agentes no sólo profilácticos sino terapéuticos, ampliando así su uso en la práctica clínica (**Figura I.6**) (70, 71).

3.4. Modo de acción: vacunas bacterianas empleadas en la práctica clínica

Actualmente, como se observa en la **tabla I.1**, existen distintos tipos de vacunas de origen bacteriano administradas a través de la mucosa comercializados para el tratamiento de RRTIs y RUTIs (4).

Entre las vacunas incluidas en la **tabla I.1**, cabe destacar Broncho-Vaxom® (OM-85) formada por fracciones de 21 cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas que se localizan frecuentemente en el tracto respiratorio inferior (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* y *Neisseria catarrhalis*) (72). Diversos estudios han demostrado que la administración vía oral de OM-85 previene las infecciones recurrentes respiratorias, tales como infecciones agudas víricas como por ejemplo el catarro común, y combate las exacerbaciones provocadas por EPOC (72). Varios estudios clínicos de OM-85 realizados con pacientes que sufren EPOC demuestran una disminución de un 30% en la tasa de exacerbaciones y en el porcentaje de la administración de antibióticos con respecto al placebo (73).

Recientemente, en un estudio piloto se evaluaron los efectos clínicos e inmunológicos de

Bactek® (MV130), una PBP comercialmente disponible y producida por Immunotek S. L. (14). MV130 contiene bacterias enteras Gram positivas y Gram negativas inactivadas por calor que están frecuentemente presentes en el tracto respiratorio: *Staphylococcus aureus* (15%), *Staphylococcus epidermidis* (15%), *Streptococcus pneumoniae* (60%), *Klebsiella pneumoniae* (4%), *Moraxella catarrhalis* (3%) y *Haemophilus influenzae* (3%). Bactek® o MV130 se administra por vía sublingual y está destinada a combatir tanto las infecciones respiratorias recurrentes del tracto superior e inferior como las exacerbaciones causadas por EPOC. En el estudio piloto se suministró MV130 a 17 pacientes con distintas RRTIs y se observó una disminución del 90% de la tasa de infecciones (14). Concretamente, la evaluación clínica a lo largo del estudio mostró una reducción del número total de infecciones de las vías respiratorias después del tratamiento con MV130, comparado con el número de RRTIs reportadas durante los 12 meses previos al tratamiento. Además, también se observó una mejoría en relación a la severidad y duración del episodio infeccioso.

Tabla I.1 Vacunas bacterianas comercializadas que existen en el mercado actualmente en función de su composición y vía de administración.

Empresa	Nombre	Diana	Composición	Vía
Diater	URPO®	Infecciones del tracto urinario	Bacterias muertas enteras	Intranasal
				Sublingual
				Subcutánea
INMUNOTEK	UROMUNE®	Infecciones del tracto urinario	Bacterias muertas enteras	Sublingual
INMUNOTEK	BACTEK®	Infecciones del tracto respiratorio	Bacterias muertas enteras	Sublingual
INMUNAL		Infecciones del tracto urinario	Bacterias muertas enteras	Sublingual
		Infecciones del tracto respiratorio		Subcutánea
PROBELETE		Infecciones del tracto urinario	Bacterias muertas enteras	Intranasal
		Infecciones del tracto respiratorio		Sublingual
				Subcutánea
LETI		Infecciones del tracto urinario	Lisados bacterianos	Intranasal
		Infecciones del tracto respiratorio		Sublingual
				Subcutánea
BIAL		Infecciones del tracto urinario	Lisados bacterianos	Intranasal
		Infecciones del tracto respiratorio		Subcutánea
ASAC PHARMA		Infecciones del tracto urinario	Lisados bacterianos	Intranasal
		Infecciones del tracto respiratorio		Sublingual
				Subcutánea
EUROFAR		Infecciones del tracto urinario	Lisados bacterianos	Intranasal
		Infecciones del tracto respiratorio		Sublingual
				Subcutánea
GRÜNENTHAL	URO-VAXOM®	Infecciones del tracto urinario	Lisados bacterianos	Oral
GRÜNENTHAL	BRONCHO-VAXOM®	Infecciones del tracto respiratorio	Lisados bacterianos	Oral

Adaptado de *Extending the Clinical Horizons of Mucosal Bacterial Vaccines: Current Evidence and Future Prospects. Current Evidence and Future Prospects. Current Drug Targets. 2014;15(12):1132-43 (4).*

Para la infecciones del tracto urinario existe una vacuna de características similares a OM-85, llamada OM-89 (URO-VAXOM) compuesta por 18 serotipos diferentes de *Escherichia coli*

uropatogénica (32). Un estudio multicéntrico demostró que la administración vía oral de OM-89 disminuyó la tasa de infecciones urinarias un 34% en los pacientes tratados comparado con el control (placebo) (74). Como se muestra en la **tabla I.1**, en el mercado existe otra vacuna, MV140 (Uromune®), una PBP comercialmente disponible y producida por Immunotek S.L., que ha mostrado ser una buena alternativa a los antibióticos para la prevención y el tratamiento de RUTIs. MV140 es una mezcla en proporciones iguales de células enteras inactivadas de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* (también llamado *Streptococcus faecalis*) (47, 75) que son los microorganismos que producen la mayoría de las RUTIs en Europa (76). Dos estudios recientes observacionales retrospectivos que evaluaron y compararon el beneficio de usar MV140 frente a antibióticos para prevenir RUTIs han reportado una reducción del número de IU (infecciones urinarias) significativamente mayor en pacientes tratados con esta vacuna bacteriana que en los tratados con antibióticos convencionales (sulfametoxazol / Trimetoprim). Además, estos estudios demostraron la eficacia de esta preparación bacteriana administrada por vía sublingual para combatir infecciones en tejidos distantes (29, 47).

Los beneficios clínicos de MV130 y MV140 son el resultado de la contribución cooperativa de mecanismos inmunológicos antígeno-específicos y también de mecanismos inmunomoduladores inespecíficos. Como indica la **figura I.6**, el epitelio sublingual contiene una red densa de DCs que juegan un papel esencial en la conexión de respuestas inmunes innatas y adaptativas (77, 78), y además, participan en los mecanismos no específicos característicos del modo de acción de estas vacunas de origen bacteriano administradas a través de las mucosas (**Figura I.5**).

4. Mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de las vacunas bacterianas

4.1. El papel de las células dendríticas en la iniciación y mantenimiento de respuestas inmunes

Las DCs fueron descubiertas por Steinman y Cohn en 1973 (79) y se definen como células profesionales presentadoras de antígeno capaces de conectar el sistema inmune innato con el adaptativo (80-83). Las DCs se localizan en los tejidos periféricos, en los órganos linfoides primarios y secundarios y en la sangre (84). Además, las DCs tienen la capacidad dual de inducir y regular inmunidad frente a patógenos y al mismo tiempo son capaces de generar tolerancia frente a antígenos propios, microorganismos comensales o agentes externos inocuos (77, 85-87).

La función principal de las DCs es capturar y procesar antígenos para transportarlos a través de los vasos linfáticos aferentes a los órganos linfoides donde son presentados a los linfocitos T vírgenes, contribuyendo a la iniciación y diferenciación de las células T (86, 88). La presentación del antígeno está mediada por las moléculas MHC de clase I y II, que se encuentran en la superficie

de las DCs. MHC de clase I se une a péptidos derivados de antígenos endógenos para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos). En cambio, MHC de clase II presenta péptidos derivados de antígenos exógenos para que las células T CD4⁺ (colaboradoras) puedan reconocerlos. Aparte de estos dos mecanismos, las DCs son capaces de internalizar antígenos extracelulares para ser presentados mediante las moléculas MHC de clase I a las células T CD8⁺ a través de un proceso conocido como *cross presentation* (89, 90).

Tabla I.2 Fenotipo y función de los distintos subtipos de DCs en humanos y ratón.

	Subtipos de células dendríticas humanas				Subtipos de células dendríticas murinas		
	mDC1	mDC2	pDC	hmoDCs	cDC2	cDC1	pDCs
Marcadores de superficie	CD1c/BDCA-1, CD11c, FcεRI	CD141/BDCA-3, CD11c	BDCA2, BDCA4, CD123, FcεRI	CD1c/BDCA-1, CD11c	CD11c, CD11b	CD1c, CD11c, CD103/CD8	CD123
PRRs	TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 Dectin 1 y 2, DCIR NLRs y RIG-1	TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 DNGR1, NLRs y RIG-1	TLR7, TLR9 RIG-1	TLR 1, 2, 3, 4, 5, DC-SIGN, receptor de manosa,	TLR1-6 y 9	TLR1-6 y 9 Langerina	TLR7 y 9 LyC6C
Presentación MHC-II	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Activación de células T	Fuerte	Media	Débil	Fuerte	Fuerte	Media	Débil
Citoquinas	proinflamatorias y antiinflamatorias	proinflamatorias	antivirales	proinflamatorias y antiinflamatorias	proinflamatorias y antiinflamatorias	proinflamatorias	antivirales

El modelo clásico del desarrollo de DCs está principalmente estudiado en ratón (91). Se han descrito una serie de precursores clave, los MDPs (precursores de macrófagos y DCs), que dan lugar a monocitos, cDC-P (progenitores restringidos a DC convencionales) y pre-pDCs (progenitores específicos de DCs plasmacitoides) (91). Las cDC-P son precursores de las células dendríticas convencionales (cDCs), que se dividen en cDCs que expresan CD11b⁺ (cDC2), o CD11b⁻ (cDC1). Dentro de las CD11b⁻ se pueden encontrar DCs residentes en tejidos linfoides que expresan CD8⁺ y DCs migratorias que expresan CD103⁺ (Tabla I.2). Por otro lado, las pre-pDCs son las precursoras de las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) que se caracterizan por ser CD11c^{low}, CD11b⁻ y CD45RA^{high}. En humano, las DCs se originan en la médula ósea a partir de precursores hematopoyéticos CD34⁺. El modelo recientemente aceptado propone que mediante el CDP (progenitor común de DCs) da lugar a pre-DCs que migran fuera de la médula ósea donde se generan las dos subpoblaciones principales de DCs: células dendríticas mieloides (mDCs) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs) (92). Además, existen evidencias de que Flt3 (Fms-like tirosina quinasa 3) o también llamado CD135 es requerido para la generación y el mantenimiento de la mayoría de las subpoblaciones de DCs (90, 93). Tradicionalmente las células dendríticas se han clasificado según la expresión de sus marcadores de superficie. Aunque es útil para su caracterización, estos análisis fenotípicos resultan insuficientes para definir las subpoblaciones de DCs. Otras propiedades tales como la morfología, la capacidad migratoria y la capacidad de estimular a células T vírgenes, ayudan a identificar y diferenciar cada subpoblación particular

de DCs. Recientemente, nuevos estudios transcriptómicos y nuevos parámetros de clasificación como las marcas de expresión génica están emergiendo como alternativas adecuadas para llegar a definir distintos subtipos de DCs (93).

Aunque las células dendríticas son una población heterogénea, todas ellas se caracterizan por la presencia de moléculas MHC de clase II (HLA-DR) y la ausencia de marcadores de linaje que incluyen: CD3 (células T), CD19/20 (células B) y CD56 (células NK) (84, 91, 94). Las DCs humanas sanguíneas se dividen en dos grandes grupos: mDCs y pDCs.

4.1.1. Células dendríticas mieloides (mDCs) humanas

A pesar de que las mDCs son una población heterogénea, todas ellas se caracterizan porque expresan CD11c y MHC-II (HLA-DR). Según la expresión del marcador de superficie BDCA (*blood dendritic cell antigen*), se pueden clasificar en dos tipos: BDCA1/CD1c⁺ (mDC1) o BDCA3/CD141⁺ (mDC2) (90, 91). Las mDC de clase 1 representan el 1% del PBMC y es la población de mDCs más frecuentes en sangre, tejidos y órganos linfoides. Las mDC1 están equipadas con CLR y TLRs para reconocer y capturar antígenos que posteriormente son transportados y presentados a los linfocitos T (**tabla I.2**). Secretan un gran número de citoquinas proinflamatorias como IL-12p70 y antiinflamatorias, ante estímulos como LPS, flagelina, peptidoglicanos y carbohidratos. Además, se caracterizan por ser potentes estimuladores de células T CD4⁺ vírgenes (80, 95). Las DCs BDCA1⁺ (mDC1) serían funcionalmente equivalentes a cDC2 de ratón (96)

Las mDCs de tipo 2 (mDC2) o mDCs CD141⁺ se encuentran en menor proporción en circulación sanguínea (0,1 % del PBMC) (**tabla I.2**). Las mDCs 2 secretan citoquinas antivirales como IFN- λ , pero muy poco IL-12p70. Aunque su capacidad de estimular linfocitos T CD4⁺ es menor comparado con las mDC1, su capacidad para presentar antígenos a linfocitos T CD8⁺ mediante *cross presentation* es mayor (90). Se ha establecido que las DCs BDCA3⁺ (mDC2) son equivalentes a cDC1 de ratón (96).

4.1.2. Células dendríticas plasmacitoides (pDCs) humanas

Las pDCs se identificaron hace más de 15 años y representan el 0,2-0,8% del PBMC (97). Se caracterizan por la expresión de la cadena α del receptor de IL-3 (CD123), BDCA2/CD303 y BDCA4/CD304 (Neuropilin-4), además de la expresión de HLA-DR (98). Como se observa en la **tabla I.2**, las pDCs expresan distintos tipos de TLRs: TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 y TLR10 (84) y juegan un papel crucial contra infecciones virales, produciendo grandes cantidades de interferones de tipo I, fundamentalmente IFN- α , de manera muy rápida (99). Además, son capaces de detectar ácidos nucleicos del ambiente mediante TLR7 y TLR9 para iniciar una defensa efectiva contra las infecciones víricas y bacterianas. Diversos grupos han demostrado que las pDCs presentes en el timo y las amígdalas inducen células T reguladoras CD4⁺CD25⁺CD127⁻FOXP3⁺ (81, 100-102).

4.1.3. Células dendríticas humanas derivadas de monocitos

Los monocitos representan aproximadamente el 10% del PBMC total y juegan un papel fundamental en la respuestas innatas frente a patógenos (103). *In vitro*, estas células en presencia de factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) e interleuquina 4 (IL-4) se diferencian a DCs (104). Las células dendríticas humanas derivadas de monocitos (hmoDCs) presentan un fenotipo inmaduro y una capacidad reducida presentadora de antígeno (105). Sin embargo, en presencia de ciertos estímulos microbianos son capaces de capturar antígenos solubles con alta eficiencia y aumentar su capacidad de presentación de antígenos y estimulación de células T (106, 107).

Las DCs inmaduras que residen en los tejidos periféricos no linfoides se caracterizan por una baja expresión de los marcadores de maduración y co-estimulación CD40, CD80, CD86 y CD83, y por una limitada capacidad de producir citoquinas y de presentar el antígeno a los linfocitos T vírgenes (108). En presencia de estímulos microbianos las DCs sufren un proceso de maduración que modifica su morfología y función. En este proceso aumenta de forma transitoria la capacidad de las DCs para capturar antígenos y va acompañado de un aumento en la expresión de moléculas MHC I y II y moléculas co-estimuladoras de superficie tales como CD40, CD80, CD86 y CD83. Asimismo, las DCs producen una amplia variedad de citoquinas inflamatorias y quemoquinas (83, 109). Las DCs maduras migran a los órganos linfáticos, en un proceso dependiente de la expresión de CCR7, donde presentan los péptidos procesados a los linfocitos T vírgenes, induciendo su diferenciación a células T colaboradoras o células T citotóxicas (85, 96, 110, 111). Desde hace tiempo, ha sido aceptado que las DCs inmaduras inducen tolerancia a través de la generación de células T reguladoras y que las DCs maduras generan distintos tipos de células T efectoras (112, 113). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las DCs totalmente maduras son también capaces de generar células T reguladoras bajo ciertas condiciones (101, 114, 115).

4.2. Principales tipos de PRRs (*pattern recognition receptors*) en DCs

Las DCs están equipadas con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *pattern-recognition receptor*) que les permiten reconocer patrones moleculares derivados de patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) (48, 116). Distintos estudios han propuesto la existencia de self-PRRs (SPRRs) que reconocen SAMPs (*self-associated molecular patterns*) con el fin de mantener la homeostasis en un estado de no activación (117). Cuando un PRR reconoce y se une a un PAMP, se inicia una serie de cascadas de señalización intracelular, que induce, comúnmente a la activación de NF- κ B (*nuclear factor κ B*) y MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*), que en último término desencadenará una respuesta inflamatoria como la producción de

citoquinas y péptidos anti-microbianos (118, 119, 120). Se distinguen distintos PRRs en función de su localización y estructura.

Receptores de tipo Toll (TLRs)

Los TLRs fueron los primeros PRR identificados y se descubrieron en *Drosophila melanogaster* como moduladores del desarrollo embrionario (121). Posteriormente, se observó que formaban parte fundamental de la inmunidad innata participando activamente frente a infecciones bacterianas (122). Los TLRs son proteínas transmembrana de tipo I compuestas por: repeticiones extracelulares ricas en leucina (LRRs) que median el reconocimiento de los PAMPs, dominios transmembrana y dominios citoplasmáticos similares a los contenidos en el receptor de interleuquina 1 (IL-1) que interactúan con proteínas citoplasmáticas requeridas para la posterior señalización (123).

Hasta el momento, en humanos se han identificado 10 miembros de la familia de TLRs (116). Dependiendo de su localización celular (membrana plasmática o dominio intracelular) se dividen en dos grandes grupos (124). Un grupo está compuesto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, que se expresan en la superficie de la célula y principalmente reconocen componentes de la membrana microbiana como lípidos, lipoproteínas y proteínas. El otro grupo está formado por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, que a diferencia de los primeros se localizan exclusivamente en vesículas intracelulares como el retículo endoplásmico (ER), endosomas, lisosomas y endolisosomas, donde reconocen ácidos nucleicos (**Figura I.7**) (116, 125, 126).

Después de la unión al ligando, los receptores forman homo- o heterodímeros y se activan principalmente dos vías de señalización: la vía dependiente de MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) y la vía independiente de MyD88, mediada por la molécula TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon β*). MyD88 es la proteína adaptadora común en todos los TLRs a excepción de TLR3 (124). La señal de transducción culmina en la activación de distintos factores de transcripción, como NF- κ B, MAPKs, e IRFs (*interferon-regulatory factor*) que son miembros de factores reguladores de la familia de los interferones, con el fin de regular

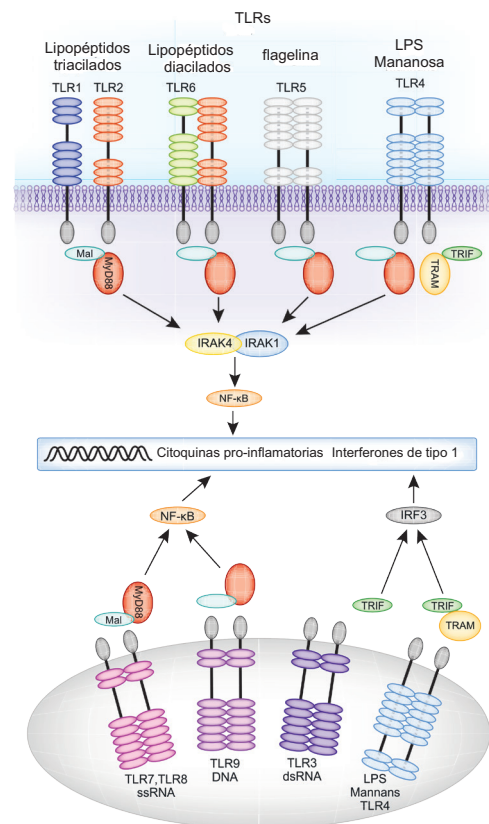


Figura I.7 TLRs, ligandos principales y vías intracelulares que conducen a la estimulación de las citoquinas proinflamatorias. ARNsc, ARN monocatenario; dsARN, ARN bicatenario. Adaptado de *Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. Nat Immunol. 2012;13(6):535-42* (126).

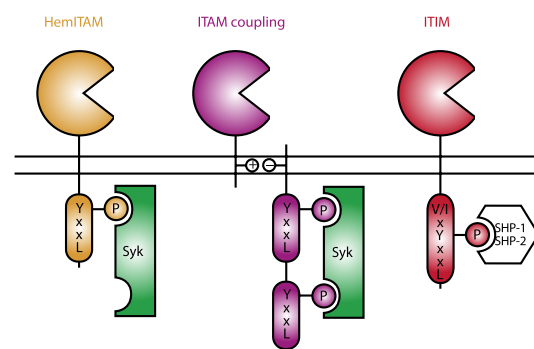
la expresión de citoquinas, quemoquinas e IFNs que participan en la defensa contra infecciones microbianas (127-131).

Receptores lectina tipo C (CLRs)

Los CLRs son una gran familia de proteínas transmembrana caracterizadas por la presencia de uno o más dominios de tipo lectina (CTLD, *C-type lectin-like domains*). Esta familia se divide en 17 grupos dependiendo de la base filogenética y la organización del dominio (132). El CTLD es un motivo estructural compuesto por dos lazos con cisteínas conservadas que estabilizan la estructura con dos puentes disulfuro (117). A pesar de la presencia de un dominio altamente conservado, los CLRs son funcionalmente muy diversos y están implicados en distintos procesos: adhesión celular, remodelación de tejidos, activación de plaquetas y del complemento, endocitosis, fagocitosis y reconocimiento de patógenos (132).

Los CLRs se unen específicamente a carbohidratos, tales como glucanos, que forman parte de las paredes celulares de hongos, plantas y micobacterias; estructuras ricas en manosa, que se expresan en virus, hongos y bacterias; y estructuras de fucosa, que se encuentran en la superficie de helmintos y algunas bacterias (100, 133, 134). Los CLRs no solo reconocen organismos invasores, sino que también pueden reconocer antígenos propios y favorecer la inducción de tolerancia. Así por ejemplo, Dectin-1 y Dectin-2 se unen preferentemente a microbios, mientras que otros como Lox-1 o DNGR-1, responden principalmente a los auto-ligandos como por ejemplo restos de células muertas. Sin embargo, DC-SIGN puede reconocer tanto antígenos microbianos como propios (135).

En este sentido, es importante destacar que la unión del ligando a los CLRs puede inducir dependiendo del contexto, respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (117). La capacidad de los CLRs para activar o inhibir respuestas inmunes es regulada por la activación de motivos específicos en sus colas citoplasmáticas: motivos de activación (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activator motif*) o inhibición (ITIM, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) (117, 133, 136).



Como se observa en la **figura I.8**, en una respuesta de activación, a través de los motivos ITAM se recluta Syk (*spleen tyrosine kinase*) de forma directa o indirecta, que media la activación de NF-κB, MAPKs y citoquinas proinflamatorias

Figura I.8 Los CLRs utilizan distintos mecanismos de señalización. Los CLRs pueden activar Syk directamente a través de un HemiITAM o indirectamente por medio de proteínas adaptadoras que contienen motivos ITAM. Los CLRs que contienen ITIM pueden inhibir la activación de células mieloides mediante el acoplamiento a fosfatasa SHP-1 o SHP-2. Adaptado de *Myeloid C-type lectins in innate immunity. Nat Immunol. 2006;7(12):1258-65* (136).

(137). Por otro lado, en una respuesta inhibitoria, se produce una activación de los motivos ITIM que fosforilan a las fosfatasa SHP1 y SHP2, inhibiendo la activación celular (132, 134, 136).

Receptores de tipo NOD (NLRs)

Los receptores NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) se localizan en el citoplasma y hasta el momento se han descubierto 23 (138). Las proteínas NOD contienen al menos tres dominios diferentes con estructuras y funciones distintas: un nodo central llamado NATCH (NAIP -*neuronal apoptosis inhibitor protein*-, C2TA -*class 2 transcription activator, of the MHC*, HET-E (*heterokaryon incompatibility*- y TP1 -*telomerase-associated protein 1*-), un dominio efector N-terminal y un dominio C-terminal de repeticiones ricas en leucina (LRRs). El dominio central tiene actividad ATPasa y permite que los NLRs se unan entre sí y formen oligómeros. El dominio de repetición rico en leucina detecta la presencia del ligando. El dominio N-terminal recluta otras proteínas para formar complejos de señalización (138, 139). Los NLRs se pueden clasificar según su estructura y función. Atendiendo a su estructura, encontramos 4 familias: NLRA, NLRB, NLRC y NLRP, las cuales varían en su dominio N-terminal. Como indica la **figura I.9**, según su función, los NLRs se pueden clasificar en 4 categorías: formación de inflamasoma, transducción de señales, activación de la transcripción y autofagia (140).

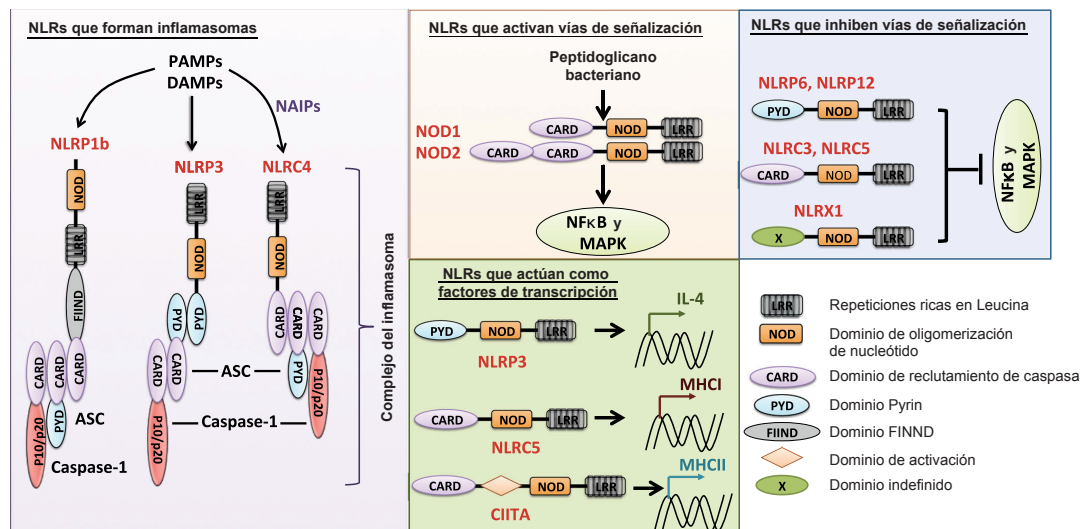


Figura I.9 Diversas funciones de las proteínas NLRs. Los NLRs que forman inflamasomas: NLRP1B, NLRP3 y NLRC4. NLRs que activan vías de señalización: NOD1 y NOD2. NLRs que inhiben las vías de señalización: NLRP6, NLRP12, NLR3, NLR5 y NLRX1. NLRs que actúan como factores de transcripción: NLRP3, NLRC5. Adaptado de *Immune responses against protozoan parasites: a focus on the emerging role of Nod-like receptors*. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(16):3035-51 (143).

NOD1 (NLRC1, *NOD like receptor C1*) y NOD2 (NLRC2, *NOD like receptor C2*), pertenecientes a la familia de NLRC, fueron los primeros identificados y los más estudiados (140, 141). Tanto NOD1 como NOD2 se caracterizan por tener un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD), y por su capacidad de activar NF-κB y MAPKs en respuesta a ligandos bacterianos. Distintos estudios han demostrado que NOD1 y NOD2 reconocen diferentes

componentes estructurales derivados del peptidoglicano de las membranas de las bacterias (138). NOD1 reconoce iE-DAP (*γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*), un dipéptido presente en la estructura del peptidoglicano que solamente se encuentra en las bacterias Gram negativas y en alguna bacteria Gram positiva. Por el contrario, NOD2 reconoce MDP (*muramyl dipeptide*) que provienen tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas. Tras reconocer el ligando, NOD1 y NOD2 interactúan con una molécula adaptadora común llamada RIPK2 (*receptor interacting serine/threonine kinase 2*), una serina/treonina quinasa que puede activar NF-κB y MAPKs, y la producción de citoquinas (139, 142-144).

La mayoría de los NLRs actúan como PRRs que reconocen distintos ligandos de patógenos microbianos (peptidoglicano, flagelina, ARN viral, etc.), de las células del organismo (ATPs, colesterol, ácido úrico) y de fuentes ambientales (aluminio, amianto, radiación UV, etc.) (142). Tras la detección de agentes microbianos intracelulares por los NLRs, se inducen respuestas

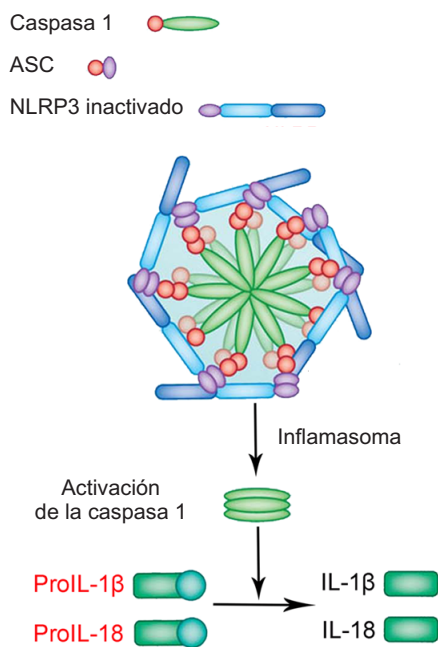


Figura I.10 Ensamblaje del complejo inflamasoma formado por NLRP3 inactivo que se asocia con la proteína ASC (apoptosis-associated speck-like protein), y procaspasa-1. Este complejo, cataliza la conversión de procaspasa-1 en caspasa-1, lo que contribuye a la producción y secreción de IL-1β e IL-18. Adaptado de *NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. Front Pharmacol. 2015;6(262):1-9* (149).

inflamatorias que culminan en la activación de NF-κB y MAPK. Además, los NLRs controlan la activación de caspasas (145, 146). Ciertos miembros de la familia de los NLRs que incluyen (NLRP1, NLRP3, y NLRP4) son componentes del inflammasoma y juegan un papel muy importante en la iniciación de respuestas inmunes innatas y se encarga de regular la activación de la caspasa 1. Los inflammasomas son complejos citosólicos de multi-proteínas que se ensamblan en respuesta a una variedad de agentes infecciosos (147). Ante la detección de un estímulo, el inflammasoma opera como una plataforma que recluta el zimógeno inactivo llamado pro-caspasa 1. La oligomerización de proteínas pro-caspasa 1 induce su disociación auto-proteolítica, dando lugar a la caspasa 1 (148, 149). La activación de la caspasa 1 es imprescindible en el procesamiento de pro-IL-1β y pro-IL18, generando las citoquinas en sus formas maduras: IL-1β e IL-18 respectivamente. Durante la infección la caspasa 1 juega un papel protector frente a bacterias intracelulares (**Figura I.10**) (142, 147, 150).

Además de los PRRs detallados, existen otros receptores tales como los RLRs (receptores de tipo RIG-1) que reconocen ARN vírico de doble cadena e inducen la producción de los interferones antivirales de tipo I (151). Por otro lado, los receptores *Scavenger* son una familia de receptores de membrana que reconocen lipoproteínas de baja densidad (152).

4.3. Polarización de las células T CD4⁺ vírgenes

Como se ha comentado anteriormente, las DCs tienen la capacidad de presentar antígenos e inducir la polarización de las células T. Para ello, se requieren tres señales (**Figura I.11**). En el órgano linfóide, el TCR de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes reconocen al MHC-II unido al péptido en la DC madura (**señal 1**). Además de las señales inducidas por el antígeno, la proliferación y diferenciación de células T vírgenes requiere de señales co-estimuladoras proporcionadas por las DCs (**señal 2**). En la interacción co-estimuladora más caracterizada participan CD28, un receptor de superficie de la célula T que se une a las moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresadas en las células dendríticas (153). Aparte de estos receptores se han identificado otros muchos homólogos a ellos que son capaces de regular las células T activándolas o inhibiéndolas. Un ejemplo serían los receptores CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) y PD-1 (*programmed death 1*), ambos homólogos de CD28 y que están implicados en procesos de tolerancia (154). Asimismo, cabe destacar la interacción de CD40L en células T con CD40 en DCs, ya que esta interacción también activa a la DCs para hacerlas más potentes mediante un aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras e inducen la secreción de citoquinas como por ejemplo IL-12. Por último,

para que se complete la activación, son necesarias las citoquinas producidas por las DCs (**señal 3**) (88, 94).

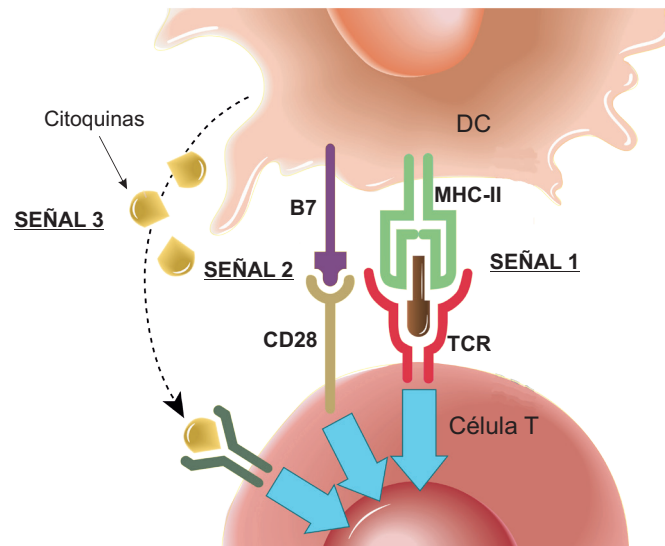


Figura I.11 La proliferación y diferenciación de linfocitos T requieren el reconocimiento del antígeno (señal 1), la co-estimulación (señal 2) y las citoquinas que son producidas por las células dendríticas (señal 3). Adaptado de *Cellular and Molecular Immunology* (A.K Abbas)..

Los linfocitos T CD4⁺ juegan un papel fundamental en las respuestas inmunes adaptativas ya que participan en los mecanismos de protección frente a una gran variedad de patógenos. Tras la presentación antigénica, los linfocitos T CD4⁺ adquieren un fenotipo específico dependiendo de las señales recibidas. Las células T CD4⁺ se clasifican en distintos subtipos según su fenotipo y función. Cada subtipo puede ser caracterizado por su habilidad para producir diferentes citoquinas, expresión de factores de transcripción y receptores de quemoquinas (88, 155-158).

Numerosos estudios recientes ponen de manifiesto que las células T CD4⁺ se diferencian y adquieren distintas funciones para combatir patógenos, pero también pueden adaptar sus funciones en respuesta a las circunstancias cambiantes del entorno. En este fenómeno, llamado plasticidad, cada subconjunto de linfocitos T CD4⁺ puede adoptar perfiles alternativos de citoquinas y es

regulado por distintas señales extracelulares y citosólicas, programas metabólicos, factores de transcripción o factores epigenéticos (158-162).

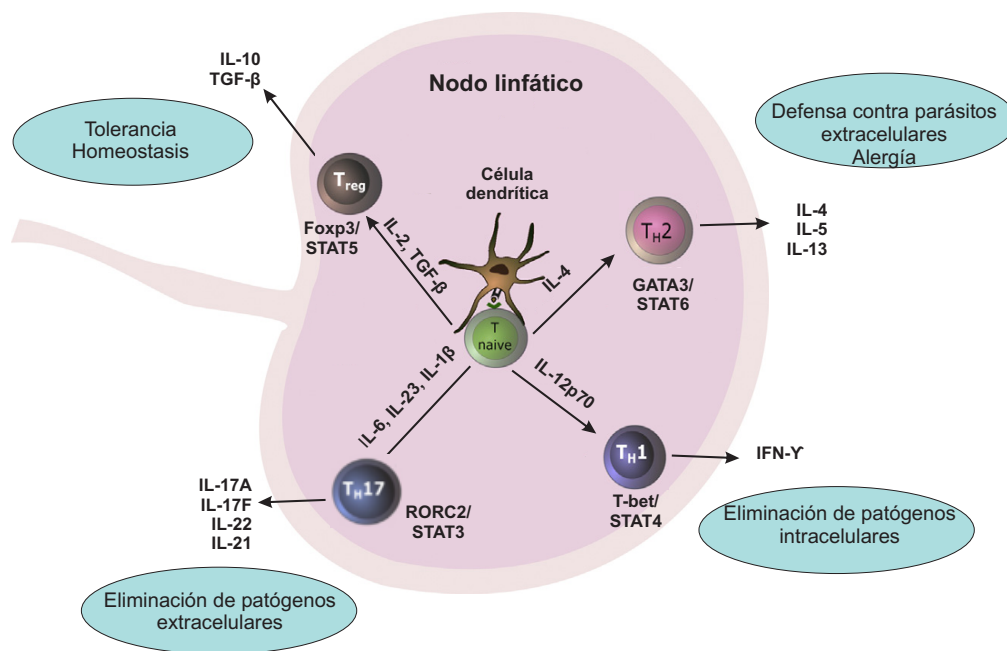


Figura I.12 Polarización de las células T CD4⁺ virgenes en distintos tipos de células T funcionales. Activación inducida por DCs, que migran a los ganglios linfáticos tras la captación del antígeno. Adaptación de *Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-α: Receptors, functions, and roles in diseases. J Allergy Clin Immunol. 2016;138(4):984-1010 (163).*

4.3.1. Células T colaboradoras de tipo 1 (Th1)

Las células Th1 se generan en respuesta a infecciones por virus, bacterias intracelulares y protozoos. Para que se produzca la diferenciación a células Th1, es imprescindible la expresión del factor de transcripción T-bet, y la producción de la citoquina IL-12p70 por parte de las DCs (**Figura I.12**) (156, 157). Las células Th1 se caracterizan por producir altos niveles de IFN-γ, el cual tiene efectos en muchos tipos celulares del sistema innato: activación de macrófagos y linfocitos T CD8⁺ citotóxicos para eliminar patógenos intracelulares y proteger contra infecciones virales. Además, las células Th1 pueden cooperar con los linfocitos B para producir anticuerpos (163). Estudios recientes en humanos han demostrado que los virus y las bacterias intracelulares pueden inducir distintos tipos de Th1, los cuales pueden diferenciarse basándose en la expresión de sus citoquinas y factores de transcripción. La subclase llamada células Th1 “clásicas” expresan CXCR3 y T-bet; por el contrario, el segundo subtipo, llamado células Th1 “no clásicas” expresan CXCR3 y T-bet, además de CCR6 y RORC2, un subtipo más característico de las células Th17 (156).

4.3.2. Células T colaboradoras de tipo 2 (Th2)

Las células Th2 juegan un papel central en la protección frente a helmintos y además,

participan en procesos alérgicos (164). Estas células secretan distintas citoquinas: IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que contribuyen a la producción de IgE específica frente alérgenos por las células B, al desarrollo y reclutamiento de eosinófilos, la producción de moco y contracción del músculo liso en los procesos alérgicos (165, 166). Para su diferenciación es clave la producción de la citoquina IL-4 y la expresión del factor de transcripción GATA-3 (**Figura I.12**) (156, 163).

4.3.3. Células T colaboradoras de tipo 17 (Th17)

Las células Th17 protegen frente a infecciones causadas por bacterias extracelulares y hongos, especialmente en las superficies de la mucosa (167-170). Para su diferenciación se requiere la presencia de IL-6, IL-1 β y TGF- β (171, 172). La citoquina IL-23 es necesaria en las etapas posteriores del desarrollo de las células Th17 para promover la diferenciación completa, y mantener la producción y expresión de IL-17 (173). Estas citoquinas activan el factor de transcripción STAT3 que induce la expresión de RORC2, un factor de transcripción clave en la diferenciación de las células Th17. El subtipo Th17 se caracteriza por producir varias citoquinas efectoras, incluyendo: IL-17A, IL-17F, IL-21 y IL-22 (**Figura I.12**) (174-177).

La IL-17 secretada se une a receptores específicos (IL-17R) presentes en varios tipos celulares, incluyendo leucocitos, células epiteliales, células endoteliales, y células mesoteliales que son capaces de producir citoquinas inflamatorias: IL-6, IL-8, TNF- α y CSF (G-CSF); y quemoquinas CXCL que promueven la generación, migración y acumulación de neutrófilos (163). Asimismo, IL-17 puede inducir la producción de péptidos antimicrobianos: defensinas, proteínas S100 y metaloproteasas, que contribuyen a la defensa del huésped contra infecciones (160, 178). Dentro de las Th17 distinguimos dos tipos dependiendo del antígeno y el entorno. Por un lado, las Th17 producidas frente al hongo *Candida albicans* producen IL-17 e IFN- γ y no IL-10. Por el contrario, las células Th17 producidas contra *Staphylococcus aureus* generan IL-17, IL-10 pero no IFN- γ y presentarían un fenotipo más regulador. Esto puede deberse al papel de la IL-1 β , ya que se ha observado en diversos estudios que la presencia de IL-1 β induce unas Th17 productoras de IFN- γ (Th17 más patogénicas), mientras su ausencia da lugar a células Th17 reguladoras productoras de IL-10 (162, 167, 179, 180)

4.3.4. Células T reguladoras (Treg)

Las células T reguladoras son inducidas por las DCs para mantener la tolerancia y prevenir una respuesta inmune excesiva y dañina (81). Las DCs inmaduras o maduras condicionadas por diferentes estímulos tales como moléculas derivadas de células Treg, señales exógenas o moléculas específicas producidas por probióticos o patógenos, promueven la generación de células Treg funcionales a través de la producción de moléculas solubles (IL-10 y TGF- β), enzimas específicas (IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa)) y metabolitos (ácido retinoico). Asimismo,

existen diferentes moléculas co-estimuladoras implicadas en la generación de células Treg tales como PDL-1 (*programmed death-ligand 1*), ICOSL (*inducible costimulatory molecule ligand*), CD86 o HLA-DR (165, 181). Las Treg inhiben directa o indirectamente la activación de células T colaboradoras (Th1, Th2 y Th17), basófilos, mastocitos y eosinófilos (92, 182). Además, inhiben las DCs inflamatorias, favoreciendo la generación de DC tolerógenicas (92). Para ello, las Treg emplean principalmente cuatro mecanismos: citoquinas supresoras tales como IL-10 y TGF- β ; mecanismos de interrupción metabólica como por ejemplo CD25, CD39 y CD73; mecanismos que utilizan moléculas de superficie como CTLA-4 y citólisis (92, 163).

Las Treg se pueden clasificar en dos grupos: células Treg naturales CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ derivadas de timo y células Treg inducibles (92). Estas últimas son generadas fuera del timo tras el reconocimiento antigénico y pueden ser divididas en: células T FOXP3⁺, células Treg productoras de IL-10 y células T productoras de TGF- β o células Th3 (101, 158). El factor de transcripción *forkhead box P3* (FOXP3) es esencial en el desarrollo y la función de las Treg (**Figura I.12**) (174, 183).

Las DCs responden e integran de forma global distintas señales: patógenas, microbiota, agentes ambientales, agentes inocuos derivados de la dieta y del aire inhalado, etc. mediante conjuntos de genes y vías de señalización que interactúan de una manera compleja (**Figura I.13**).

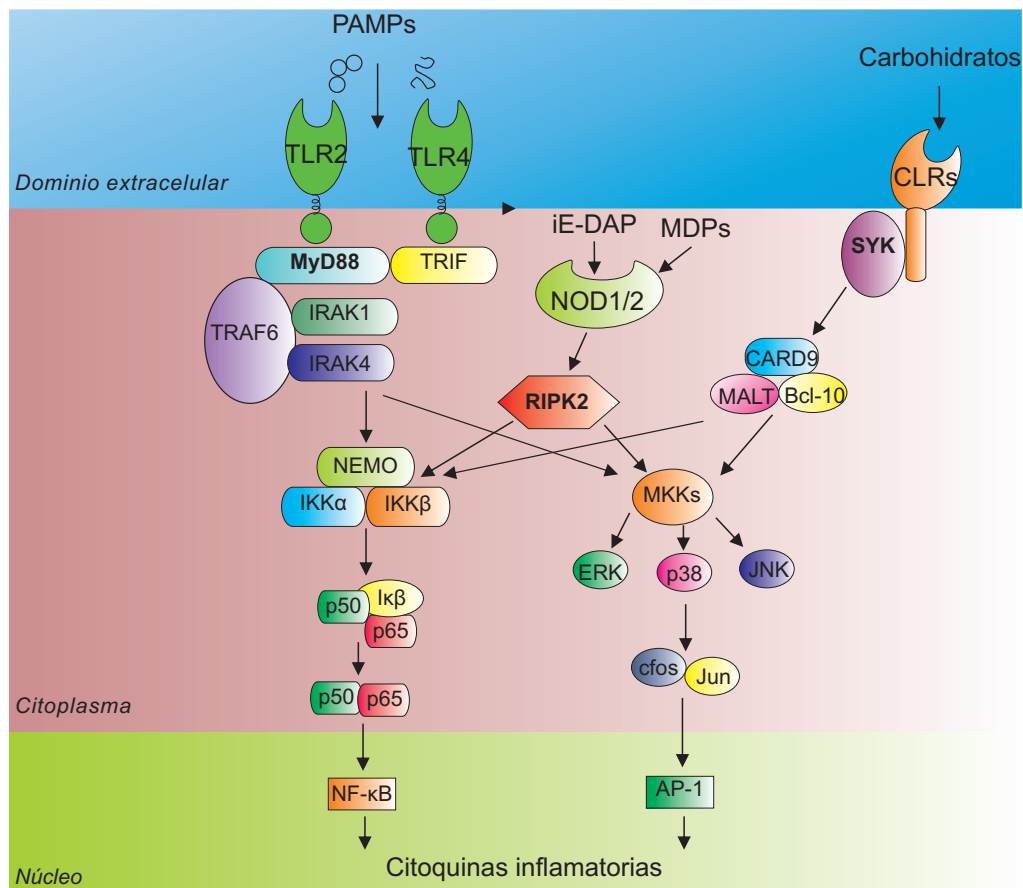


Figura I.13 Vías de señalización de los principales PRRs: TLRs, NLRs y CLRs junto con sus principales moléculas adaptadoras: MyD88, RIPK2 y Syk respectivamente.

Por ello, las técnicas ómicas tales como los microarrays han cobrado gran importancia en los últimos tiempos, ya que contribuyen a proporcionar una visión molecular global e integrada de las vías de activación implicadas en los procesos celulares. De hecho, la utilización de estas técnicas es muy importante en áreas como el cáncer, la infección, autoinmunidad o desarrollo de vacunas (184-186).

5. Técnicas ómicas

En medicina los procesos del organismo se han estudiado como componentes independientes, separados y aislados, de manera que cuando se investigaba una patología se trataba de identificar una única anomalía relacionada con un solo componente (187). Sin embargo, para entender verdaderamente los procesos de la enfermedad, se necesita un enfoque a múltiples niveles ya que los organismos no operan como compartimentos estancos y sin relación entre ellos. Así, parece claro que la única forma de entenderlos es ensamblando todas las piezas moleculares, permitiendo una visión global del proceso (188). Uno de los grandes retos de la biología moderna para curar enfermedades es entenderlas como una red compleja, integrada y dinámica, con el fin de conseguir una medicina predictiva, preventiva, personalizada y participativa (189). El desarrollo de las técnicas ómicas, que tuvieron su origen a partir de la creación del Proyecto Genoma Humano, han contribuido significativamente a avanzar en este sentido. Estas técnicas, se basan en el análisis de un gran volumen de datos que junto con la bioinformática y nuevas técnicas de alto rendimiento logran integrar toda la información de una forma coherente. Además, ofrecen visiones globales sobre las moléculas básicas que constituyen un sistema biológico a nivel de célula, tejido u organismo (**Figura I.14**) (187, 189, 190). Entre ellos, podemos destacar:

- Genómica: estudio integral del funcionamiento, el contenido, la evolución y el origen de los genomas.
- Transcriptómica: estudio de los perfiles de expresión de todos los genes presentes en el genoma. Gracias a esta técnica, se están identificando nuevas dianas terapéuticas y paneles de biomarcadores. Los análisis comparativos a nivel global del transcriptoma están permitiendo conocer y entender las respuestas inmunes y los mecanismos de acciones producidos por las diferentes vacunas, con el objetivo de desarrollar vacunas más eficaces.
- Proteómica: estudio de las proteínas presentes en la célula, en un tejido o en un fluido en un momento dado bajo determinadas condiciones. Incluye: identificación de todas las proteínas, la naturaleza y el alcance de cualquier modificación postraducciona, interacciones proteína-proteína y localización subcelular de la proteína.
- Metabolómica: estudio de los metabolitos que intervienen en los diferentes procesos

celulares y revela el funcionamiento del metabolismo de una célula o tejido.

- Metagenómica: informa de los genes presentes en un organismo y su interacción con el potencial genético de comunidades bacterianas.

Uno de los campos donde la metagenómica ha sido especialmente relevante es en el estudio del microbioma, que se define como el genoma del conjunto de comunidades microbianas que viven en un organismo (191). En el año 2008 surgió el Proyecto Microbioma Humano, cuya misión es generar recursos que permitan la caracterización completa del microbioma humano y el análisis de su papel en la salud humana (192). El gran número de microorganismos que habitan las superficies de los mamíferos tiene una gran relación con el sistema inmunológico. El sistema inmunitario de los mamíferos juega un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis con las comunidades microbianas residentes, asegurando así el mantenimiento de la relación mutualista huésped-microbioma. Al mismo tiempo, estas mismas bacterias residentes moldean la inmunidad de los mamíferos (53, 193).

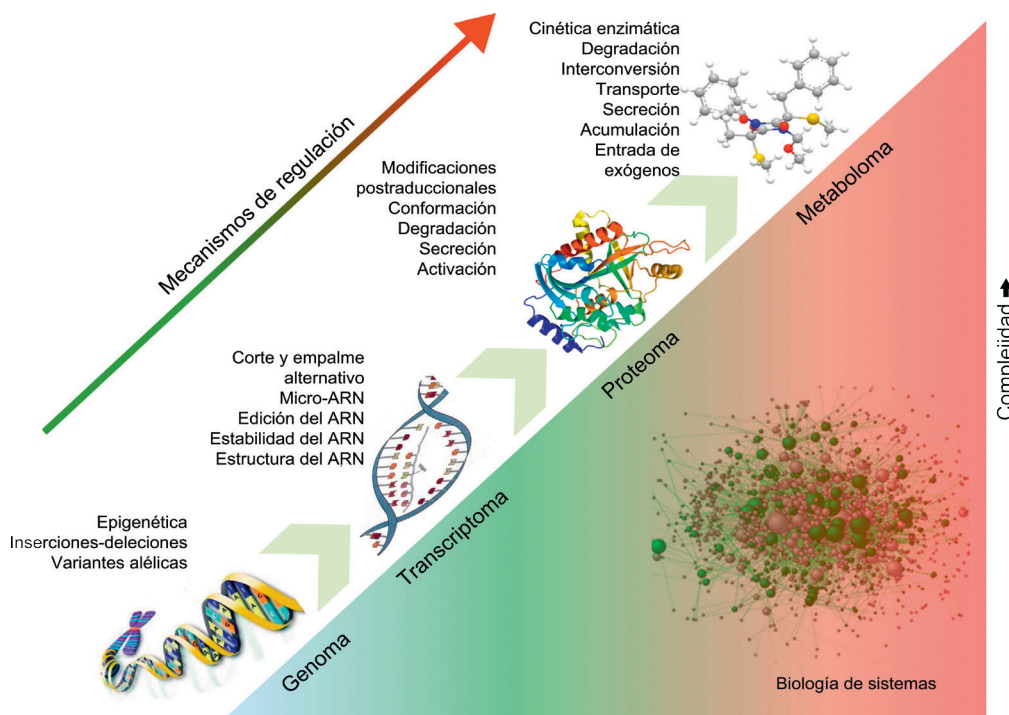


Figura I.14 Biología de sistemas. Los procesos reguladores en el ADN afectan a la expresión de moléculas de procesos posteriores, como los ARN, las proteínas y los metabolitos. Los efectos de los diferentes elementos reguladores son aditivos. La biología de sistemas intenta analizar las interacciones entre las diferentes entidades moleculares para ofrecer una visión holística de los procesos biológicos y las alteraciones patológicas que se producen en la enfermedad.

Debido a esta relación entre el organismo y su microbioma, diversos estudios están tratando de perfilar los problemas relativos a la variación, estabilidad y el desarrollo del microbioma y sus efectos, así como las consiguientes interacciones con el organismo. Por consiguiente, es clave conocer el mecanismo por el cual el microbioma interactúa con las células de los organismos y

regula determinadas funciones inmunológicas. A partir de este conocimiento están surgiendo la identificación de compuestos necesarios para la generación de preparados bacterianos que sean capaces de modular el sistema inmune como es el caso de los probióticos o las vacunas de origen bacteriano (193, 194).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Las RRTIs y RUTIs figuran como las enfermedades infecciosas más comunes a nivel mundial con una alta tasa de mortalidad, representando un problema de salud global muy serio con un gran impacto socioeconómico. El tratamiento de referencia para combatir estas infecciones consiste en la administración repetida y prolongada de numerosos ciclos de antibióticos. Aunque los antibióticos han demostrado eficacia clínica, su uso indiscriminado conlleva una serie de efectos adversos. Por ello, urge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de las RRTIs y RUTIs. En este sentido, las vacunas bacterianas administradas a través de las mucosas han despertado gran atención en los últimos tiempos. Estudios recientes indican que la inmunización sublingual con MV130 (Bactek®) o MV140 (Uromune®), PBPs compuestas por bacterias enteras inactivadas por calor producidos por Immunotek S.L., reducen drásticamente la tasa de infecciones en los pacientes que sufren RRTIs y RUTIs, respectivamente. A pesar del beneficio clínico demostrado por ambas PBPs, los mecanismos inmunológicos que subyacen al modo de acción de MV130 y MV140 son totalmente desconocidos hasta la fecha. Aunque los mecanismos moleculares son desconocidos, en el beneficio clínico contribuyen tanto mecanismos inmunológicos específicos de antígeno como mecanismos inmunomoduladores inespecíficos. La mucosa sublingual contiene una densa red de DCs esencial en la conexión de respuestas inmunes innatas y adaptativas.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral se ha centrado en la dilucidación de los mecanismos inmunológicos que contribuyen al modo de acción y beneficio clínico de las PBPs MV130 y MV140. En particular, en este trabajo se han estudiado a nivel molecular los mecanismos inmunológicos implicados en la capacidad de MV130 y MV140 para inmunomodular el fenotipo y función DCs humanas, incluyendo su capacidad para polarizar respuestas T. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

Bloque 1: Propiedades inmunomoduladoras de MV130 (Bactek®) en células dendríticas humanas.

1. Optimización de las condiciones de ensayo en cuanto a dosis-respuesta y tiempo-respuesta se refiere para MV130 utilizando la línea celular THP1-XBlue™.
2. Estudiar y comparar la capacidad de MV130 para estimular DCs humanas derivadas de monocitos (hmoDCs) obtenidas de pacientes que sufren RRTIs y donantes sanos.
 - 2.1. Analizar y comparar la expresión de moléculas co-estimuladoras de superficie inducidos por MV130 en hmoDCs.
 - 2.2. Determinar y comparar el perfil de citoquinas inducido por MV130 en hmoDCs en

ambos grupos.

- 2.3. Estudiar y comparar la capacidad de hmoDCs activadas con MV130 para polarizar respuestas T en pacientes con RRTIs y donantes sanos.
- 2.4. Analizar y comparar la capacidad MV130 en células dendríticas totales (tDCs) aisladas de pacientes con RRTIs e individuos sanos.
3. Estudios transcriptómicos globales comparativos utilizando *Gene Array* (Agilent) en hmoDCs de donantes sanos estimulados con MV130 y el control (contiene todos los excipientes del preparado excepto las bacterias).
 - 3.1. Validación de los análisis de *Gene Array* con experimentos funcionales de inhibición de MyD88 y RIPK2 para estudiar la contribución de TLRs y NLRs, respectivamente.
 - 3.2. Estudio del papel de IL-10 y de componentes del inflamasoma en el mecanismo de acción de MV130 en hmoDCs.
4. Estudio de la contribución de los componentes Gram positivas y Gram negativas de MV130 en los efectos ejercidos en hmoDCs.

Bloque II: Propiedades inmunomoduladoras de MV140 (Uromune®) en células dendríticas humanas.

1. Optimización de las condiciones de ensayo en cuanto a dosis-respuesta y tiempo-respuesta se refiere para MV140 utilizando la línea celular THP1-XBlue™.
2. Estudiar la capacidad de MV140 para estimular hmoDCs obtenidas de donantes sanos.
 - 2.1. Analizar y comparar la expresión de moléculas co-estimuladoras de superficie inducidos por MV140 y sus componentes individuales en hmoDCs.
 - 2.2. Determinar y comparar el perfil de citoquinas inducido por MV140 y sus componentes individuales en hmoDCs.
 - 2.3. Estudiar y comparar la capacidad de hmoDCs activadas con MV140 y cada uno de los componentes que la forman para de polarizar respuestas T en donantes sanos.
 - 2.4. Analizar y comparar la capacidad MV140 en tDCs aisladas de individuos sanos.
3. Estudiar los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV140 en DCs humanas a nivel molecular.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Preparaciones bacterianas polivalentes

MV130 (Bactek®) y **MV140 (Uromune®)** son preparaciones polivalentes bacterianas (PBPs) producidas por Inmunotek S.L. (Madrid, España) y compuestas por diferentes especies de bacterias enteras en distintas proporciones inactivadas por calor (**Tabla M.3**).

Tabla M.3 Composición de las preparaciones polivalentes bacterianas MV130 (Bactek®) y MV140 (Uromune®).

PBP	MV130 (Bactek®)	MV140 (Uromune®)
Composición bacteriana	Bacterias Gram positivas • <i>Streptococcus pneumoniae</i> 60% • <i>Staphylococcus aureus</i> 15% • <i>Staphylococcus epidermidis</i> 15%	Bacterias Gram positivas • <i>Enterococcus faecalis</i> 25%
	Bacterias Gram negativas • <i>Klebsiella pneumoniae</i> 4% • <i>Moraxella catarrhalis</i> 3% • <i>Haemophilus influenzae</i> 3%	Bacterias Gram negativas • <i>Escherichia coli</i> 25% • <i>Klebsiella pneumoniae</i> 25% • <i>Proteus vulgaris</i> 25%
Excipientes	Glicerol 50% • Esencia de piña 1 mL • Cloruro sódico 9 mg/mL • Agua inyectables 1 mL	

2. Pacientes con infecciones recurrentes respiratorias y donantes sanos

Las muestras sanguíneas de 9 pacientes con infecciones recurrentes respiratorias (RRTIs) (8 mujeres y 1 varón, edad media 52 ± 5 años, rango 34-74 años) se reclutaron por la Dra. Silvia Sánchez-Ramón en la Unidad de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos los pacientes incluidos en el estudio han sufrido RRTIs definidas como tres o más episodios de infecciones del tracto respiratorio superior o inferior, o un episodio de neumonía al año durante más de un año de forma consecutiva. Ninguno de los pacientes había recibido previamente tratamiento con MV130. Las características clínicas detalladas de los pacientes, incluyendo el diagnóstico principal y la terapia de rutina se recogen en la **tabla M.4**. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España (C.P.-C.I. 16/191-E_TFG). El consentimiento informado se obtuvo de todos los sujetos incluidos en el estudio.

Las muestras de sangre periférica obtenidas a partir de 9 donantes sanos (8 mujeres y 1 varón, edad media 35 ± 4 años, rango 22-51 años) se obtuvieron también en el Hospital Clínico San Carlos. Además, se obtuvieron *buffy coat* de donantes sanos del Centro de Transfusiones de la Comunidad Autónoma de Madrid (Valdebernardo, Madrid).

Tabla M.4 Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con RRTIs incluidos en el estudio.

Paciente No.	Sexo (F/M)	Edad (años)	Diagnóstico principal	Terapia de rutina	Historial de infecciones	Frecuencia (episodios/año)
# 1	F	39	Linfangiomiomatosis. GMSI.	Ninguna.	URTIs desde la infancia.	5
					LRTIs.	5
					Neumonía bilateral en 2014.	
					RUTIs desde la pubertad.	3
Bacteriemia en 2014.						
# 2	F	74	Infecciones recurrentes del tracto respiratorio. Asma.	Fluticasona-salmeterol inhalado.	URTIs.	10
LRTIs.						10
# 3	F	49	Deficiencia selectiva de IgA. Déficit en la producción de anticuerpos. Celiacía.	Ninguna	URTIs desde la infancia.	7
					LRTIs desde la infancia.	
# 4	M	69	Infecciones recurrentes del tracto respiratorio. GMSI.	Tiotropium, lorazepam, citrato de cafeína, nitroglicerina, dosis baja de aspirina.	LRTIs	10
# 5	F	35	Rinoconjuntivitis-asma alérgica. Microadenoma pituitario.	Fluticasona-salmeterol inhalado.	Meningitis a los 3 años	
					URTIs	5
Tres neumonías previas.						
# 6	F	64	Artritis reumatoide.	Prednisona (10 mg/día).	URTIs	
					LRTIs	3
					Neumonía en 2009 y 2013.	3
# 7	F	38	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos. Baja IgM.	Estradiol / norgestrel.	URTIs	5
					LRTIs	3
					Dos episodios de neumonía en 2013 y 2014.	
# 8	F	34	Inmunodeficiencia variable común. Bronquiectasia.	IGIV (0,6 g/kg/mes).	URTIs	3
					LRTIs	3
# 9	F	57	Bronconeumopatía obstructiva crónica.	Ninguno.	URTIs	3

LRTI: Infecciones respiratorias de las vías bajas (bronquitis y neumonía); URTI: Infecciones respiratorias de las vías altas; RUTI: Infecciones recurrentes del tracto urinario. GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto. IGIV: Inmunoglobulina intravenosa.

3. Medios de cultivos y reactivos

Como medio de cultivo se empleó RPMI 1640 (L-glutamine, 25 mM Hepes) suplementado con normocina a concentración final de 100 µg/mL, penicilina/estreptomina a 50 µg/mL, suero bovino fetal (FBS) al 10%, aminoácidos no esenciales al 1%, MEM-vitaminas al 1% y piruvato sódico 1 mM (RPMI completo). Para los experimentos con la línea celular THP1-XBlue™ (Invivogen) se empleó RPMI completo al que se adicionó glucosa (4.5 g/L) y zeocina (200 µg/mL).

Para los experimentos de inhibición se empleó **Pepinh-MYD** (Invivogen) un péptido bloqueante de MyD88 o su control (Pepinh-control); **Gefitinib** (Invivogen), un inhibidor farmacológico selectivo de RIPK2; **Piceatannol** (Enzo), un inhibidor farmacológico selectivo de Syk; **SB202190** (Invivogen), un inhibidor farmacológico selectivo de MAPKp38; **SP600125** (Invivogen), un inhibidor farmacológico selectivo de JNK; **U0126** (Invivogen), inhibidor farmacológico selectivo de MEK1/2; **anti-IL-10 humana (α-IL-10)**, anticuerpo monoclonal específico neutralizante de IL-10 (clone JES3-9D7, Biolegend).

4. Líneas celulares THP1 y THP1-XBlue™

La línea celular THP1-XBlue™ es una línea monocítica humana que ha sido transfectada de manera estable con un plásmido que expresa y secreta al medio fosfatasa alcalina bajo el control de un promotor inducible por los factores de transcripción NF-κB y AP-1. Tras la estimulación de los TLR, las células THP1-XBlue™ activan dichos factores de transcripción y se induce la secreción de la fosfatasa alcalina al medio, donde es detectada colorimétricamente con QUANTI-Blue™ (Invivogen) mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 620-650 nm en el lector de ELISA *EZ Read 400 Microplate Reader* (Biochrom).

Para los experimentos de optimización de dosis-respuesta y tiempo-respuesta, las THP1-XBlue™ se sembraron en una placa de 96 pocillos a una concentración de 10^6 células/mL y se estimularon con MV130, MV140 o control (compuesto por todos los excipientes del PBP a excepción de las bacterias) en un rango de concentraciones crecientes de 10^2 a 10^8 bacterias/mL durante 2, 4, 5, 8 y 24 h. Además, el grupo de bacterias Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis* 15% ($1,5 \times 10^6$ bacterias/mL), *Staphylococcus aureus* 15% ($1,5 \times 10^6$ bacterias/mL) y *Streptococcus pneumoniae* 60% (6×10^6 bacterias/mL) y el grupo de bacterias Gram negativas: *Moraxella catarrhalis* 3% (3×10^5 bacterias/mL), *Klebsiella pneumoniae* 4% (4×10^5 bacterias/mL), y *Haemophilus influenzae* 3% (3×10^5 bacterias/mL) que forman MV130 se cultivaron durante 24 h a la misma concentración que representan en el preparado. Las bacterias individuales que constituyen MV140 (*Enterococcus faecalis* 25%, *Escherichia coli* 25%, *Klebsiella pneumoniae* 25% o *Proteus vulgaris* 25%) se cultivaron durante 24 h a la concentración que cada uno de los componentes representa en el preparado, es decir, $2,5 \times 10^6$ bacterias/mL. Para todos los casos, la activación NF-κB/AP-1 se cuantificó con 180 μL de QUANTI-Blue™ (Invivogen) al que se añadieron 20 μL del sobrenadante del cultivo de células THP1 a las distintas condiciones ensayadas. La mezcla se incubó a 37°C y la DO se leyó a 620-650 nm a diferentes tiempos. Los niveles de IL-8 se cuantificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo sin células mediante ELISA.

5. Aislamiento de las distintas poblaciones celulares

5.1. Obtención de PBMC a partir de sangre periférica

A partir de las muestras de sangre periférica obtenidas tanto del Hospital Clínico San Carlos como del Centro de Transfusiones, se llevó a cabo el aislamiento (**Figura M.15**) de la fracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) mediante centrifugación en gradiente de Ficoll como se ha descrito en el artículo de Palomares y col. (101). La centrifugación de las muestras se realizó durante 20 min a 800 g a temperatura ambiente. Tras la separación en gradiente, la nube blanquecina que aparece en la interfase (que

contiene el PBMC) se recogió y lavó con PBS. Por último, se realizó un recuento celular al microscopio óptico y se analizó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán.

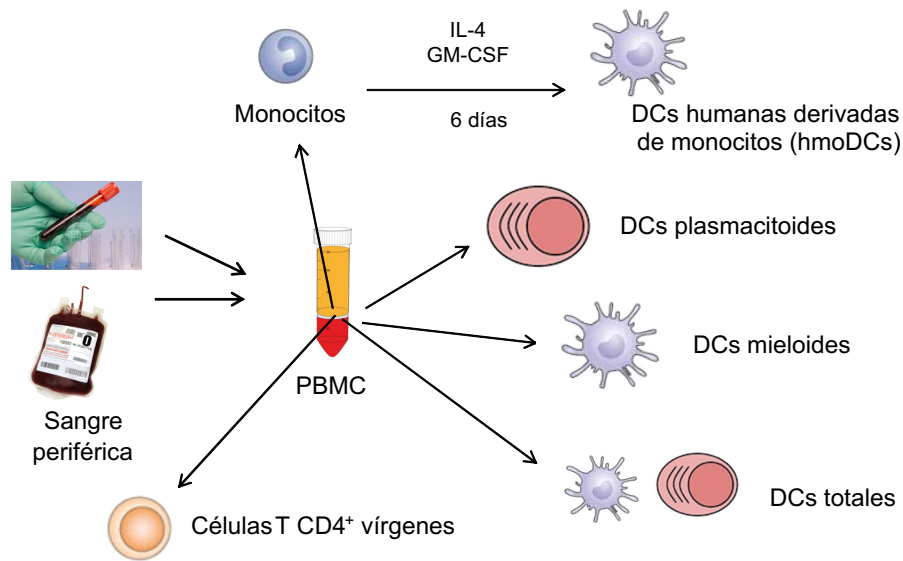


Figura M.15 Esquema de los aislamientos de las distintas poblaciones celulares utilizadas en este trabajo, empleando como material de partida PBMC aislado a partir de sangre periférica obtenido de buffy coat o de extracción convencional. A partir del PBMC se obtienen células dendríticas totales (tDCs), células dendríticas mieloides (mDCs) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs). Además, se obtuvieron monocitos para su posterior diferenciación a hmoDCs, y células T CD4⁺ vírgenes.

5.2. Purificación de monocitos a partir de PBMC

Los monocitos se purificaron a partir de PBMC utilizando anticuerpos específicos anti-CD14 humanos acoplados a micro-esferas magnéticas y empleando el sistema de separación magnética AutoMACS (Miltenyi Biotec) mediante selección positiva siguiendo las instrucciones del fabricante en el Centro de Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia (CCMF) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

5.3. Obtención de DCs humanas derivadas de monocitos (hmoDCs)

Para diferenciar los monocitos purificados a DCs inmaduras, los monocitos se incubaron en placas de 24 pocillos en medio RPMI completo a una concentración de 2×10^6 células por pocillo con un volumen final de 2 mL en presencia de IL-4 (100 ng/mL) y GM-CSF (100 ng/mL) a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 6 días. La pureza y fenotipo de los monocitos y de las hmoDCs fue analizada por citometría de flujo con marcadores específicos de linaje: HLA-DR, CD86, CD14 y CD83, en el CCMF de la UCM.

5.4. Purificación de células T CD4⁺ vírgenes

Las células T CD4⁺ vírgenes se purificaron a partir del PBMC utilizando el Kit *Naïve CD4⁺ T Cell* (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. La fracción negativa obtenida se purificó adicionalmente con anti-CD14 y anti-CD45RO

humanos acoplados a micro-esferas magnéticas y empleando el sistema de separación magnética AutoMACS por selección negativa, en el CCMF de la UCM. La pureza obtenida fue del 99% y se comprobó mediante citometría de flujo con los siguientes marcadores: CD45RA-FITC, CD4-PerCP y CD3-APC.

5.5. Aislamiento de células dendríticas totales sanguíneas

Para el aislamiento de las células dendríticas totales se partió en cada purificación de 10^8 de PBMC y se empleó el kit *Blood Dendritic Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante con ligeras modificaciones. Con este kit se consiguió aislar tanto mDCs como pDCs. La fracción estaba enriquecida con más del 90% en tDCs, la que se cuantificó con los siguientes marcadores: CD1c-FITC, CD303-PE, CD19-PyC7 y HLA-DR-APC, en el CCMF de la UCM.

5.6. Obtención de mDCs y pDCs sanguíneas

Para el aislamiento de mDCs y pDCs se partió en cada purificación de 10^8 de PBMCs y se llevó a cabo un proceso de separación secuencial. Primero se obtuvo la fracción de mDCs mediante una selección positiva empleando el kit *CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec) suplementado con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD14 humanos acoplados a micro-esferas magnéticas (Miltenyi Biotec). La fracción negativa resultante se utilizó para purificar la población de pDC mediante el kit *CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit* (Miltenyi Biotec). El porcentaje de enriquecimiento de mDCs y pDCs fue del 90% y 40%, respectivamente, y se cuantificó con los siguientes marcadores: CD1c-FITC, CD11c-PE, CD19-PyC7 y HLA-DR-APC (mDCs); CD123-FITC, CD303-PE y HLA-DR-APC (pDCs), en el CCMF de la UCM.

6. Cultivos celulares

6.1. Caracterización fenotípica de hmoDCs estimuladas con MV130, MV140 y sus componentes

Las hmoDCs se cultivaron a una concentración de 10^6 células/mL en medio RPMI completo a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 1, 3, 6 y 24 h en presencia de los distintos estímulos. Para los análisis de MV130 (Bactek®) y sus componentes, los estímulos empleados fueron: control (todos los excipientes del preparado a excepción de las bacterias), MV130 (10^7 bacterias/mL), las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis* 15% ($1,5 \times 10^6$ bacterias/mL), *Staphylococcus aureus* 15% ($1,5 \times 10^6$ bacterias/mL) y *Streptococcus pneumoniae* 60% (6×10^6 bacterias/mL) y el grupo de bacterias Gram negativas: *Moraxella catarrhalis* 3% (3×10^5 bacterias/mL), *Klebsiella pneumoniae* 4% (4×10^5 bacterias/mL), y *Haemophilus influenzae* 3% (3×10^5 bacterias/mL). Estas bacterias se usaron en la proporción presente en el preparado. Para

los estudios con MV140 (Uromune®), las hmoDCs se trataron con control (todos los excipientes del preparado a excepción de las bacterias), MV140 (10^7 bacterias/mL) o cada uno de las bacterias individuales (*Enterococcus faecalis* 25%, *Escherichia coli* 25%, *Klebsiella pneumoniae* 25% o *Proteus vulgaris* 25%) a una concentración de $2,5 \times 10^6$ bacterias/mL, que es la concentración que representa cada una de ellas en el preparado.

Transcurridos los distintos tiempos de incubación, las hmoDCs se recogieron y centrifugaron. Por un lado, el sedimento de células se empleó para analizar su fenotipo mediante citometría de flujo con los siguientes marcadores: HLA-DR-FITC, CD86-PE, CD14-PerCP y CD83-APC, y los niveles de expresión de ARNm de IL-12p35, IL-12p40, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23, IL-4, IL-10, y EF1- α . Por otro lado, los sobrenadantes libres de células se guardaron a -20°C para la cuantificación de IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23, IL-4 e IL-10 mediante ELISA.

El PBMC se cultivó a una concentración de 10^6 células/mL en medio RPMI completo a 37°C con una atmósfera al 5% de CO_2 durante 3 y 5 días en presencia de los distintos estímulos (control y MV130). Posteriormente, se recogieron las células y se centrifugaron para medir en el sobrenadante las distintas citoquinas (IFN- γ , IL-17A, IL-5 e IL-10) mediante ELISA.

6.2. Experimentos de inhibición

Para los experimentos de inhibición, las hmoDCs se pre-incubaron durante 6 h con Pepinh-MYD $50 \mu\text{M}$ o Pepinh-Control, o durante 30 min con Gefitinib $5 \mu\text{M}$ o su correspondiente control (DMSO). A continuación, las células se estimularon con MV130 (10^7 bacterias/mL) o control durante 24 h. En los experimentos de MV140, las hmoDCs se pre-incubaron durante 2 h con Pepinh-MYD $25 \mu\text{M}$, o durante 30 min con Piceatannol $25 \mu\text{M}$, U0126 ($1 \mu\text{M}$), SB202190 ($1 \mu\text{M}$) o SP600125 ($10 \mu\text{M}$) (o sus correspondientes controles, Pepinh-control o DMSO). Posteriormente, las células se estimularon con MV140 (10^7 bacterias/mL) o control durante 4 h. Tanto en los experimentos de MV130 como de MV140, se cuantificaron los niveles de expresión de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 mediante la técnica ELISA en los sobrenadantes libres de células.

En los experimentos de bloqueo de IL-10, las hmoDCs se pre-incubaron durante una hora con el anticuerpo monoclonal específico neutralizante de IL-10 (α -IL-10) a una concentración de $2,5 \mu\text{g/mL}$ o su correspondiente isotipo control. Transcurrido el tiempo de pre-incubación, las hmoDCs se trataron con MV130 a una concentración de 10^7 bacterias/mL durante 24 h, en presencia del anticuerpo bloqueante o el isotipo control. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de expresión de IL-12p70, IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-23 tanto a nivel de proteína mediante ELISA como a nivel de ARNm por PCR cuantitativa.

Los resultados obtenidos del ELISA se expresaron en valores absolutos de concentración o como porcentajes de inhibición frente a su correspondiente control, mediante la siguiente fórmula:

% de inhibición: $100 - ([\text{Inhibidor}] * 100 / [\text{Control}])$

[Inhibidor] = La concentración de una determinada citoquina en presencia del inhibidor (Pepinh-MYD, Gefitinib o Piceatannol)

[Control] = La concentración de una determinada citoquina en presencia de su control (Pepinh-Control o DMSO)

6.3. Experimentos de co-cultivo con células T CD4⁺ vírgenes

Las hmoDCs tanto de individuos sanos como de pacientes se co-cultivaron en presencia de MV130, MV140, componentes individuales, el conjunto de las bacterias Gram positivas y Gram negativas o control (los excipientes que forman el preparado a excepción de las bacterias) con células T CD4⁺ vírgenes alogénicas purificadas a partir de *buffy coat* de donantes sanos en una ratio 1:5 (hmoDCs:células T CD4⁺ vírgenes) durante 3 o 5 días y se cuantificaron los niveles de IFN- γ , IL-17A, IL-5 e IL-10 por ELISA. El mismo tipo de experimentos se llevó a cabo utilizando tDCs obtenidas de los donantes sanos y pacientes.

6.3.1. Análisis de proliferación de células T CD4⁺ mediante experimentos de dilución con CFSE

El CFSE (carboxifluorescein diacetato succinimildil éster) es un compuesto muy utilizado en el estudio de proliferación de células. Cuando una célula marcada con CFSE se divide, todos sus descendientes tienen la mitad de la cantidad de fluorescencia (195). Las células T CD4⁺ vírgenes purificadas se marcaron con CFSE (Molecular Probes) antes del co-cultivo. Para ello, se añadió la solución de CFSE a una concentración final de 10 μM y las células se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se añadió medio RPMI completo y las células se incubaron 5 min en hielo. Las células se lavaron tres veces con medio RPMI completo y se co-cultivaron durante 3 o 5 días con hmoDCs y los estímulos correspondientes. Se analizó la intensidad de fluorescencia de las células en división mediante un citómetro FACSCalibur del CCMF de la UCM.

6.3.2. Re-expansión clonal

La estimulación *in vitro* de linfocitos T se utiliza para facilitar la expansión de las células T y el estudio de la función de las mismas. Los anticuerpos específicos para el complejo TCR-CD3 proporcionan una señal de activación inicial (señal 1), pero la proliferación depende de la señal co-estimuladora, proporcionada generalmente a través de la molécula CD28 (señal 2) (196). Para llevar a cabo la re-estimulación policlonal, se tapizó en una placa de 96 pocillos con 100 μL del anticuerpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3 (E-Biosciences) diluido en PBS 1X a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 18 h a 4°C. Las células del co-cultivo se lavaron dos veces con

PBS 1X y se re-suspendieron en medio RPMI completo con el anticuerpo monoclonal anti-CD28 clon 28.6 (E-Biosciences) diluido a una concentración de 1 µg/mL. Las células se sembraron en 200 µL/pocillo que se incubaron a 37°C durante 24 h. El mismo tipo de experimento se llevó a cabo con células T CD4⁺ generadas tras estimulación con tDCs.

Por otro lado, las células T CD4⁺ generadas en el co-cultivo se lavaron y se re-estimularon con 25 ng/mL PMA (forbol 12-miristato-13-acetato) y 1 µg/mL ionomicina durante 6 h. Estos dos compuestos estimulan la producción de citoquinas intracelulares. En las últimas 4 h de estimulación se añadieron 10 µg/mL de Brefeldin A (BFA) que impide el transporte de proteínas del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, bloqueando así la secreción de las citoquinas al exterior y permitiendo que se depositen en el citoplasma. Transcurridas las 6 h, se procedió a realizar la tinción intracelular utilizando los anticuerpos específicos descritos en la **tabla M5**.

7. Citometría de flujo

Tinción superficial

En todos los casos, para los experimentos en los que se llevaron a cabo tinciones celulares superficiales, se siguió el siguiente protocolo. Las células se recogieron y centrifugaron a 300 g durante 7 min a temperatura ambiente y se lavaron con 1 mL de *running buffer* (PBS EDTA 2 mM y 0,5% de BSA (*bovine serum albumin*)). Las células se resuspendieron en 50 µL de *running buffer* y se añadieron los anticuerpos correspondientes (**Tabla M.5**), que se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con 1 mL de *running buffer* y se centrifugaron a 300 g durante 7 min a temperatura ambiente. El sedimento de células obtenido se resuspendió en 200 µL de PBS-PFA 0,1%. Para su análisis por citometría de flujo se utilizó un citómetro FACSCalibur del CCMF de la UCM.

Tinción intracelular

Para llevar a cabo la tinción intracelular se procedió como se detalla a continuación. Primero, se realizó una tinción de superficie con los marcadores CD3 y CD4, permitiendo seleccionar la población de linfocitos T CD4⁺. En segundo lugar, se llevó a cabo la permeabilización de la membrana plasmática para realizar la tinción con anticuerpos anti-citoquinas localizadas en el citoplasma. Tras realizar la tinción superficial (descrita en el párrafo anterior), las células se lavaron dos veces con 1 mL de *running buffer*. Posteriormente se incubaron las células con 250 µL de *buffer* de permeabilización *Cytofix/Cytoperm solution* (BD Biosciences) durante 20 min en frío. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con *Perm/Wash Buffer* (BD Biosciences) y se incubaron con los anticuerpos específicos marcados fluorescentemente frente a IFN-γ, IL-4, IL17A e IL-10 durante 30 min a temperatura ambiente (**Tabla M.5**). Finalmente, las células se lavaron dos veces con 1 mL de *running buffer* y se re-suspendieron en 200 µL de

PBS-PFA 1% para su posterior análisis por citometría de flujo en el CCMF de la UCM. En todos los casos, los análisis de citometría de flujo se procesaron con el software WEASEL 3.0.

Tabla M.5 Características de los anticuerpos empleados para citometría de flujo. Se indica la localización celular de los marcadores, el fluoróforo acoplado, la casa comercial y el volumen usado.

Anticuerpo anti-	Fluoróforo	Localización celular	Casa comercial	Volumen (μL)	
Mouse IgG2a	FITC	Membrana citoplasmática	Miltenyi-Biotec	1	
Mouse IgG1	PE			1	
Mouse IgG2a	PerCP			1	
Mouse IgG1	APC			1	
HLA-DR clone: AC122	FITC			1	
HLA-DR clone: AC122	APC			2	
CD86 clone: FM95	PE			1	
CD14 clone: TÜK4	PerCP			1	
CD83 clone: HB15	APC			1	
CD1c clone AD5-8E7	FITC			2	
CD11c clone: MJ4-27G12	PE			2	
CD4 clone: clone: VIT4	PerCP			2	
CD123 clone: AC145	FITC			5	
CD45RA clone: REA562	FITC			1	
CD303 clone: AC144	PE			5	
CD19 clone: HIB19	PyC7			Biolegend	2
CD3 clone: OKT3	APC			BD Pharmingen	5
IFN clone: B27	Alexa 488			BD Pharmingen	2,5
IL4 clone: 8D4-8	Alexa 488			BD Pharmingen	0,5
IL17A clone: BL168	PE			Biolegend	2,5
IL10 clone: JES3-19F1	PE	Biolegend	2,5		

8. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA

La concentración de IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-4, IFN- γ e IL-5 se determinó en los sobrenadantes libres de células de los cultivos mediante ELISA en sándwich, empleando kits comerciales específicos para cada una de ellas (BD biosciences). La producción de IL-23 e IL-17A se cuantificó también mediante ELISA en sandwich utilizando *Human-IL-23 ELISA Ready-SET-Go!*[®] (e-Biosciences) y *quantikine ELISA kit* (RD Systems), respectivamente. En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, los anticuerpos de captura se tapizaron en las placas de ELISA, tras lavar se realizó un bloqueo con 5% FBS en PBS 1X y se añadieron las muestras o los estándares internos para elaborar una recta patrón. Después de lavar, los mAbs conjugados con biotina y estreptavidina marcada con peroxidasa se pre-incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y se añadieron para detectar las citoquinas unidas. Tras 1 h de incubación, se realizó un lavado y se procedió al revelado de las mismas con *o*-fenilendiamina (OPD, 0,63 mg/mL) disuelto en citrato sódico 0,1 M, pH 5,0, con 4% de metanol y un 0,03% de H₂O₂ (100 μL/pocillo). La reacción se detuvo con 100 μL de ácido sulfúrico 3N. La medida de cada pocillo se realizó a 450 o 492 nm, dependiendo de la citoquina particular y el kit utilizado,

en un lector de ELISA *iMark™ Microplate Reader* (Bio-Rad).

9. Inmunodetección de proteínas

Para el análisis por Western Blot se emplearon hmoDCs y células THP1. Las hmoDCs se pre-incubaron con Pepinh-MYD o Pepinh-control durante 2 h, o con Gefitinib o DMSO durante 30 min antes de la estimulación con control o MV130 (30 min). Para detección de la caspasa 1 a nivel de proteína, se trataron las hmoDC durante 24 h con el control positivo: hidróxido de aluminio (10 µg/mL) + LPS (100 ng/mL), control o MV130. Para los experimentos de inhibición, las células THP1 se pre-incubaron durante 2 h con Pepinh-MYD 25 µM o Pepinh-control, o durante 30 min con piceatannol 25 µM o DMSO. A continuación, las THP1 se estimularon con MV140 (10⁷ bacterias/mL) o control durante 15 min.

Tabla M.6 Condiciones experimentales de las inmunodetecciones según la temperatura y tiempo de incubación, la dilución del anticuerpo, la especie, y la masa molecular de la proteína detectada.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Incubación	Dilución	Especie	Tamaño (kDa)
Anti-fosfo-IκBα (Ser32/36)	Cell Signaling	4°C/18h	1/1000	Ratón	40
Anti-fosfo-IKKα/IKKβ (Ser176/177)	Cell Signaling	4°C/18 h	1/1000	Conejo	85
Anti-caspasa 1	Santa Cruz	4°C/18 h	1/200	Ratón	45
Anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	4°C/18 h	1/1000	Conejo	42/44
Anti-ERK1/2	Cell Signaling	4°C/18 h	1/1000	Conejo	42/44
Anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling	4°C/18 h	1/1000	Conejo	43
Anti-p38 MAPK	Cell Signaling	4°C/18 h	1/1000	Conejo	43
Anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling	4°C/18 h	1/1000	Conejo	46/54
Anti-SAPK/JNK	Cell Signaling	4°C/18 h	1/1000	Conejo	46/54
Anti-β-Actina	SIGMA	TA/1 h	1/5000	Ratón	42
Anti-conejo (conjugado con HRP)	Bio-Rad	TA/1 h	1/3000	Cabra	–
Anti-ratón (conjugado con HRP)	Pierce	TA/1 h	1/2500	Cabra	–

TA (temperatura ambiente), HRP (horseradish peroxidase)

Tras la estimulación, las células se lisaron y se procedió a la extracción y cuantificación de proteínas totales. La lisis celular se llevó a cabo con PBS/Triton 1% en presencia de 1 mM PMSF (Sigma), 1 µg/mL Leupeptina (Bachem) y 1 µg/mL Aprotinina (Roche) durante 30 min a 4°C con vórtex cada 10 min. Tras la centrifugación a 10000 g durante 15 min a 4°C, se procedió a la cuantificación de las proteínas en el sobrenadante. La cuantificación se realizó utilizando *Micro BCA Protein Assay Kit* (161) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

La muestra se aplicó en un gel de poliacrilamida al 10 o 15% y las proteínas se separan

electroforéticamente en PAGE-SDS (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de acuerdo a su masa molecular. La polimerización de los geles y el proceso de electroforesis se realizaron en *Mini PROTEAN Tetra Cell kits* (Bio-Rad), según el procedimiento descrito por Laemmli (197). Se mezclaron 10 µg de proteína total con el tampón de carga (Tris-HCL 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20% y β-mercaptoetanol 5%) que se incubaron 5 min a 95°C para conseguir su completa desnaturalización. La electroforesis se desarrolló en tampón de corrido (Tris/HCL 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%). Posteriormente, las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie o, alternativamente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunotransferencia se realizó utilizando el sistema de transferencia en medio semi-seco *Trans Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad). Se aplicó una intensidad de corriente de 1 mA/cm² durante 1 h, comprobando la eficacia de la transferencia mediante la tinción de las proteínas fijadas en la membrana con rojo Ponceau. A continuación, la membrana se incubó 1 h con la solución de bloqueo [Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%, (TBS-T) con BSA 5%]. Las membranas se incubaron durante 18 h a 4°C con los distintos anticuerpos primarios y tras 3 lavados con TBS-T se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios: anti-ratón obtenido en cabra (1:2500, Pierce) o anti-conejo obtenido en cabra (1:3000, Bio-Rad) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) durante 1 h a temperatura ambiente (**Tabla M.6**). Después de lavar, la señal se detectó con *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad) en un revelador *LAS-3000 imager* (Fujifilm). Las bandas detectadas se densitometraron y cuantificaron con el programa *Multi Gauge*.

10. Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

La extracción de ARN total se realizó con el kit comercial de *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se llevó a cabo la lisis celular con *buffer* de lisis (*RLT buffer* y β-mercaptoetanol 1%). Este lisado se cargó en las columnas *QIA-Shedder columns* (Qiagen) que se centrifugaron a 14000 rpm 2 min. Posteriormente, se añadió etanol al 75% a los sobrenadantes obtenidos, que se transfirieron a columnas *RNeasy-columns* (Qiagen). Tras una centrifugación a 8700 rpm durante 15 seg, se procedió al primer lavado con tampón RW1. A continuación, se añadió el mix DNase 1 (*buffer RDD+ stock de DNase I*) a cada una de las columnas y se incubó durante 15 min. Se realizó un segundo lavado y se añadió *buffer RPE* a cada una de las columnas dos veces. Por último, se emplearon 30 µL de agua libre de RNAasa para recoger el ARN retenido en la columna.

A partir del ARN se sintetizó el ADNc mediante transcripción inversa en el que el ARN de cadena simple se transcribe en ADNc de doble cadena gracias a la acción de la enzima transcriptasa inversa, utilizando el kit *PrimeScript™ RT reagent kit Perfect Real Time* (Takara) siguiendo las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones. Para ello, se preparó la siguiente mezcla:

- *5X PrimeScript Buffer* 6 μL
- *PrimeScript RT Enzyme Mix I* 1 μL
- *Oligo d T Primer (50 μM)* 1 μL
- *Random 6 mers (100 μM)* 1 μL
- ARN total 25 μL

La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler® gradient* (Eppendorf), utilizando el siguiente programa:

- 37°C 15 min (Transcripción reversa)
- 85°C 5 seg (Inactivación de la transcriptasa reversa mediante tratamiento con calor)
- 4 °C

La concentración del ADNc se cuantificó en un *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* midiendo la absorbancia a 260 nm en 1,5 μL de la muestra sin diluir. El software incorporado calcula la concentración exacta de la muestra aplicando la ley de Lambert-Beer, en la que la absorbancia de 1 corresponde a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para ADN bicatenario, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para ADN monocatenario y ARN y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para oligonucleótidos. Por otro lado, este software proporciona también el coeficiente entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm, indicando el grado de pureza de la muestra, ya que a 280 nm también presentan absorbancia las proteínas. Para que el ADN o ARN sea considerado como puro, el ratio 260/280 debe ser entre 1,8-2. Además, existen otros contaminantes como el EDTA, carbohidratos y fenol que absorben a 230, es por ello que el ratio 260/230 debe considerarse también, siendo el óptimo entre 2-2,2.

11. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

El ADNc obtenido se diluyó en agua hasta concentración final de 200 ng/ μL . La reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo en placas de 384 pocillos *MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode* (Life Technologies) en un volumen final de 10 μL por pocillo: 4 μL corresponden al ADN diluido y 6 μL del mix (5 μL de *FastStart SYBR Green* -Roche Diagnostics- y 1 μL de la mezcla de los cebadores *-forward* y *-reverse-* de cada gen). La secuencia de los cebadores se encuentra en la **tabla M.7**. La placa se cubrió con un papel adhesivo específico *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystem). La reacción se llevó a cabo en un sistema de PCR a tiempo real modelo *ViiA TM 7 Real-Time PCR System* en la Unidad de Genómica de la UCM.

La expresión de cada gen se normalizó respecto al factor de elongación 1 α (EF1- α , *elongation factor 1 α*), que es el gen utilizado como referencia ya que su expresión no depende

del tratamiento empleado. Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias calculados según: $(2^{-\Delta CT}) * 10000$, donde, $\Delta CT = [CT_{(gen)}] - [CT_{(EF1-\alpha)}]$.

Tabla M.7 Secuencia de los cebadores empleados para el análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR.

Gen	Secuencia de los cebadores	
	Forward	Reverse
IL-12p35	ATGATGGCCCTGTGCCTTAGT	TGCCTCTTAGGATCCATCAGAAG
IL-12p40	GCATCTGTGCCCTGCAGTTA	CTTATTATCTTCCACTTTTCCTCCAAA
IL-6	GGTACATCCTCGACGGCATCT	GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC
IL-1 β	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG	TTCGACACATGGGATAACGAGG
IL-23	TCCCCATATCCAGTGTGGAGAT	GTGGATCCTTTGCAAGC
IL-10	GTGATGCCCAAGCTGAGA	CACGGCCTTGCTCTTGT
SOCS3	CCTCAGCATCTCTGTCGGAAGA	GCATCGTACTGGTCCAGGAACT
EF1- α	CTGAACCATCCAAT	GCCGTGTGGCAATCCAAT

12. Gene array: análisis global comparativo del transcriptoma

Se realizó un análisis transcriptómico global comparativo *Gene Array* utilizando la tecnología Agilent, en el Laboratorio de Genómica y Microarrays del Servicio de Oncología Médica en el Hospital Clínico San Carlos. Para ello, hmoDCs (10^6 células/mL) de 4 donantes sanos se estimularon con control o MV130 (10^7 bacterias/mL) durante 24 h. El ARN total de hmoDCs se aisló utilizando TRIzol (Invitrogen). Las células se recogieron y se centrifugaron a 300 g durante 7 min. Se añadió 1 mL de TRIzol a las células y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se dio un vórtex. Tras 3 min de incubación, los tubos se centrifugaron a 12000 g durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación observamos tres fases diferenciadas (**Figura M.16**): ARN, ADN y proteínas.

La fase acuosa superior se traspasó a un tubo de 1,5 mL *RNase free* y se añadieron 500 μ L de isopropanol. Transcurridos 10 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 min a 4°C. El sedimento de ARN se lavó con etanol al 75% a 4°C, se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4°C, se eliminó el etanol y el sedimento se dejó secar durante 10 min a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en 20 μ L de agua estéril libre de RNasas, y se cuantificó la concentración y el ratio de absorción a 260, 280 y 230 en el nanodrop (ver apartado 11.3.).

Además, la calidad del ARN obtenido se determinó utilizando el *Bioanalyzer 2100* (Agilent technologies). El bioanalizador permite obtener un parámetro denominado RIN (*RNA Integrity Number*) que permite determinar la calidad de las muestras de ARN eucariótico total, en base a un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra de ARN totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta. En la **figura M.17** se observan dos ejemplos: la gráfica de la izquierda representa una muestra de ARN de buena calidad con un RIN de 9,40. En

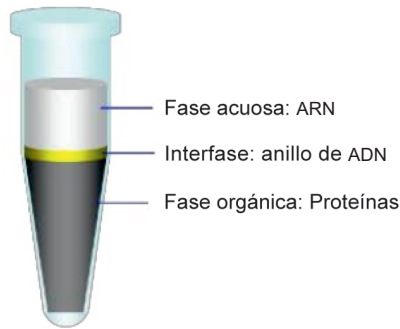


Figura M.16 Separación de las tres fases tras el tratamiento con TRIzol.

cambio, la gráfica de la derecha corresponde a una muestra cuyo RIN es de 2,30, indicando una mala calidad del ARN. Como se puede observar, el patrón de los picos de ambas figuras es muy diferente. En la gráfica de la muestra de RNA excelente (gráfica izquierda), el primer pico corresponde al marcador, el tercer y cuarto pico corresponden al ARN ribosomal de 18s y 28s respectivamente.

Sólo las muestras con un RIN mayor de 7,5 y una concentración de ARN mayor de 100 ng/μL con un ratio 260/230 y 280/230 comprendido entre 1,8 y 2,2 se utilizaron para los análisis posteriores de transcriptómica comparativa global.

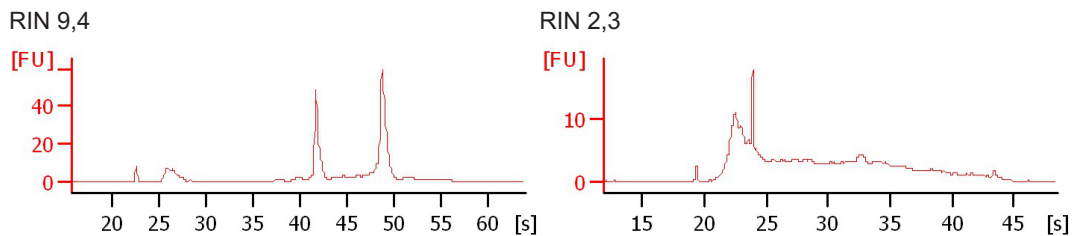
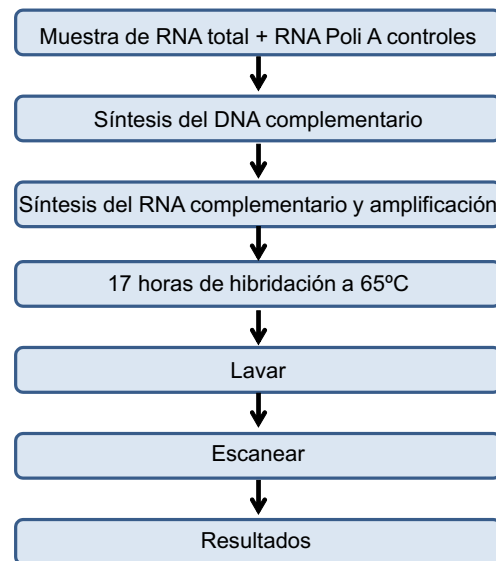


Figura M.17 Ejemplo representativo del análisis electroforético de muestras de ARN con el bioanalizador 2100 (Agilent). Se muestra un ejemplo de ARN de calidad excelente (gráfica de la izquierda) y otra muestra con un ARN muy degradado (gráfica de la derecha). En el eje de ordenadas está representado las unidades fluorescentes (FU) arbitrarias y en el eje de abscisas el tiempo en segundos (s).

Para cuantificar los niveles de expresión de genes regulados por MV130 en las hmoDCs comparado con el control se emplearon los microarrays de ADN G4851B (8X60K) (Agilent) utilizando el protocolo *Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-color* (G4140-90040) (Agilent) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El esquema que se llevó a cabo se muestra en la **figura M.18. Retrotranscripción de ARN a ADN complementario:** para ello, 200 ng de ARN total junto con los *RNA spike-in* apropiados (*RNA Spike-In, Kit, One-Color Agilent p/n 5188-5282*) se incubaron durante 2 h a 40°C en presencia de un mix *T7-primers* y un mix *cDNA Master Mix*. Este último formado por: dNTPs, *first strand buffer*, DTT y una mezcla de enzimas *Affinity Script RNase Block Mix*. Los *ARN spike-in* son transcritos de ARN utilizados para calibrar las mediciones en un experimento de microarrays. **Síntesis y amplificación del ARN complementario:** a partir del ADN complementario se sintetizó el ARN complementario que se marcó con cianina (Cy3). Para ello, se empleó el *Transcription Master Mix* compuesto por *transcription buffer*, DTT, *NTP mix*, inhibidor de RNasas, polietilenglicol (PEG), enzimas *T7 RNA Polymerase* y *Cyanine 3-CTP*. La concentración de ARNc se cuantificó en el NadoDrop ND-100. **Hibridación:** para la reacción de hibridación se emplearon 600 ng de ARNc junto con la solución 2× *Hi-RPM Hybridization Buffer* y se incubó durante 17 h a 65°C. **Resultados y análisis:** Los chips se escanearon utilizando el *Agilent microarray scanner* (Agilent) que genera una serie de archivos, los cuales se extraen

y procesan utilizando el *Feature Extraction software* (Agilent). El informe del control de calidad y los *spike-in* se usaron para descartar los microrrays que no cumplieron un buen criterio de calidad. La intensidad de la señal se normalizó usando el algoritmo de normalización *Percentile Shift*, que toma los valores en \log_2 de todas las intensidades registradas en un array y, tras ordenarlas en orden creciente, toma el rango correspondiente al percentil establecido (en este caso 75%). El análisis se llevó a cabo mediante *Gene Spring GX software* (Agilent). De las 60000 sondas, 19893 sondas expresadas en el 90% de las muestras se sometieron al análisis estadístico.



Las diferencias de expresión de cada sonda se

determinaron calculando el valor del *Fold Change* (FC). Para identificar los genes que muestran evidencia de estar diferencialmente expresados se usó el test estadístico T moderada, aplicando la corrección de Benjamini-Hoechberg para descartar los falsos positivos (198). Se consideró para cada sonda y para cada comparación (MV130 contra Control) que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas si el FC es superior o igual a 2 o inferior o igual a -2 y el valor de la *P* es $\leq 0,05$. Estos datos se depositaron en la base de datos *Expression Atlas* <http://wwwdev.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-MTAB-5259?accessKey=de1e79c6-8193-4bf7-ad3c-e6f75b1e>

El análisis del perfil de la expresión génica fue llevado a cabo mediante distintos programas informáticos y bases de datos: *Gene Codis* (<http://genecodis.cnb.csic.es>) (199, 200), y *DAVID Bioinformatics Resources 6.8 software* (<https://david.ncifcrf.gov/>) (201). El análisis de la interacción de proteínas se realizó con el programa *STRING 10.0* (<http://string-db.org/>).

13. Análisis estadístico

Todos los datos se representan como media \pm SEM. El análisis estadístico para comparar dos grupos se realizó con el test de *t* de Student no pareada o pareada de 2 colas, o el test del signo de rangos de Wilcoxon cuando los datos no se ajustan a una distribución normal. El análisis estadístico para comparaciones múltiples se realizó mediante dos test no paramétricos: el test de Friedman para muestras pareadas o el test de Kruskal-Wallis para muestras no pareadas. El software utilizado para realizar la representación gráfica fue *Graphpad Prism 6*. El nivel de significación se definió como: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I: PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE MV130 (BACTEK®) EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

MV130 (Bactek®) es una vacuna compuesta por bacterias enteras inactivadas por calor (90% de bacterias Gram positivas y 10% de bacterias Gram negativas) que causan la mayoría de las infecciones respiratorias en Europa (4, 5). En un estudio piloto se ha demostrado que MV130 es capaz de reducir significativamente la tasa de infecciones en pacientes que sufren RRTIs (14). Sin embargo, los mecanismos inmunológicos asociados al beneficio clínico no se conocen con exactitud. Los beneficios clínicos reportados tras la administración sublingual de vacunas bacterianas pueden estar mediados tanto por mecanismos inmunológicos antígeno-específicos como inmunomodulación inespecífica asociada a la presencia de inmunomoduladores bacterianos (4, 14).

En la submucosa sublingual y en las amígdalas existe una amplia red de DCs que juegan un papel imprescindible en la iniciación y mantenimiento de respuestas inmunes (101, 202, 203, 204). Los mecanismos inmunológicos que subyacen a nivel molecular al beneficio clínico observado para MV130 son totalmente desconocidos. En particular, la capacidad de MV130 para inmunomodular la función de las DCs humanas no ha sido investigada hasta la fecha.

1. Estudios para optimizar las condiciones de ensayo (dosis y tiempo de respuesta) en células THP1

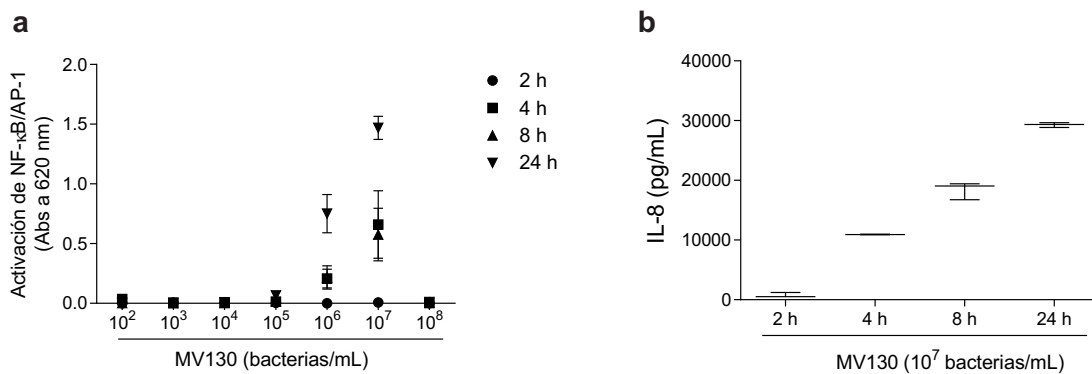


Figura R.19 Optimización dosis-respuesta y tiempo-respuesta de MV130 en la línea celular THP1-XBlue™. (a) Activación de MV130, atendiendo a dos parámetros: concentración de MV130 (bacterias/mL) y tiempo de incubación. (b) Producción de IL-8 en THP1-XBlue™ tras la activación con MV130 durante 2, 4, 8 y 24 h. Los resultados muestran la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

La línea celular THP1-XBlue™ sobre-expresa distintos tipos de receptores, entre los que se encuentran los TLRs, capaces de inducir la activación de los factores de transcripción NF-κB/AP-1 tras la activación con ligandos específicos. NF-κB/AP-1 se encuentra en todos los tipos celulares y está implicado en la activación de multitud de genes de respuesta a inflamación,

infección y otras situaciones de estrés (123).

Las células THP1-XBlue™ se estimularon durante 2, 4, 8 y 24 h con un amplio rango de concentraciones de MV130 (10^2 a 10^8 bacterias/mL). Como se observa en la **figura R.19a**, la activación de NF- κ B/AP-1 se produce a partir de 10^6 bacterias/mL, alcanzando el nivel máximo a 10^7 bacterias/mL. A partir de esta concentración, los niveles de activación de NF- κ B/AP-1 disminuyen drásticamente, como se observa a 10^8 bacterias/mL donde son indetectables. Por otra parte, se cuantificó la producción de IL-8, una citoquina proinflamatoria implicada en el reclutamiento de neutrófilos y que es producida principalmente por células del sistema inmune innato tras la activación de NF- κ B/AP-1 (163, 205, 206). La mayor producción de IL-8 se observó tras 24 h de estimulación con MV130, lo que coincide con el tiempo de activación óptimo de NF- κ B/AP-1 (**Figura R.19b**). Estos resultados permiten establecer una concentración de MV130 de **10^7 bacterias/mL** y un tiempo de **activación de 24 horas** como las condiciones óptimas para realizar los siguientes experimentos.

2. Estudio de la capacidad de MV130 para inmunomodular la función de las DCs de pacientes con RRTIs e individuos sanos

En primer lugar, se realizó un estudio de la capacidad de MV130 para inmunomodular la función de las DCs obtenidas de un grupo de 9 pacientes con RRTIs reclutados por la Dra. Silvia Sánchez-Ramón en la Unidad de Inmunología Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, en comparación con un grupo de 9 individuos sanos. Todos los pacientes incluidos en el estudio han sufrido RRTIs definidas como 3 o más episodios de infecciones respiratorias de las vías bajas o altas, o un brote de neumonía al año durante más de un año de forma consecutiva. Ninguno de los pacientes incluidos recibió tratamiento con MV130. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España (C.P.-C.I. 16/191-E_TFG). El consentimiento informado se obtuvo de todos los sujetos incluidos en el estudio. Las características clínicas detalladas de los pacientes, incluyendo el diagnóstico principal y la terapia de rutina, se recogen en la **tabla M.4**.

2.1. Análisis de la frecuencia de monocitos, mDCs y pDCs en PBMC aislado a partir de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con RRTIs

Los monocitos, las DCs convencionales o mieloides (mDCs) y la DCs plasmacitoides (pDCs) son poblaciones celulares presentes en sangre periférica que ejercen funciones inmunes distintas relacionadas pero complementarias (207). Los modelos actuales proponen que los monocitos y las DCs se originan a partir de células madre hematopoyéticas ubicadas en la médula ósea, que dan lugar a MDPs (progenitores de macrófagos y DCs). Dentro de la médula ósea, los MDP se diferencian en monocitos, y en precursores de DCs comunes (CDPs) que posteriormente

se diferencian a mDCs y pDCs (208).

En primer lugar, se analizó y cuantificó la frecuencia de mDCs y pDCs en PBMCs de individuos sanos y pacientes con RRTIs. Además, se analizó el porcentaje de monocitos de ambos grupos ya que son las células que se van a emplear para la diferenciación a DCs; nuestro modelo *in vitro* de trabajo.

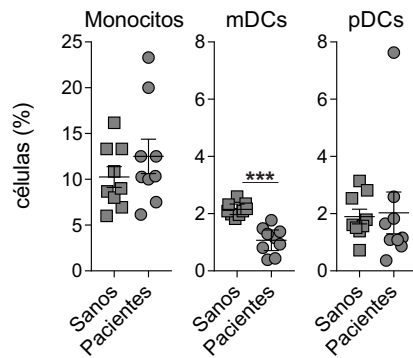


Figura R.20 Cuantificación de la frecuencia de monocitos, mDCs y pDCs en PBMCs de individuos sanos y de pacientes con RRTIs. El gráfico representa el porcentaje de monocitos (HLA-DR/CD14)⁺ y de los dos grupos de DCs presentes en sangre periférica: mDCs (CD1c/CD11c)⁺ y pDCs (CD123/CD303)⁺ en 9 individuos sanos y 9 pacientes con RRTIs determinado por citometría de flujo. Test de *t* Student no pareada, **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001.

Como se puede observar en la **figura R.20**, el porcentaje de mDCs en pacientes con RRTIs (1,07% ± 0,16) es significativamente menor que en individuos sanos (2,15% ± 0,08). En cambio, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de monocitos y pDCs entre ambos grupos. En la **figura R.21** se muestran citogramas representativos correspondientes a cada una de las poblaciones celulares definidas como: monocitos (HLA-DR/CD14)⁺, mDCs (HLA-DR⁺/CD19⁻/CD1c⁺/CD11c⁺), y pDCs (HLA-DR⁺/CD123⁺/CD303⁺).

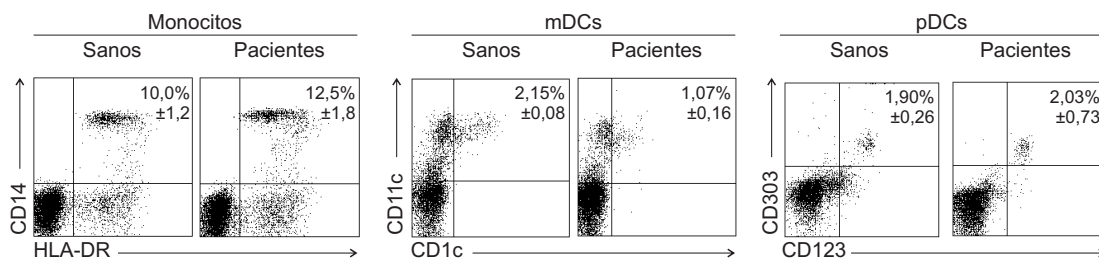


Figura R.21 Citogramas representativos determinados por citometría de flujo usando los marcadores indicados para: monocitos, mDCs y pDCs. Los resultados muestran la media ± SEM de 9 donantes sanos y 9 pacientes.

Las DCs juegan un papel esencial porque participan directamente en la iniciación y mantenimiento de respuestas inmunes. Las DCs presentan la capacidad dual de inducir respuestas adaptativas frente a patógenos o estados de tolerancia frente a antígenos inocuos (209). La deficiencia en número de mDCs observado en los pacientes podría explicar, junto con las distintas patologías que cada paciente presenta (**Tabla M.4**), la susceptibilidad a sufrir infecciones de repetición observada en estos pacientes. Hasta el momento, no existen estudios comparativos que relacionen una disminución del porcentaje de mDCs o alteraciones funcionales en dichas células con una mayor probabilidad de sufrir infecciones respiratorias recurrentes.

2.2. Estudio de la capacidad de MV130 para inducir maduración y producción de citoquinas en hmoDCs

Para estudiar el mecanismo por el cual MV130 condiciona el fenotipo de las DCs obtenidos de pacientes respecto al grupo de individuos sanos, se escogió como modelo *in vitro* de trabajo las humanas derivadas de monocitos (hmoDCs) (105), que es un modelo ampliamente utilizado para estudiar el fenotipo y función de las DCs (75, 181, 210). Para ello, se generaron hmoDCs de donantes sanos y pacientes con RRTIs, como se describe en la sección de materiales y métodos, y se estimularon con MV130 o control durante 24 h.

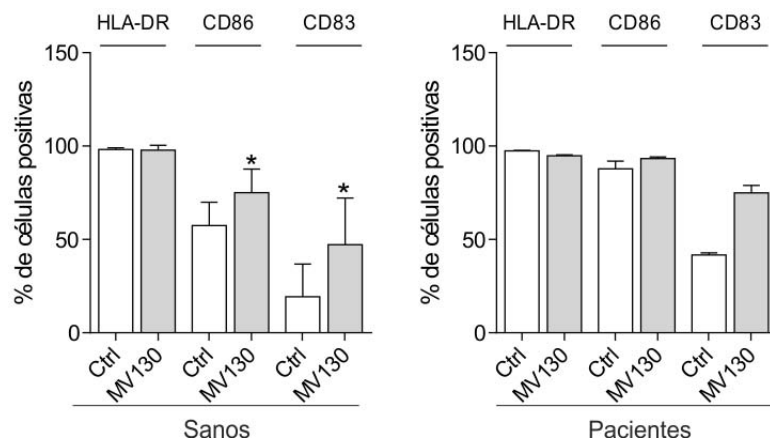


Figura R.22 Porcentaje de hmoDCs positivas para los marcadores de superficie HLA-DR, CD86 y CD83 tras 24 h de estimulación con MV130 o control (excipientes sin bacterias) en donantes sanos (n=6) o pacientes (n=2). Los resultados son la media \pm SEM. Test del signo de rangos de Wilcoxon para el caso de los donantes sanos, * $P < 0,05$.

En primer lugar, mediante citometría de flujo se estudió la maduración y activación de hmoDCs, inducida por MV130 con respecto al control. Para ello, se estudió la expresión de los siguientes marcadores de superficie: HLA-DR, CD86 y CD83. Las proteínas CD86 y CD83 son marcadores de superficie expresadas en DCs y otras APC que proporcionan señales necesarias para la co-estimulación y supervivencia de las células T. HLA-DR es un receptor de superficie presente en todas las DCs y necesario para presentar el material antigénico a los linfocitos T (108).

Como se observa en la **figura R.22**, MV130 incrementa significativamente la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD83 y CD86 en hmoDCs de donantes sanos respecto al control. En el grupo de pacientes con RRTIs, MV130 induce niveles ligeramente más elevados de CD86 y más acusados de CD83 en hmoDCs que los inducidos por el control (**Figura R.22**). Sin embargo, en ninguno de los casos, los niveles de expresión de HLA-DR se alteraron, siendo del 100% (**Figura R.22**). Así, nuestros resultados demuestran que MV130 induce la maduración de hmoDCs obtenidas a partir de individuos sanos y pacientes con RRTIs, aumentando la expresión de marcadores de maduración CD86 y CD83. Estos datos demuestran que tras la estimulación con MV130, las DCs adquieren la capacidad de presentar antígenos y estimular a los linfocitos T.

A continuación, se analizó el perfil de citoquinas producido por hmoDCs derivadas de donantes sanos y pacientes con RRTIs tras ser estimuladas con MV130. Las hmoDCs obtenidas a partir de donantes sanos y pacientes estimuladas con MV130 durante 24 h producen un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL- β e IL-23, así como de la citoquina antiinflamatoria IL-10, con respecto a las tratadas con control (**Figura R.23**). En cambio, los niveles de IL-4 fueron significativamente más bajos en las hmoDCs activadas con MV130 respecto al control. Cabe destacar que en ningún caso se detectaron diferencias significativas entre controles sanos y los pacientes con RRTIs (**Figura R.23**).

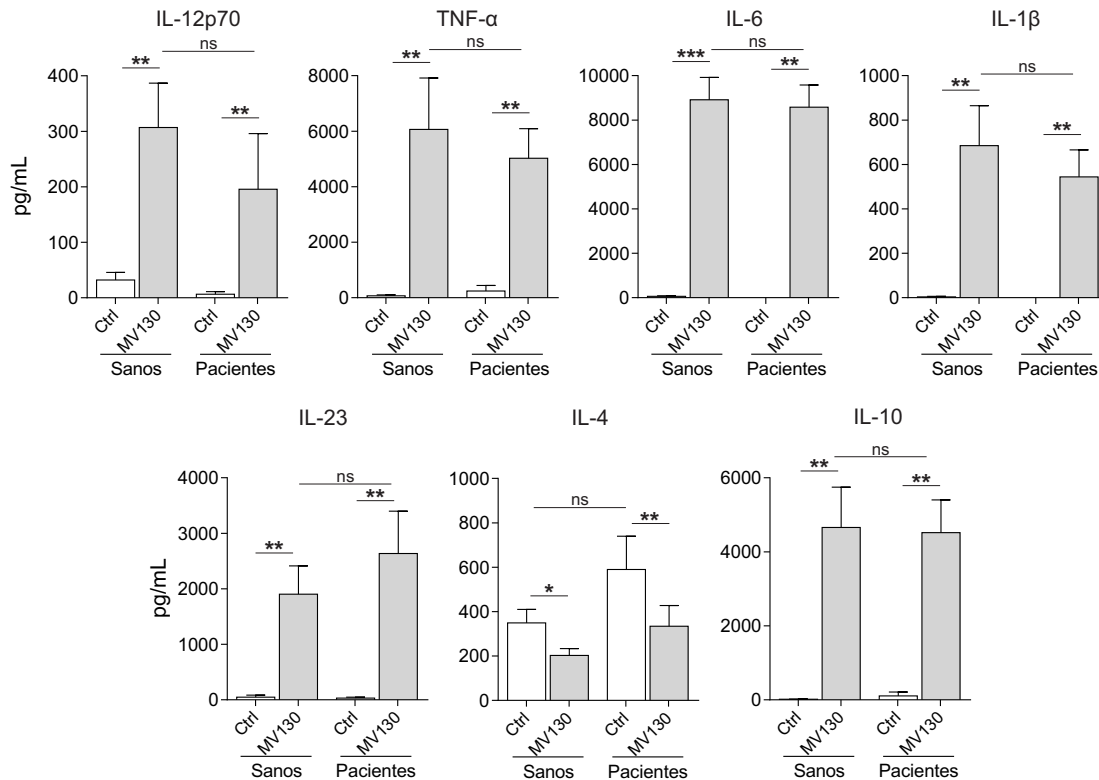


Figura R.23 Niveles de citoquinas en el sobrenadante libre de células (IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23, IL-4 e IL-10) cuantificados por ELISA tras la estimulación de las hmoDCs de donantes sanos (n=9) y pacientes con RRTIs (n=9) con control o MV130 durante 24 h. Los resultados muestran la media \pm SEM. Test del signo de rangos de Wilcoxon, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; ns (no significativo).

Además, se llevaron a cabo experimentos de estimulación a distintos tiempos con MV130 con el objetivo de analizar las cinéticas de expresión de dichas citoquinas a nivel de ARNm (**Figura R.24**). HmoDCs obtenidas a partir de 4 donantes sanos se estimularon con MV130 a distintos tiempos: 1, 3, 6 y 24 h. El tiempo 0 representa la condición basal, es decir, las hmoDCs sin estimular. Los niveles de expresión a nivel de ARNm mensajero de IL-12p35, IL-12p40, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23, IL-4 e IL-10 se cuantificaron mediante PCR cuantitativa como se detalla en materiales y métodos. MV130 induce un incremento en la expresión de los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias IL-12p35, IL-12p40, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-23 dependiente del tiempo hasta las 6 h observándose una disminución en los niveles de expresión a partir de ese momento, excepto para IL-1 β e IL-23 que permanecen elevados tras 24 h de

estimulación con MV130. En cambio, el nivel de expresión de ARNm de IL-10 aumenta a partir de las 3 h de estimulación con MV130, que se mantiene hasta 24 h. Estos datos sugieren que la disminución de los niveles de expresión de ARNm de IL-12p35, IL-12p40, TNF- α e IL-6 tras 24 h de estimulación podría estar regulado por IL-10 para evitar una posible respuesta inmune excesiva que pueda ser perjudicial para el organismo.

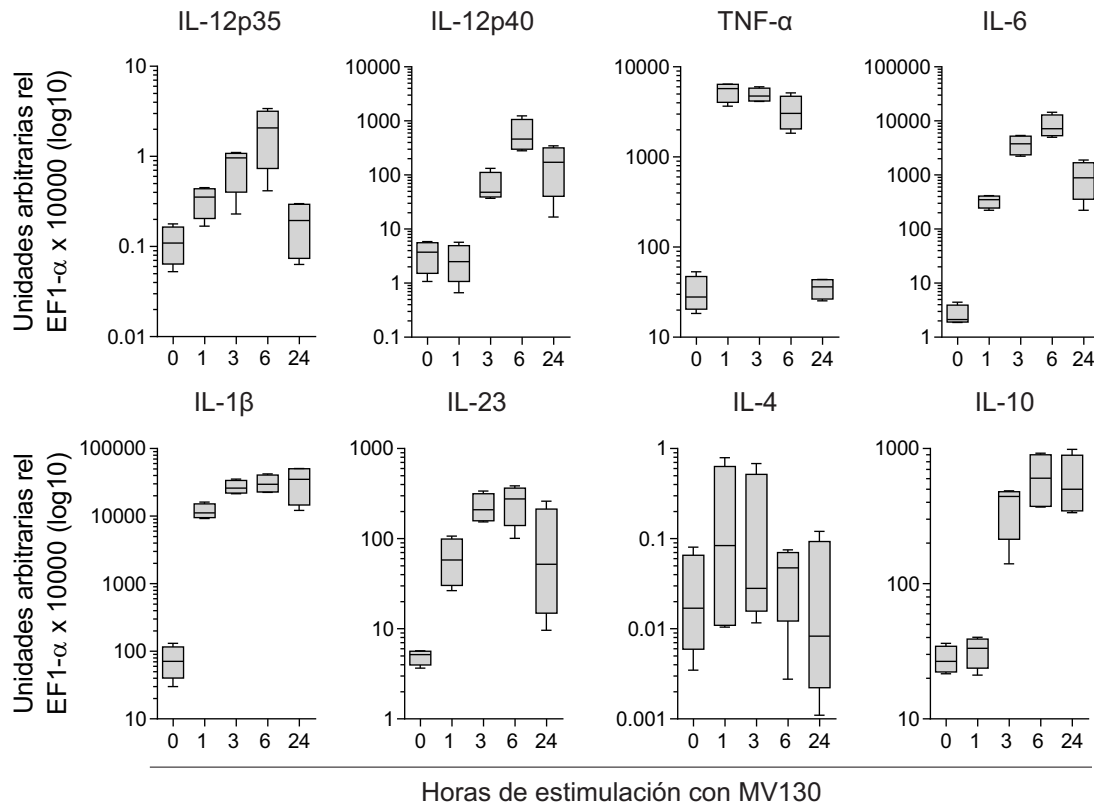


Figura R.24 Niveles de expresión de ARNm de los siguientes genes: IL-12p35, IL-12p40, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23, IL-4 e IL-10 en hmoDCs tratadas con MV130 durante 1, 3, 6 y 24 h. Se representan unidades arbitrarias respecto a Elongation Factor (EF1- α) calculado como valores de $2^{-\Delta CT}$ multiplicados por 10^4 . El tiempo 0 representa la condición basal. Los resultados muestran la media \pm SEM de 4 experimentos independientes.

Las citoquinas secretadas por células del sistema innato están involucradas en la regulación de las fases de la respuesta inmune, tanto en la activación como en la inhibición de funciones celulares (211). Nuestros resultados muestran que las hmoDCs activadas con MV130 son capaces de producir un amplio espectro de citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias que están implicadas en diversas funciones. Numerosos estudios han demostrado que IL12p70 y TNF- α son necesarias para inducir la polarización hacia Th1 (156, 163, 212) e IL-4 para la generación de Th2 (213). Las citoquinas IL-1 β e IL-6 son necesarias para generar respuestas de tipo Th17, mientras que IL-23 es necesaria para su mantenimiento (163, 178, 214, 215). Esta citoquina está formada por dos subunidades: IL-23p19 e IL-12p40. Esta última subunidad, junto con la subunidad IL12-p35 forman la citoquina IL-12p70 (163). Como se observa en la **figura R.24**, la expresión a nivel de ARNm de la subunidad IL-12-p40 es aproximadamente 100 veces mayor que los de IL-12p35. Distintos estudios han indicado que las subunidades individuales

de IL-12 no se producen de una manera sincronizada en el organismo. El ARNm de p35 se encuentra constitutivamente expresado en muchos tipos celulares, aunque a niveles muy bajos. Por el contrario, la expresión de la subunidad p40 es altamente regulada y no es detectable hasta que su expresión se induce en respuesta a distintos componentes microbianos (216). Los niveles de expresión de ARNm de las dos subunidades que forman IL-12p70 tras la estimulación con MV130 muestran un comportamiento muy similar al que se describe en estos estudios.

Es interesante destacar que los niveles de ARNm de la citoquina antiinflamatoria IL-10 se inducen a partir de 3 h de estimulación con MV130 y se mantienen hasta las 24 h. Por contra, la expresión a nivel de ARNm del resto de citoquinas proinflamatorias, a excepción de IL-1 β e IL-23, decae a partir de las 6 h. MV130 es capaz de promover niveles altos y mantenidos a lo largo del tiempo de IL-10, sugiriendo su papel regulador que evitaría una respuesta inmune excesiva. Sin embargo, se conoce muy poco sobre el mecanismo implicado en la modulación de la expresión de IL-10 a nivel de ARNm. En un estudio reciente, Audrey Demont y col. (217) han demostrado que los probióticos, dependiendo de su naturaleza (bacterias vivas o muertas) modulan la estabilización del ARNm de IL-10 de forma distinta. El PBMC estimulado con *Lactobacillus paracasei* inactivado por choque térmico es capaz de producir y mantener niveles elevados de expresión de IL-10 a nivel de ARNm hasta las 15 h, comparado con el probiótico *Lactobacillus paracasei* atenuado, que sólo mantiene estos niveles elevados hasta las 5 h. Considerando que MV130 es una vacuna compuesta por bacterias enteras inactivadas por calor, este hecho podría explicar la capacidad de MV130 para mantener altos niveles de expresión de IL-10 tanto a nivel de ARNm como de proteína en el tiempo (24 h). Existen evidencias experimentales que demuestran que las formulaciones basadas en combinaciones de bacterias enteras inactivadas aumentan la respuesta inmunitaria del organismo con mayor eficacia limitando la expresión de factores de virulencia en comparación con los lisados bacterianos (4, 63, 218). Por ejemplo, OM-85, un inmunoestimulante bacteriano obtenido por la lisis química de ocho bacterias Gram positivas y Gram negativas frecuentemente asociadas con infecciones respiratorias, ha demostrado inducir niveles altos IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ y bajos niveles de IL-4 (58, 219). Sin embargo, a diferencia de MV130, OM-85 no induce en DCs humanas la producción de IL-23, necesaria para generar y mantener respuestas de tipo Th17 (58). Probablemente esta diferencia se debe a la naturaleza de los componentes de MV130, ya que al estar formada por bacterias enteras, se presenta al sistema inmune en una forma más natural, logrando maximizar su potencial como inmunógeno.

En conjunto, estos datos revelan que MV130 inmunomodula las DCs humanas de una manera dual. Las hmoDCs activadas con MV130 promueven respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Las hmoDCs activadas con MV130 secretan altos niveles de IL-12p70 y TNF- α , citoquinas implicadas en la polarización de células de tipo Th1 productoras de IFN- γ , que

a su vez activa linfocitos T citotóxicos, células NK y macrófagos para desarrollar una respuesta inmune adecuada contra patógenos intracelulares (163). MV130 también estimula la producción de IL-6, IL-1 β e IL-23, citoquinas implicadas en la generación de células Th17, células implicadas en respuestas contra patógenos extracelulares (180). Además de estas respuestas inflamatorias, las DCs estimuladas con MV130 producen elevados niveles de IL-10, una citoquina con propiedades antiinflamatorias que controla la respuesta inmune excesiva y favorece la generación de células T reguladoras (Treg) (92). Por otro lado, las hmoDCs tratadas con MV130 producen niveles de IL-4 significativamente más bajos que aquellos tratados con control. IL-4, es una citoquina involucrada en la diferenciación de linfocitos Th2 implicados en procesos alérgicos (156).

2.3. Estudios de la capacidad de hmoDCs activadas con MV130 para polarizar respuestas T

Una de las funciones principales de las DCs es transportar los antígenos presentes en la periferia hasta los ganglios linfáticos para presentárselos procesados a las células T de forma que estas se activen y promuevan una respuesta de tipo proinflamatorio o tolerogénico (78, 88, 96). La capacidad de las DCs activadas con MV130 para polarizar respuestas T, se estudió mediante experimentos en co-cultivo. En primer lugar, se realizaron experimentos de dilución de CFSE mediante citometría de flujo. Estos experimentos demostraron que las hmoDCs tratadas con MV130 producen un aumento significativo en la proliferación de células T CD4⁺ vírgenes alogénicas, tanto en donantes sanos como pacientes con RRTIs comparados con el control (**Figura R.25**). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

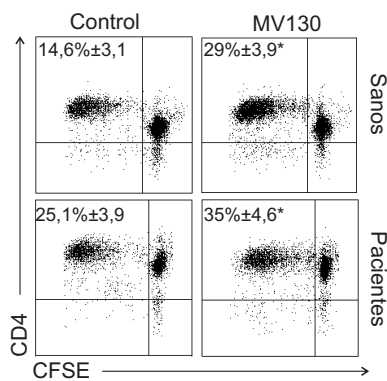


Figura R.25 Citogramas representativos de la proliferación de células T CD4⁺ vírgenes alogénicas marcadas con CFSE tras 3 días de co-cultivo con hmoDCs de individuos sanos (n=5) y pacientes (n=5). La media de la proliferación y el SEM está representada dentro del citograma. Test del signo de rangos de Wilcoxon, *P<0,05.

Tras tres días de co-cultivo se cuantificaron las citoquinas IFN- γ (Th1), IL-17A (Th17), IL-5 (Th2), e IL-10 (Treg) en los sobrenadantes libres de células. Como se observa en la **figura R.26**, las células T CD4⁺ vírgenes alogénicas co-cultivadas con hmoDCs obtenidas a partir de donantes sanos o pacientes con RRTIs en presencia de MV130 producen niveles significativamente más elevados de IFN- γ , IL-17A e IL-10 que en presencia del control. Es importante recalcar que no se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-5, ni al comparar pacientes con RRTIs con donantes sanos.

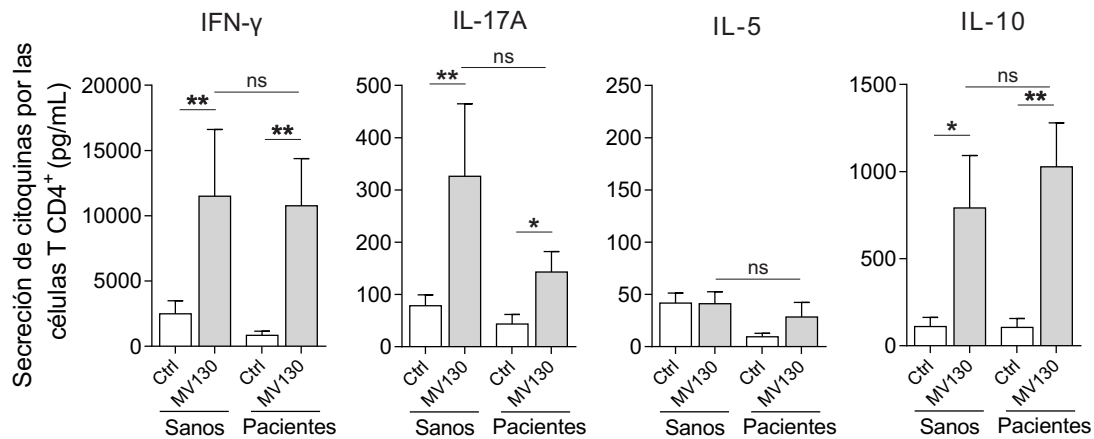


Figura R.26 Cuantificación por ELISA de IFN- γ , IL-17A, IL-5 e IL-10 en los sobrenadantes libres de células tras 3 días de co-cultivo. Los resultados muestran la media \pm SEM (n=9). Test del signo de rangos de Wilcoxon, * P <0,05, ** P <0,01; ns (no significativo).

Estos datos se confirmaron en donantes sanos mediante experimentos de re-expansión policlonal tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h. Tras la re-expansión, las células T CD4⁺ generadas por las hmoDCs activadas con MV130 produjeron niveles significativamente más elevados de IFN- γ , IL-17A e IL-10 que los producidos por las células T en presencia de hmoDCs estimuladas con el control (**Figura R.27**).

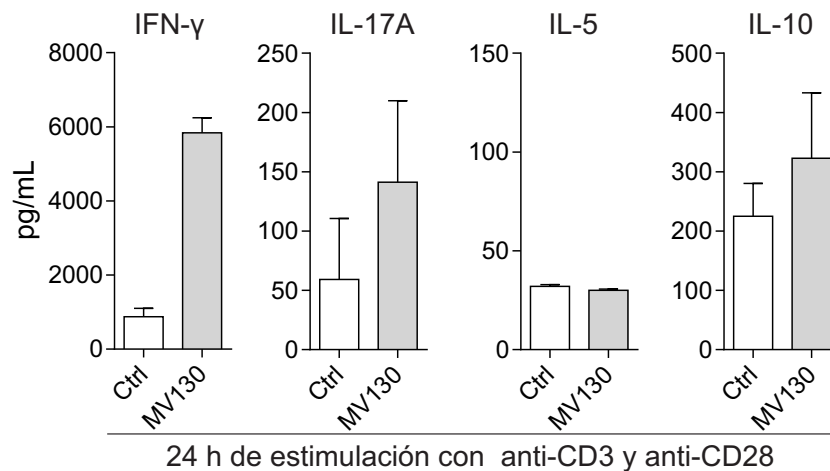


Figura R.27 Citoquinas producidas por las células T después de 3 días de co-cultivo con hmoDCs y posterior estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h. Las citoquinas se cuantificaron por ELISA en los sobrenadantes libres de células. Los resultados son la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

Además, los experimentos de re-activación y tinción intracelular (**Figura R.28**) demostraron a nivel de células únicas que hmoDCs tratadas con MV130 promueven la generación de células T CD4⁺ que producen niveles significativamente más altos de IFN- γ (7,3% \pm 1,4), IL-17A (7,3% \pm 1,5) e IL-10 (5,4% \pm 2,3) que hmoDCs en presencia del control (4,1% \pm 0,81, 3,5% \pm 1,04 y 2,9% \pm 1,1, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de IL-4.

La polarización de las células T depende de diferentes señales proporcionadas por DCs, incluido el perfil de citoquinas. Sin embargo, el estudio de las citoquinas generadas por las células T en experimentos de co-cultivo, ha confirmado definitivamente que hmoDCs, tanto de los pacientes con RRTIs como del grupo control, estimuladas con MV130 inducen una polarización de células T de tipo Th1, Th17 y células Treg productoras de IL-10 (**Figuras R.26, R.27 y R.28**).

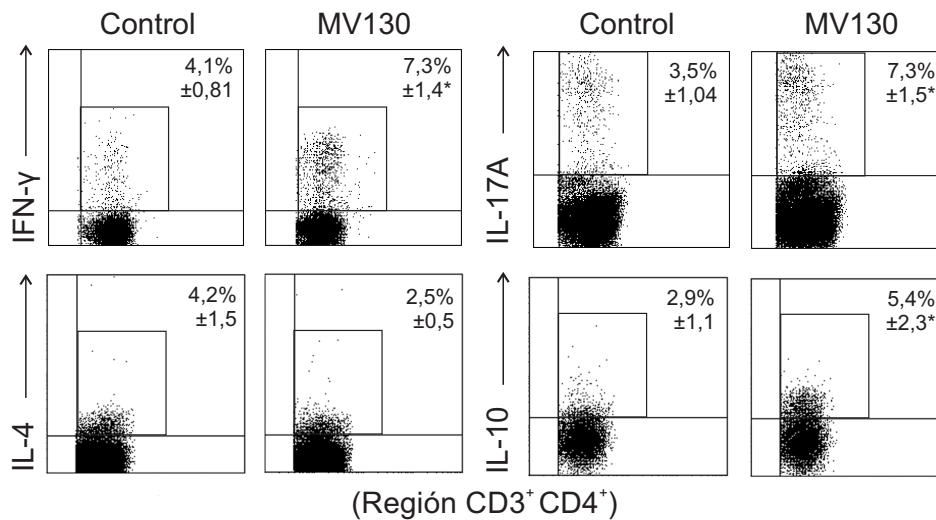


Figura R.28 Porcentaje de células T CD3⁺CD4⁺ productoras de IFN-γ, IL-17A, IL-4 e IL-10 generadas después de 3 días de co-cultivo de hmoDCs de donante sanos en presencia de MV130 o control y células T CD4⁺ vírgenes alogénicas (n=4-7 experimentos independientes). Se muestra un citograma representativo de cada citoquina. Los resultados muestran la media ± SEM. Test del signo de rangos de Wilcoxon, *P < 0,05.

Nuestros datos demuestran que MV130 es capaz de inducir en hmoDCs derivadas de individuos sanos y pacientes respuestas inmunes implicadas en la eliminación de patógenos intracelulares como extracelulares, con la generación de células Th1 y Th17, respectivamente. Por otro lado, MV130 tiene la capacidad de generar células T productoras de IL-10 que son esenciales en el control de respuestas inmunes excesivas, contribuyendo así a mantener la homeostasis y jugando, además, un papel decisivo en la eliminación de patógenos (92, 220, 221). Como se ha descrito previamente, MV130 reduce la tasa de infecciones respiratorias, por lo tanto, que *in vitro* sea capaz de inducir estas respuestas inmunes, podría explicar en parte los mecanismos inmunológicos asociados a dicho beneficio clínico. El papel de Th17 e IL-17 durante la inmunidad inducida por vacunas ha sido dilucidado recientemente. Diversos estudios han demostrado que la secreción de IL-17 inducida por distintos tipos de vacunas confiere un efecto protector contra patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Klebsiella pneumoniae* (169, 222, 223). Así, por ejemplo, un estudio en el que se analiza la respuesta de una vacuna formada por neumococos contra *Streptococcus pneumoniae*, demuestra que esta vacuna activa y promueve respuestas Th1/Th17 (223).

El papel dual de MV130 podría explicarse, en parte, por la composición heterogénea de bacterias en este preparado, lo que permitiría generar respuestas inmunes más amplias y variadas

(62, 218). Cabe destacar que diversos estudios han reportado que *Staphylococcus aureus*, además de producir citoquinas que promueven la generación de células Th17, puede tener la capacidad de modular el sistema inmune induciendo altos niveles de IL-10 (167, 224, 225).

3. Estudio de la capacidad de MV130 para activar células dendríticas totales sanguíneas

Una vez se dilucidó la respuesta que MV130 promueve en hmoDCs, el objetivo fue conocer su papel sobre DCs totales sanguíneas (tDCs). Para ello, se llevaron a cabo el mismo tipo de experimentos y se examinó si MV130 produce el mismo tipo de respuesta en las tDCs extraídas directamente de los pacientes respecto al grupo control (individuos sanos). Se aislaron las tDCs de sangre que contienen tanto mDCs como pDCs obtenidas a partir de PBMC de los donantes sanos y pacientes (**Figura R.29**). Las células purificadas se cultivaron con MV130 o control durante 24 h y se analizó el perfil de citoquinas tanto a nivel de proteína como a nivel de ARNm. Además, se realizaron experimentos de co-cultivo de la misma forma que los realizados anteriormente y se cuantificaron las citoquinas producidas por las células T generadas en los sobrenadantes del co-cultivo.

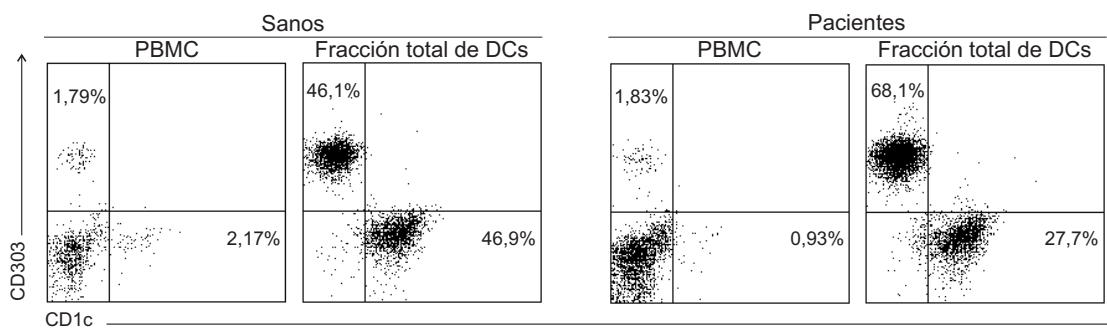


Figura R.29 Citogramas representativos de los diferentes subtipos de DCs presentes en PBMC de donantes sanos y pacientes, y la fracción de tDCs obtenidas para cada caso; pDCs: HLA-DR⁺ CD19⁻, CD303⁺; mDCs: HLA-DR⁺ CD19⁺ CD1c⁺ El porcentaje en cada tipo de DC se indica dentro del cuadrante.

3.1. Producción de citoquinas por tDCs activadas con MV130

En la **figura R.29** se muestran citogramas representativos tanto de la frecuencia de tDCs en el PBMC de individuos sanos y pacientes con RRTIs y la frecuencia de la fracción de tDCs de ambos grupos tras el aislamiento. Las tDCs se caracterizan por ser todas HLA-DR⁺, y se dividen en mDCs que expresan CD1c y pDCs que se identifican porque expresan CD303.

La **figura R.30** muestra el perfil de citoquinas que MV130 es capaz de inducir en las tDCs de sangre periférica aislada a partir de individuos sanos y pacientes. Como se observa en esta figura, la fracción de tDCs activadas con MV130 produce niveles más elevados de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 que las estimuladas con el control. Respuestas similares se observaron en el perfil de citoquinas tanto para los donantes sanos como los pacientes. Además, se observa que sigue una tendencia similar al perfil de citoquinas inducido por hmoDCs estimuladas con MV130

(Figura R.23).

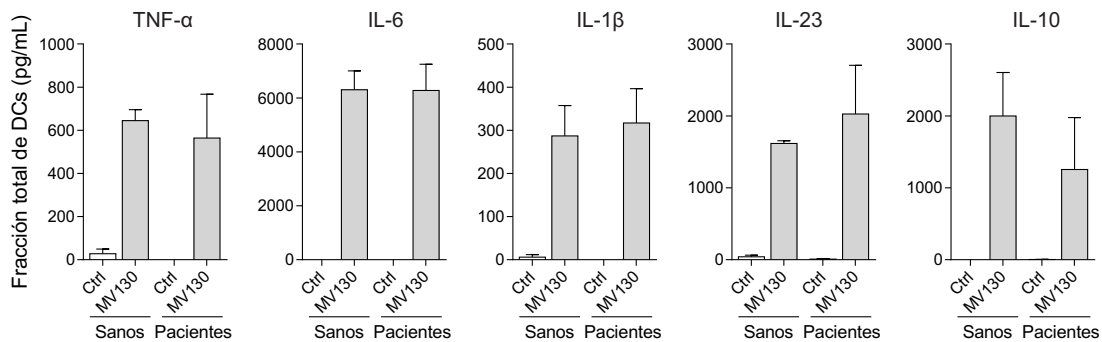


Figura R.30 Producción de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 por la fracción de tDCs sanguíneas tras 24 h de estimulación con el control o MV130 cuantificadas por ELISA. Los resultados son la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

En tDCs de donantes sanos se cuantificó el perfil de citoquinas a nivel de ARNm (**Figura R.31**). Como se puede observar en esta figura, MV130 induce un aumento de los niveles de ARN para IL-12p35, IL-12p40, IL-6, IL-1 β e IL-10 en las tDCs con respecto al control. Sin embargo, en los niveles de TNF- α no se observaron cambios. El nivel de ARNm de IL-12p35 disminuyó con el tratamiento de MV130 respecto al control. Estos datos van en concordancia con los resultados obtenidos en hmoDCs (**Figura R.24**), donde también se observa que los niveles de TNF- α a las 24 h de estimulación son similares a los detectables a nivel basal, y los valores de IL-12p35 son muy bajos.

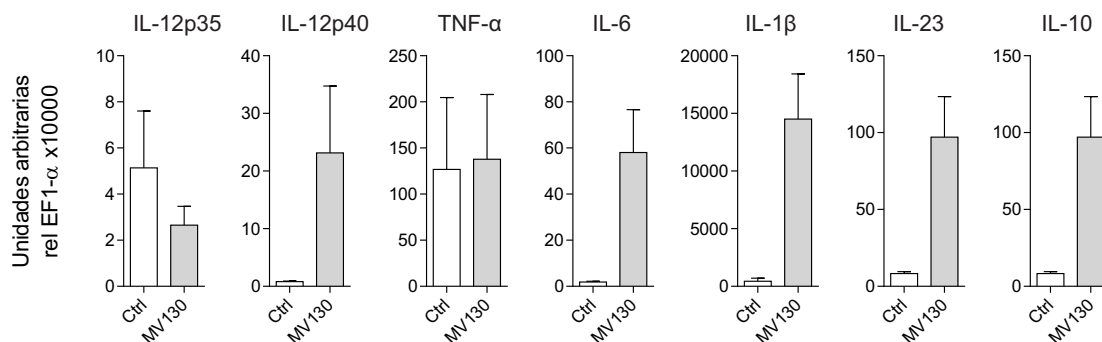


Figura R.31 Perfil de expresión de ARNm tras 24 h de tratamiento de las tDCs provenientes de individuos sanos con MV130 o control. Los niveles de ARNm están expresados en unidades arbitrarias relativas al EF1- α x 10⁴.

3.2. Estudios de la capacidad de tDCs activadas con MV130 para polarizar respuestas T

A continuación, se realizaron experimentos de co-cultivo para determinar la polarización de células T inducida por tDCs sanguíneas en presencia de MV130. Como se observa en la **figura R.32**, las tDCs sanguíneas derivadas de donantes sanos y pacientes con RRTIs generan células T productoras de IFN- γ , IL-17A e IL-10 pero no IL-5, de forma similar en ambos casos.

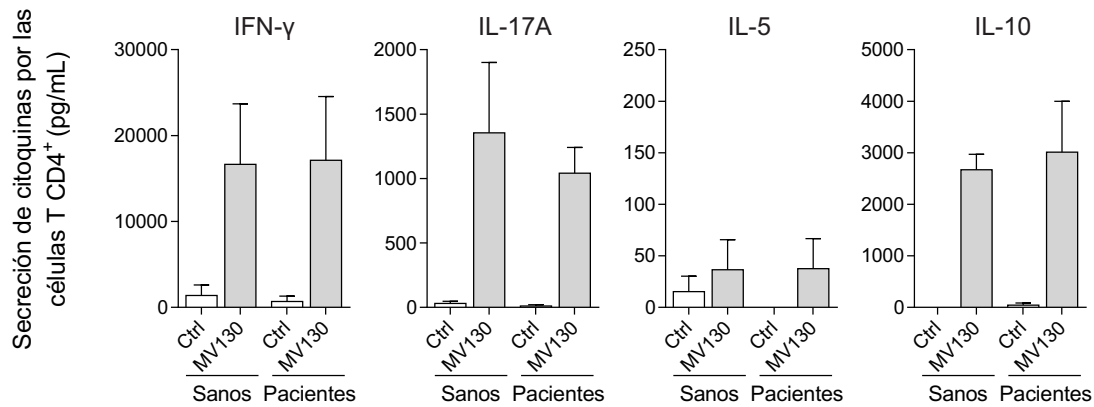


Figura R.32 Citoquinas producidas por células T CD4⁺ alogénicas en presencia de tDCs sanguíneas de donantes sanos y pacientes tras 3 días de estimulación con MV130 o control y cuantificadas por ELISA. Los resultados son la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

En humanos, las mDCs y pDCs sanguíneas representan distintos tipos especializados de DCs que poseen diferentes repertorios de receptores y perfil de citoquinas tras la estimulación antigénica (84, 226). mDCs y pDCs juegan un papel diferente pero complementario en la iniciación y mantenimiento de las respuestas inmunes (99). Nuestros resultados revelan que la fracción enriquecida de tDCs sanguíneas (mDCs y pDCs) obtenidas de los individuos sanos y pacientes tras la activación con MV130, es capaz de generar también respuestas de tipo Th1, Th17 y células T productoras de IL-10, similares a los producidos por hmoDCs. MV130 se prescribe en pacientes que sufren RRTIs para reducir las tasas de infecciones. Estos pacientes probablemente tengan un sistema inmune más debilitado respecto al grupo de controles sanos. A pesar de ello, y de tener un menor porcentaje de mDCs en sangre, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos en la producción de citoquinas por parte de las tDCs activadas con MV130 (**Figura R.20**). MV130 es capaz de activar e inducir respuestas muy similares en tDCs provenientes de ambos grupos. Nuestros resultados indican que MV130 actúa directamente sobre las DCs humanas lo que refuerza la relevancia del papel de MV130 en DCs humanas *in vivo*.

4. Estudio de la capacidad de MV130 para activar mDCs y pDCs

Para estudiar la contribución específica de mDCs y pDCs en los efectos de MV130 sobre las DCs humanas se aislaron mDCs y pDCs derivadas de individuos sanos. La **figura R.33** muestra un citograma representativo del porcentaje de mDCs y pDCs en PBMC de donantes sanos y de la fracción enriquecida de ambas poblaciones tras el aislamiento. Ambas poblaciones se caracterizan por la expresión de los siguientes marcadores de superficie: HLA-DR⁺CD19⁻CD11c⁺ para mDCs, y HLA-DR⁺CD123⁺CD303⁺ para pDCs.

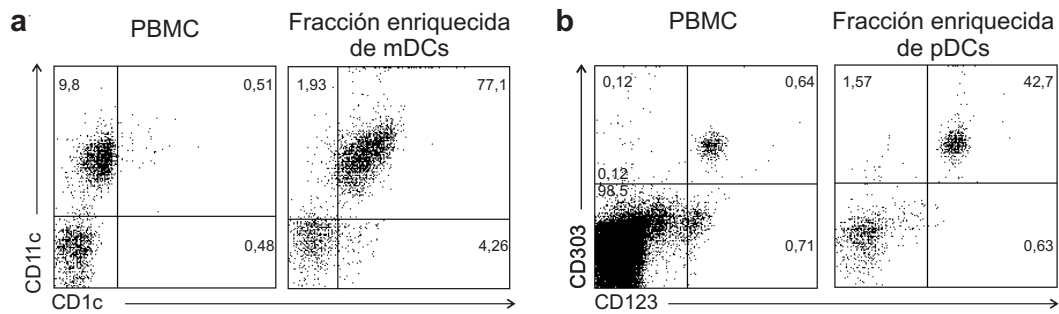


Figura R.34 Caracterización fenotípica de mDCs y pDCs. Citogramas representativos del porcentaje de mDCs (a) y pDCs (b) en PBMCs y tras el aislamiento de cada población. Se muestra la expresión de CD1c y CD11c (mDCs), y CD123 y CD303 (pDCs). Los porcentajes están indicados dentro del cuadrante.

Tras obtener las fracciones enriquecidas de mDCs y pDCs (**Figura R.33**), se cultivaron con MV130 o control durante 24 h para cuantificar el perfil de citoquinas por ELISA. La **figura R.34a** muestra que mDCs activadas con MV130 tras 24 h de estimulación producen un incremento de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 respecto al control. Sin embargo, en pDCs sólo se detectaron niveles elevados de IL-6 tras la estimulación MV130 respecto al control (**Figura R.34b**). En el resto de las citoquinas los valores fueron indetectables. Estos resultados pueden sugerir que las citoquinas producidas por la acción de MV130 en tDCs, se deberían, fundamentalmente, a la contribución de mDCs.

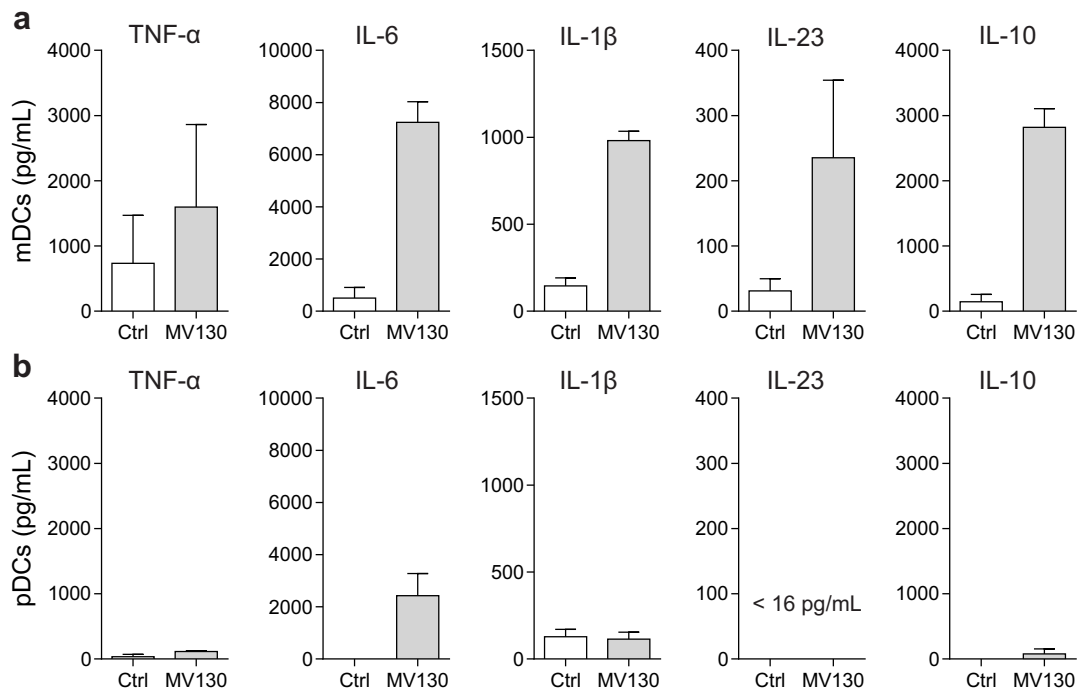


Figura R.33 Producción de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 and IL-10 por la fracción de mDCs (a) y pDCs (b) tras 24 h de estimulación con el control o MV130. Los datos son la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Las pDCs son las principales productoras de interferones (IFN) de tipo I y juegan un papel esencial en las respuestas antivirales (84, 90, 227-229). Según los resultados obtenidos en el estudio piloto con MV130, esta PBP podría ser capaz de reducir infecciones virales en pacientes

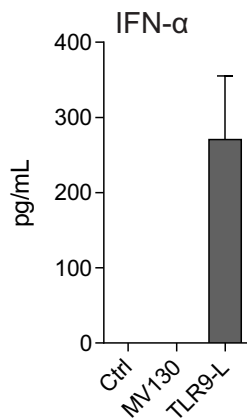


Figura R.35 Producción de IFN- α en pDCs estimuladas 24 h con control, MV130 y el ligando de TLR9 (oligonucleótidos sintéticos que contienen dinucleótidos CpG no metilados). El resultado representa la media \pm SEM de un n=3.

con RRTIs y EPOC (14). Por ello, se estudió la capacidad de MV130 para inducir la producción de IFN- α en pDCs. Como muestra la **figura R.35**, MV130 no induce la producción de IFN- α en pDCs. Como control positivo se empleó un ligando de TLR9 capaz de inducir producción de IFN- α en pDCs (**Figura R.35**).

Nuestros datos indican que pDCs estimuladas con MV130 no producen la citoquina antiviral IFN- α . Resultados similares se obtuvieron en un estudio en el que reportaron que pDCs obtenidas de donantes sanos estimuladas con OM-85 producían muy bajas concentraciones de IFN- α (58). Nuestros resultados, apoyados con el estudio de Parola y col., indican que probablemente existan otros mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV130 para combatir las infecciones virales. No obstante, distintas investigaciones ponen de manifiesto otros mecanismos para inducir respuestas antivirales que no se centran en la producción de interferones de tipo I por las pDCs. Cabe destacar un trabajo de Zhang y col., en el que reportaron que el tratamiento con flagelina de bacterias previene y revierte la infección crónica por rotavirus en ratón. Los mecanismos implicados fueron dependientes del receptor de la flagelina (TLR5) y NLRC4 (230). Este hallazgo pone de manifiesto nuevos mecanismos anti-virales independientes de IFN de tipo I y II, que podrían ayudar a dilucidar el papel de MV130 en las respuestas anti-virales.

5. Estudio de la capacidad de MV130 para modular respuestas en PBMC de individuos sanos y pacientes con RRTIs.

Una vez estudiado el efecto de MV130 sobre las hmoDCs, tDCs, mDCs y pDCs, se investigó el efecto de MV130 a nivel global en PBMC obtenido a partir de individuos sanos y pacientes con RRTIs.

PBMCs obtenido a partir de donantes sanos y pacientes con RRTIs estimulado con MV130 durante tres y cinco días, produce niveles significativamente más elevados de IFN- γ , IL-17A e IL-10, comparados con PBMCs estimulados con control (**Figura R.36**). Además, los niveles de IL-17A e IL-10 son muy similares entre el PBMC de individuos sanos y pacientes. En este contexto, el aumento de IL-10 en pacientes con RRTIs es muy importante en el control de la producción excesiva de mediadores proinflamatorios y daño tisular. En pacientes, los niveles de IFN- γ inducidos tras la estimulación con MV130 fueron significativamente menores que en donantes sanos tanto a tres días como a cinco días de estimulación (**Figura R.36**). Estas diferencias significativas podrían deberse a un déficit de otras poblaciones celulares en PBMC

de los pacientes incluidos en este estudio. IFN- γ es producida por una variedad de células tanto del sistema inmune innato (células NK y NKT, macrófagos y células mielomonocíticas) como del sistema inmune adaptativo (células Th1, células citotóxicas y células B) (215). En cambio, los niveles de IL-5 fueron casi indetectables, sin observarse diferencias significativas entre los dos tratamientos y los dos grupos de población. IL-5 es producida por diferentes poblaciones celulares como células Th2, eosinófilos activados, mastocitos y células NK. Su función principal es promover la proliferación, activación, diferenciación, supervivencia y adhesión de eosinófilos (163). El hecho de que no se observen niveles de IL-5 concuerda con nuestros resultados de polarización de células T, donde se demostró que hmoDCs y tDCs obtenidas de ambos grupos activadas con MV130 no generan células Th2. Además, hmoDCs activadas con MV130 no son capaces de producir IL-4, citoquina necesaria para la diferenciación a células Th2.

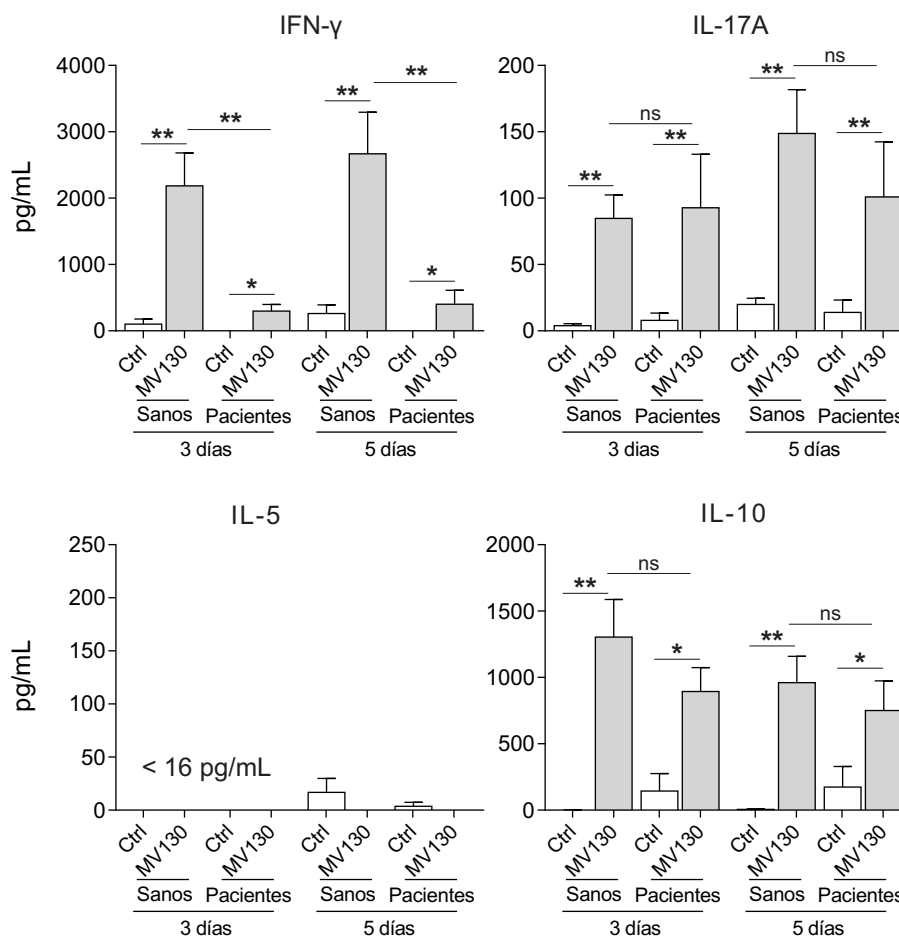


Figura R.36 MV130 modula respuestas inmunes en PBMC aislados de donantes sanos y pacientes. Niveles de IFN- γ , IL-17A, IL-5 e IL-10 en el PBMC de los individuos sanos (n=9) y los pacientes con RRTIs (n=9) tratados con control o MV130 durante 3 y 5 días. Los resultados muestran la media \pm SEM. Test del signo de rangos de Wilcoxon, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; ns (no significativo).

6. Estudio de los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV130 en DCs humanas

Una vez determinado el fenotipo y función que MV130 induce en las DCs, se estudió de forma pormenorizada los mecanismos inmunológicos implicados en estos efectos a nivel molecular. Nuestros resultados demuestran que no existen diferencias significativas entre hmoDCs tratadas con MV130 obtenidas de pacientes con RRTIs e individuos sanos. Por ello, para llevar a cabo los estudios funcionales y mecanísticos, se utilizaron hmoDCs derivados de individuos sanos. En primer lugar, se realizó un análisis comparativo global del transcriptoma utilizando *Gene Array* (Agilent), que permite analizar la expresión diferencial de genes expresados en dos o más condiciones, en este caso control y tratamiento (MV130).

6.1. Análisis comparativo global del transcriptoma en DCs humanas activadas con MV130 respecto al control

En primer lugar, se aisló ARN de hmoDCs derivadas de 4 donantes sanos que habían sido estimuladas con control o MV130 durante 24 h (ver materiales y métodos). Las muestras del ARN obtenido se cuantificaron y se analizó su integridad estructural. El análisis mediante *Gene Arrays* permitió identificar y analizar genes cuyo nivel de expresión difiere entre las muestras procedentes de la condición de MV130 respecto a las muestras control. Tras pasar todos los controles de calidad pertinentes y realizar el filtrado, se obtuvo una base de datos de 19893 genes diferencialmente expresados catalogados según distintos parámetros: *Gene Symbol*, *EntrezGeneID*, *Fold Change*, *Genbank Accesion* y *Gene name* (**Figura R.37**). A partir de esta base de datos, se realizaron todos los análisis posteriores. Para el análisis estadístico se realizó una T moderada de los 19893 genes en la que se obtuvieron 1456 genes diferencialmente expresados ($FC > 2$; $P < 0.05$) en las hmoDCs tratadas con MV130 comparado con el control. De ellos, 750 genes se encuentran sobre-expresados y 706 genes tienen su expresión disminuida en las DCs humanas con respecto al control.

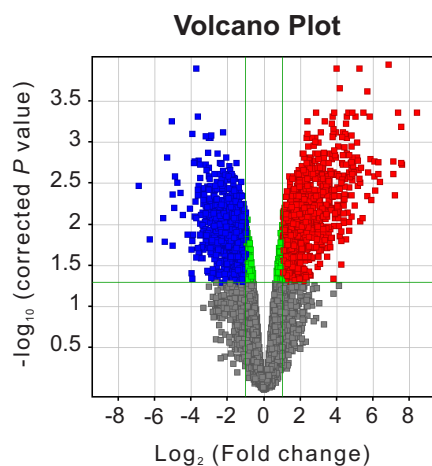


Figura R.37 *Volcano plot* que describe el \log_2 del FC respecto al $-\log_{10}$ de la P corregida respecto para cada uno de los 19893 genes. Para el análisis estadístico se utilizó una T moderada para 4 experimentos independientes. Los genes que están sobre-expresados y los genes cuya expresión está disminuida están destacados en rojo y azul, respectivamente.

Con el fin de determinar las implicaciones funcionales de la expresión génica diferencial entre MV130 y control, se llevaron a cabo dos análisis de enriquecimiento (*Gene Set Enrichment Analysis*): Ontología de genes (GO, *Gene Ontology*) para procesos biológicos, y KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). El análisis por GO permite organizar los términos funcionales de cada gen en tres categorías: función molecular, proceso biológico y componente celular. Por otra parte, el análisis por KEGG ofrece redes moleculares, que muestran interacción molecular, reacciones y relaciones entre elementos de un sistema biológico; contruidos a partir de datos en la literatura. En el análisis de enriquecimiento funcional mediante ontologías génicas usando el programa bioinformático *Gene Codis* de los 750 genes sobre-expresados y 706 genes con expresión disminuida, se observa que en la categoría de “procesos biológicos” el 50% de los genes se agruparon en tres procesos: transducción de señales, respuesta inmune y apoptosis (**Figura R.38**). El resto de los genes sobre-expresados se agruparon principalmente en procesos biológicos relativos a funciones del sistema inmune. Por otro lado, los genes con expresión disminuida se agruparon fundamentalmente en procesos relacionados con proliferación celular y señalización (**Figura R.38**). Este análisis confirma que MV130 regula genes asociados en respuestas inmunes en hmoDCs. Sin embargo, aunque estos análisis ofrecen pistas de la función biológica de los genes implicados en dicha regulación, resulta poco útil a la hora de encontrar vías de señalización implicados en los mecanismos moleculares. Por ello, se llevó a cabo un análisis de vías empleando KEGG, lo que permitió la identificación de 10 vías de señalización relacionadas con la regulación del sistema inmune diferencialmente expresadas en las hmoDCs tratadas con MV130 respecto al control (**Figura R.39**). En la **tabla R.8** se muestra de manera detallada cada uno de los genes individuales diferencialmente expresados en las vías de señalización identificadas.

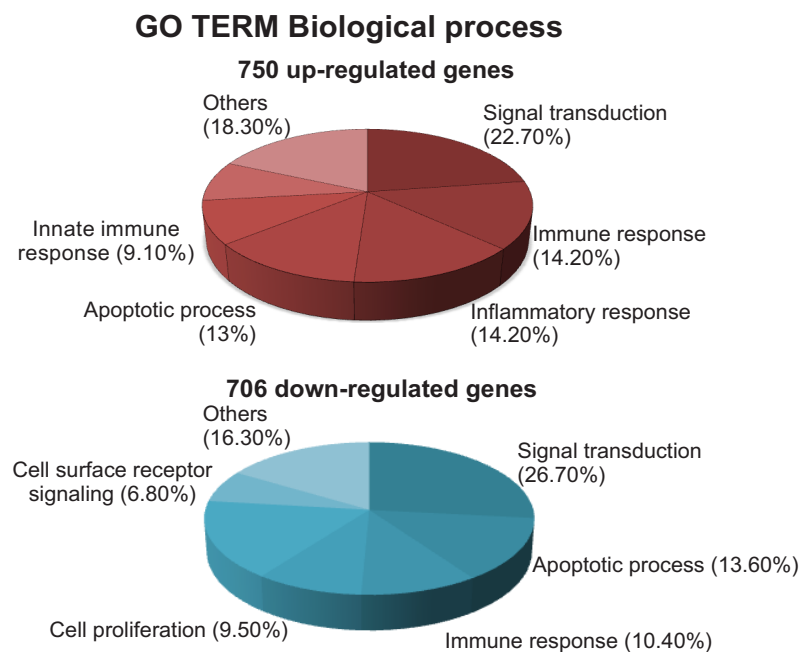


Figura R.38 Análisis de términos de GO usando el programa *GeneCodis* para el análisis de los 750 genes sobre-expresados y 706 genes con la expresión disminuida. Los procesos biológicos alterados con una $P < 0.05$ y más de 10 genes están indicados en los diagramas rojos y azules para los genes sobreexpresado y genes con expresión reducida, respectivamente.

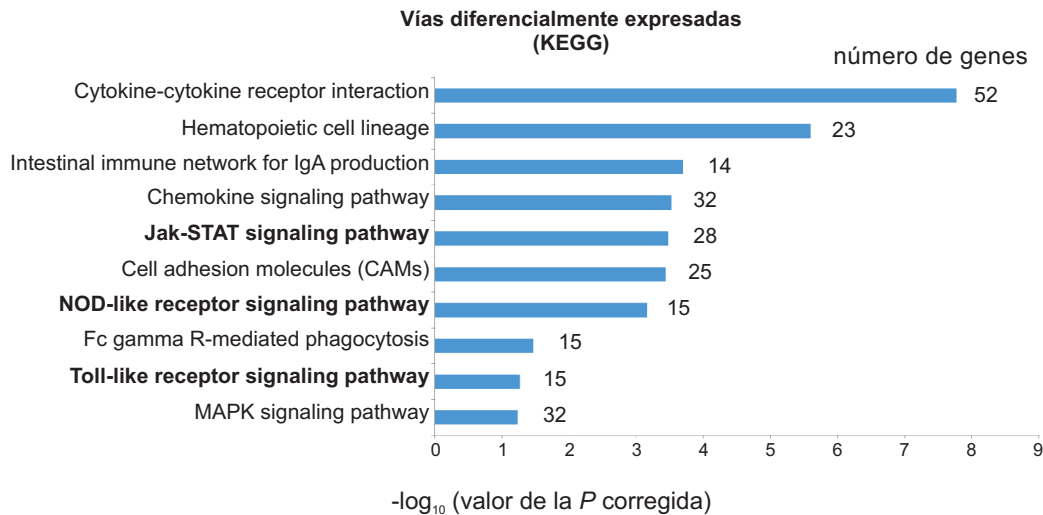


Figura R.39 Análisis de enriquecimiento de vías de señalización por KEGG utilizando la base de datos DAVID. Se muestra las 10 vías diferencialmente expresadas en la condición de MV130 respecto al control en hmoDCs con valores de $P < 0,06$ y > 10 genes diferencialmente expresados, de acuerdo con el $-\log_{10}$ de la P corregida y el número de genes que participan en cada vía.

Las **figuras R.40** y **R.41** muestran las vías de los receptores Toll y NOD, respectivamente, las cuales se encuentran diferencialmente expresadas en la condición de MV130 respecto al control.

Es interesante destacar que la mayor parte de los genes implicados en estas vías se encuentren sobre-expresados en la condición de MV130 en hmoDCs (**Tabla R.8**). Por ejemplo, aproximadamente el 80% de los genes de la vía de interacción de citoquinas con sus respectivos receptores están sobre-expresados. Estos resultados confirman los primeros análisis de cuantificación de citoquinas tanto a nivel de ARN como de proteína en hmoDCs estimuladas con MV130, con lo que contribuye a validar los datos obtenidos en este análisis transcriptómico (**Figura R23** y **R24**). Por otro lado, en la vía *Hematopoietic cell lineage* se observaron genes implicados en los distintos marcadores expresados en la superficie de las células durante procesos de diferenciación. Como se observó en los primeros análisis por citometría de flujo, MV130 es capaz de inducir maduración de DCs humanas, lo que valida los datos obtenidos en este *Gene Array*. En la vía de **las moléculas de adhesión**, cabe destacar el gen CD274 (PD-L1) que se encuentra sobre-expresado en la condición de MV130. Varios estudios demuestran que moléculas derivadas de microorganismos patógenos o comensales y otras señales tales como TGF- β , IL-10, IDO y PD-L1, favorecen fenotipos tolerogénicos en DCs humanas, capaces de inducir células Treg funcionales (53, 178, 181, 231, 232). Otra de las rutas diferencialmente expresadas a destacar es la **ruta de las MAPK**, en la que se encuentran genes sobre-expresados en la condición de MV130, como MAP3K8, que juegan un papel esencial en la producción de citoquinas inflamatorias tras la estimulación con diversos estímulos (75). Además, es importante señalar la vía *Intestinal Immune Network for IgA production*, ya que existen evidencias de que la microbiota modula el desarrollo y función del sistema inmune del organismo para que produzca IgA, cuya función es

Tabla R.8 Genes diferencialmente expresados en vías de señalización relacionadas con el sistema inmune según KEGG.

Pathways	Genes	Count	%	(-) Log10 (corrected P value)
Cytokine-cytokine receptor interaction	FASLG, TNFSF12, CLCF1, CCL13, CCL19, CCL2, CCL20, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCR7, CXCL1, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CSF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF3, IL1RAP, IL1R2, IL1A, IL1B, IL10, IL15, IL15RA, IL17RB, IL2RA, IL2RB, IL2IR, IFNLR1, IL4R, IL-6, IL-7, IL7R, CXCL8, CXCR1, CXCR2, MET, OSM, TGFB1, TGFB2, TNFSF9, TNFSF12A, TNFSF14, TNFSF1B, TNFSF4, TNFSF6B, TNFSF8, TNFSF9	52	3,7	7,77
Hematopoietic cell lineage	CD14, CD1B, CD1C, CD33, CD36, CD9, FCER2, CSF2, CSF2RA, CSF3, ITGAM, IL1R2, IL1A, IL1B, IL2RA, IL4R, IL6, IL7, IL7R, HLA-DRB3, HLA-DRB1, TFR3	23	1,6	5,6
Intestinal immune network for IgA production	TNFSF12, ICOSLG, integrin, beta 7, IL10, IL15R, IL15, IL6, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPBI, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB1, TGFB1	14	1	3,69
Chemokine signaling pathway	JAK3, PTK2B, TIAM2, ADCY7, CCL13, CCL19, CCL2, CCL20, CCL3, CCL3L3, CCL4, CCR7, CXCL1, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, ELMO1, FOXO3, CXCL8, CXCR1, CXCR2, NCF1, NFKB1, NFKBIA, PAK1, PLCB2, PRKX, STAT3, AKT3, LYN	32	2,3	3,52
Jak-STAT signaling pathway	JAK1, JAK3, CLCF1, CSF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF3, CCND2, IL-10, IL-15, IL15RA, IL-2RA, IL2RB, IL2IR, IL4R, IL-6, IL7, IL7R, OSM, PIM1, PTPN6, STAT3, STAT5A, SPRY2, SOCS2, SOCS3, AKT3	28	2	3,48
Cell adhesion molecules (CAMs)	CD274, CD276, CDH2, ICOSLG, ITGA9, ITGAM, ITGB7, ITGB8, ICAMI, ICAM3, HLA-F, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPBI, HLA-DRB3, HLA-DRB1, MPZL1, PECAMI, PVR, PVRL2, PDCD1, PDCD1LG2, VCAN	25	1,8	3,44
NOD-like receptor signaling pathway	PYDC1, PYCARD, CARD9, CCL13, CCL2, CXCL1, CXCL2, IL1B, IL6, CXCL8, MAPK11, NFKB1, NFKBIA, RIPK2, TNFAIP3	15	1,1	3,6
Fc gamma R-mediated phagocytosis	FCGR3A, JMJD7-PLA2G4B, LIMK2, GSN, INPP5D, MARCKS, NCF1, PAK1, PLA2G4A, PLD1, PLD2, SPHK1, AKT3, LYN	15	1,1	1,47
Toll-like receptor signaling pathway	CD14, CCL3, CCL4, IL1B, IL6, CXCL8, MAPK11, MAP3K8, NFKB1, NFKBIA, TLR1, TLR2, TLR8, AKT3, FOS	15	1,1	1,27
MAPK signaling pathway	CD14, FASLG, MID7, MKNK1, RASGRP1, DUSP10, DUSP16, DUSP5, DUSP8, FGF13, GADD45A, GADD45B, HSPA2, IL1R2, IL1A, IL1B, MAPK11, MAP3K13, MAP3K8, MAP4K1, NFKB1, NFKB2, PAK1, PLA2G4A, PRKX, PPP3CC, ZAK, TGFB1, TGFB2, AKT3, FOS, RELB	32	2,3	1,23

La primera columna indica el nombre de cada una de las vías implicadas. En la segunda columna se detalla los genes significativamente sobre-expresados o disminuidos en la condición de MV130 respecto al control, que se muestran en rojo y azul, respectivamente. La tercera columna count y se refiere al número de genes del Gene Array que participan en dicha vía, y la cuarta columna indica el porcentaje de genes del Gene Array involucrados respecto al total de genes que componen dicha vía. La última columna indica la probabilidad p asociada a cada vía, expresado en logaritmo en base 10.

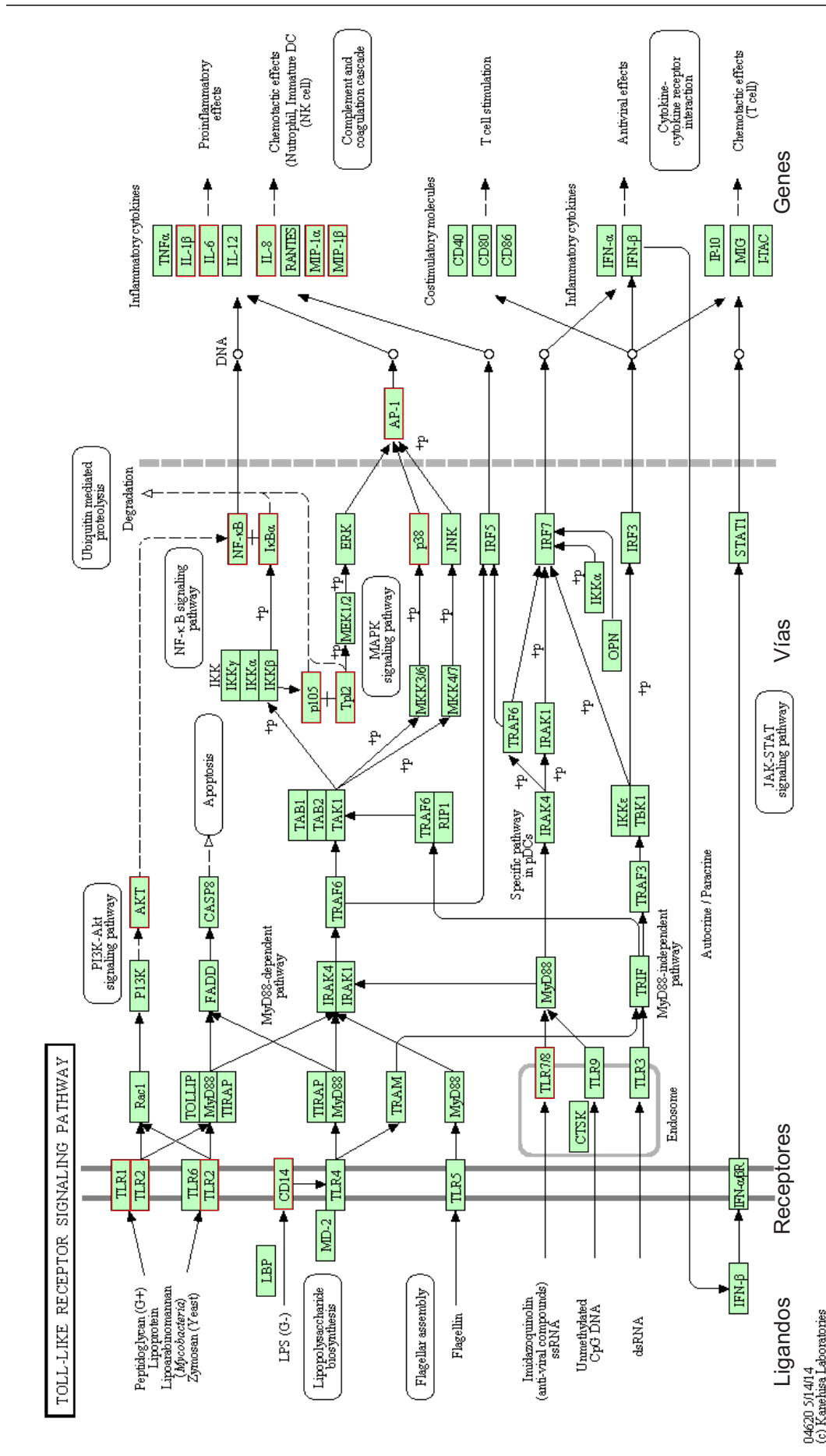


Figura R.40 Mapa de la vía de los receptores Toll. Este mapa de KEGG representa los ligandos detectados por sus respectivos receptores que activan vías de señalización moleculares, y procesamiento de la información genética. Los genes recuadrados en rojo son los que se encuentran diferencialmente expresados en la condición de MV130 respecto al control.

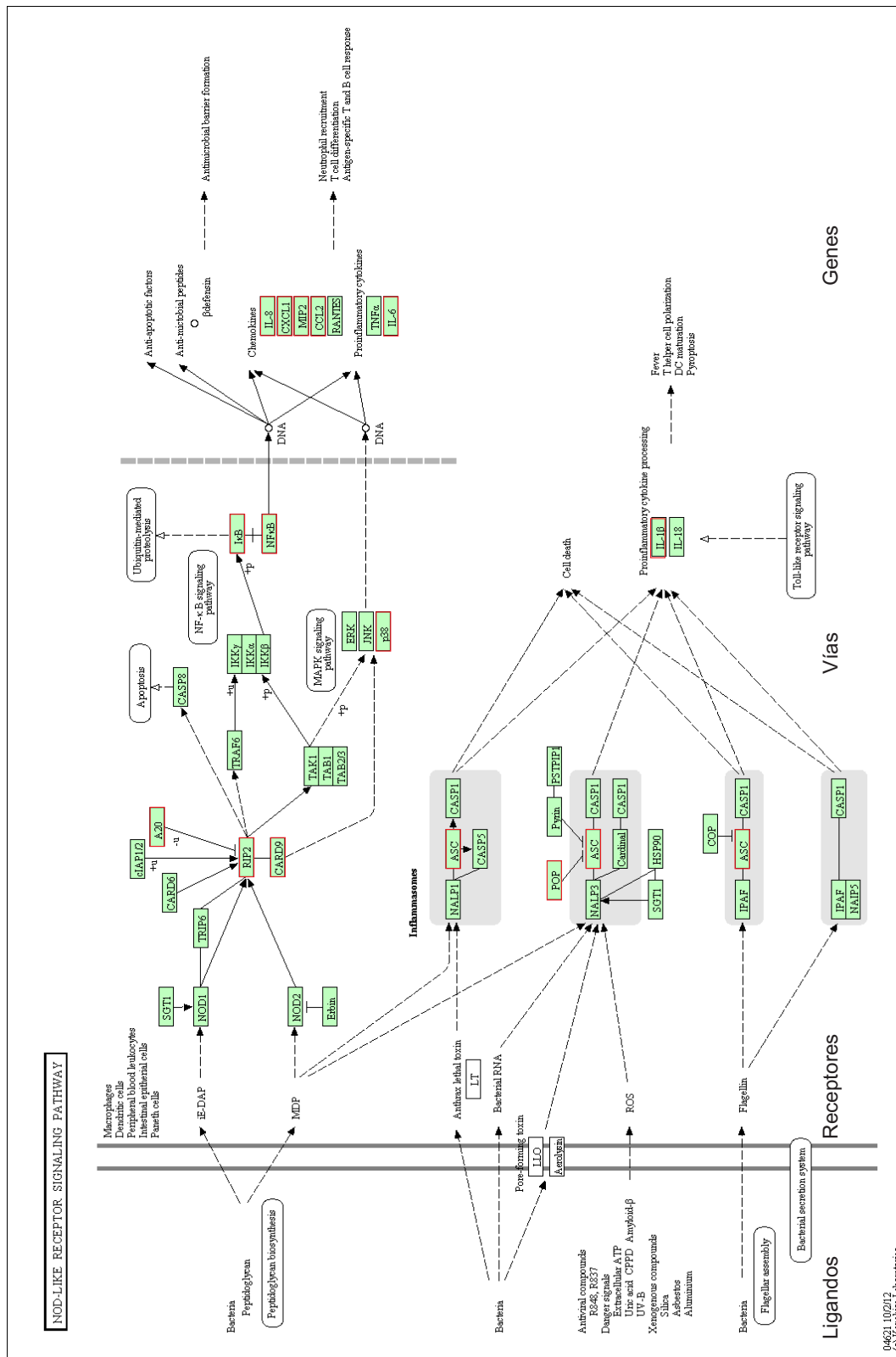


Figura R.41 Mapa de la vía de los receptores NOD por KEGG que representa ligandos detectados por sus respectivos receptores que activan vías de señalización moleculares, y procesamiento de la información genética. Los genes recuadrados en rojo son los que se encuentran diferencialmente expresados en la condición de MV130 respecto al control.

muy importante como primera línea de defensa contra microorganismos (232, 233). Aunque todas estas vías tienen funciones muy importantes en el sistema inmune, en este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la vía de los receptores Toll (TLRs) y de los receptores NOD (NLRs) ya que junto los CLR's son los PRR's más importantes y estudiados en DC's en la detección de agentes microbianos y juegan un papel esencial en regular la función de las DC's, incluyendo su capacidad de polarizar respuestas T. Otra vía que también nos resultó muy interesante es la vía **JAK-STAT**, ya que algunos de sus componentes como SOCS3 guarda una relación con la función que IL-10 tiene en el control de respuestas inmunes proinflamatorias excesivas en DC's (234, 235).

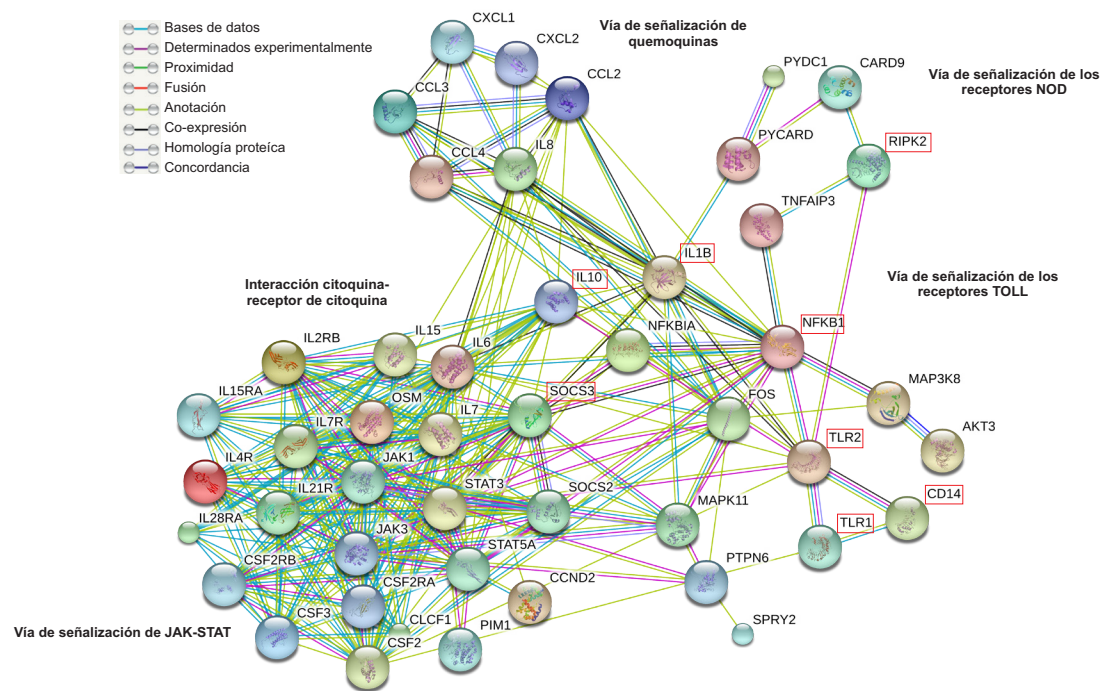


Figura R.42 Red de interacción de proteínas con el programa *STRING* basado en un intervalo de confianza de $\geq 0,7$. Las principales agrupaciones de genes asociados e identificados por el programa están indicados en la figura. Las proteínas clave de cada agrupación están recuadradas en rojo. Las líneas conectadas representan el tipo de asociación de acuerdo con el código de colores indicado en la leyenda de la figura.

Para analizar las posibles interacciones entre las proteínas codificadas por los genes involucrados en estas tres vías (**TLRs**, **NLRs** y **JAK-STAT**), se utilizó el programa *STRING 10.0*. Para ello, se introdujo el listado de las 49 proteínas diferencialmente expresadas y que forman parte de estas tres vías en el programa *STRING* para determinar posibles conexiones entre dichas proteínas. El programa identificó una red de interacciones que indicaban que MV130 activa receptores Toll y NOD, lo que podría culminar en la activación de NF- κ B y posterior producción de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas e IL-10 (**Figura R.42**). Una de los genes potencialmente implicados según esta red de interacciones es **RIPK2**, molécula adaptadora de la vía de los NLRs, que podría participar en último término la activación de NF- κ B. RIPK2 está sobre-

expresada en hmoDCs cuando se estimula con MV130 (ver **tabla R.8**). Asimismo, TLR1 y TLR2 también se encuentran sobre-expresados tras el tratamiento con MV130. Es importante destacar el papel central de IL-1 β , ya que se aprecia que existe una interacción tanto con componentes del inflamasoma como con NF- κ B. El inflamasoma es un complejo multiproteico que juega un papel en la maduración de IL-1 β (150, 236). Además, distintos estudios muestran que IL-1 β tiene un papel fundamental en la generación de células Th17 determinando propiedades patogénicas o reguladoras en dichas células (167). Nuestros datos de transcriptoma indican que existe una contribución de TLRs y NLRs en el mecanismo de acción de MV130 en las DCs humanas. Asimismo, estos datos sugieren que IL-10 juega un papel esencial en el control de la respuesta inmune. No obstante, los análisis realizados a partir del *Gene Array* representan una herramienta muy teórica que ofrece pistas sobre genes cuyos niveles de expresión se ven modificados. Por ello, para confirmar los mecanismos de MV130 en las DCs humanas, se realizaron experimentos funcionales que se detallan a continuación.

7. Validación de los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV130 sobre DCs humanas

Con el propósito de validar la participación de la vía de los receptores Toll y NOD, se realizaron experimentos de inhibición de MyD88 y RIPK2, moléculas clave en la iniciación de las vías de señalización iniciados tras la activación de dichos receptores (127, 144, 203, 237). Para ello, hmoDCs activadas con MV130 se incubaron con los inhibidores correspondientes: Pepinh-MYD (un péptido intracelular que bloquea MyD88) y Gefitinib (un inhibidor farmacológico específico de RIPK2) y se analizó el perfil de citoquinas (**Figura R.43**). Como se muestra en esta figura, los resultados indican que los receptores Toll y NOD contribuyen a la producción de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 inducida por MV130 en DCs humanas. Cabe destacar que la producción de todas las citoquinas a excepción de IL-6 disminuye significativamente, alrededor del 95%, cuando las hmoDCs tratadas con MV130 se pre-incuban simultáneamente con el inhibidor de RIPK2 (Gefitinib) y el inhibidor de MyD88 (Pepinh-MYD). La pre-incubación con Gefitinib indujo una inhibición significativa (en torno al 75%) de la producción de TNF- α , IL-23 e IL-10. El péptido inhibidor de MyD88 bloquea también significativamente la producción de estas citoquinas (alrededor del 40%). En el caso de IL-6, se produce la misma tendencia pero los porcentajes de inhibición son menores con respecto a las anteriores; alrededor de un 45% en presencia de Gefitinib y de un 20% con el Pepinh-MYD. Estos resultados indican que la producción de TNF- α , IL-6, IL-23 e IL-10 es mediada principalmente por los receptores NOD con la participación en menor medida de los receptores Toll. En cambio, para IL-1 β se observó una tendencia distinta. Como se puede apreciar en la **figura R.43**, Gefitinib y Pepinh-MYD bloquean la producción de IL-1 β en un 45% y 65%, respectivamente, lo que sugiere una mayor contribución de los receptores Toll para esta citoquina. Estos datos sugieren que MV130 actúa

sobre TLRs y NLRs iniciando una cascada de señalización mediada por las moléculas adaptadoras MyD88 y RIPK2, respectivamente, lo que podría condicionar la capacidad de DCs para favorecer la generación de respuestas Th1, Th17 y células productoras de IL-10 (124, 145).

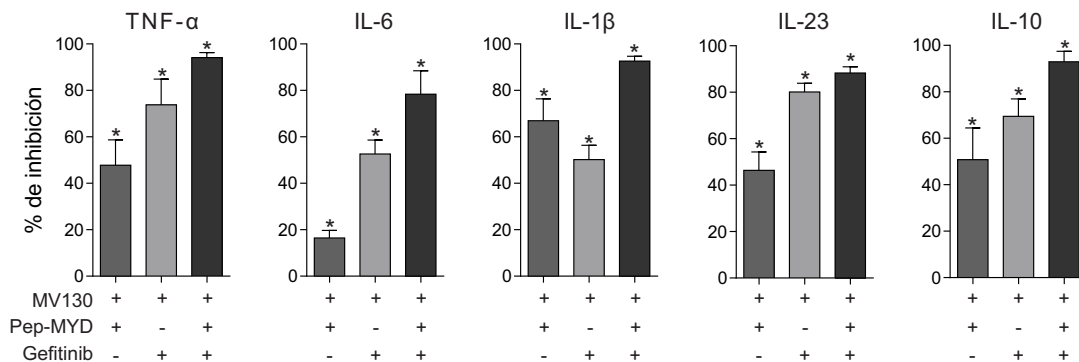


Figura R.43 Porcentaje de inhibición de la producción de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 en hmoDCs tratadas con MV130 en presencia de los inhibidores (Pepinh-MYD y/o Gefitinib) relativos a sus correspondientes controles (Pepinh-control y/o DMSO). Los resultados reflejan la media \pm SEM de 6-8 experimentos independientes. Test del signo de rangos de Wilcoxon, * $P < 0,05$.

Distintos PAMPs han sido asociados con la activación de determinados TLRs (122, 238). Por ejemplo, LPS de bacterias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae* interacciona con el TLR4, y en cambio, el peptidoglicano característico de las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* se asocia con el TLR2 (122, 239, 240). La activación de los TLRs pone en marcha una cascada de señalización que puede ser dependiente, o independiente de MyD88 (241). Varios estudios han demostrado que la activación de TLR4 puede iniciar la vía independiente de MyD88 a través de la proteína TRIF (242, 243).

MV130 está formado por un 90% de bacterias Gram positivas, por lo cual interaccionaría mayoritariamente con TLR2 y en menor medida con TLR4 (124). Los resultados de inhibición muestran casi un 100% de inhibición total cuando se bloquea MyD88 y RIPK2, sugiriendo que estas dos vías son las principales rutas activadas. Por otro lado, es importante recalcar que NOD2 reconoce los MDPs que están presentes en todos los PGNs de tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas (244). En cambio, NOD1 reconoce iE-DAPS encontradas en el PGN de las bacterias Gram negativas y alguna Gram positiva. Por lo tanto, esto apoyaría que MV130 sea reconocido en mayor medida por NOD2. Un estudio demuestra que existe un eje TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 que regula el balance de citoquinas proinflamatorias e IL-10 tras la estimulación de componentes de la bacteria Gram positiva (*Streptococcus pneumoniae*) en macrófagos, que no se observa para PAM3CSK4 (244).

Tanto NLRs como TLRs culminan en la activación de NF- κ B. En las células THP1-XblueTM se observó que MV130 induce una activación de factores de transcripción NF- κ B/AP-1. Por ello, se estudió la capacidad de MV130 para activar hmoDCs y la contribución de los TLRs y NLRs. HmoDCs se pre-incubaron con Pepinh-MYD o Pepinh-control durante 2 h o con Gefitinib o

DMSO durante 30 min antes de la estimulación (30 min) con MV130 o con control, y se estudió la activación de NF- κ B mediante Western Blot para identificar y cuantificar las formas fosforiladas de IKK e I κ B α . En el mecanismo de activación de NF- κ B, el complejo quinasa IKK cataliza la fosforilación de la proteína inhibidora de NF- κ B (I κ B). Una vez fosforilada I κ B se ubiquitina y posteriormente se degradada por el proteosoma, permitiendo que NF- κ B se transloque al núcleo y se active, induciendo la expresión de citoquinas inflamatorias (118, 245, 246). Como se observa en la **figura R.44**, hmoDCs estimuladas con MV130 inducen una clara activación de NF- κ B, ya que produce un aumento tanto de la activación de IKK α /IKK β como de I κ B α . Además, esta activación es mediada tanto por TLRs como NLRs. La activación de IKK α /IKK β disminuye un 50% cuando se pre-incuba con los inhibidores por separado y se inhibe totalmente cuando se pre-incuban simultáneamente. En cambio, el aumento de activación de I κ B α en hmoDCs tratadas con MV130 es mediado fundamentalmente por NLRs (**Figura R.44**). Cabe destacar que, al igual que ocurre en la activación de IKK α /IKK β , la inhibición de ambas vías produce una reducción del 100% de la activación de I κ B α . Estos datos confirman los resultados observados para la producción de citoquinas, donde a pesar de que existe una contribución de ambas vías, la mayor implicación viene dada por NLRs.

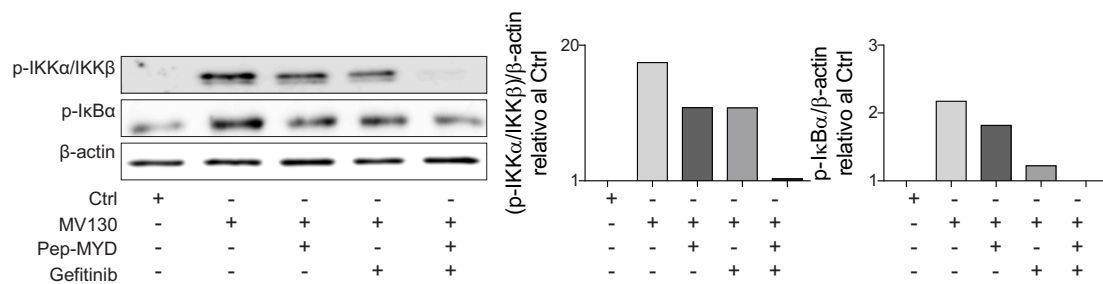


Figura R.44 Western Blot de NF- κ B para identificar y cuantificar las formas fosforiladas de I κ B α e IKK en los extractos de proteínas totales de hmoDCs pre-incubadas durante 2 h en presencia de Pepinh-MYD o/y Gefitinib durante 30 min, antes de la estimulación con MV130 durante 30 min. Además, hmoDCs se estimularon con control durante 30 min. Las gráficas del lado derecho representan la cuantificación mediante densitometría de las correspondientes bandas (fosfo-IKK α /IKK β (ser176/177) y fosfo- I κ B α (Ser32/36)) con respecto a la β -actina y relativizada al control empleado en cada caso.

En resumen, nuestros experimentos demuestran que hmoDCs activadas con MV130 producen citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias que requieren la participación de TLRs y NLRs. Consecutivamente, estas vías conducen a la activación de NF- κ B, factor de transcripción que interviene en la expresión de citoquinas inflamatorias. Estudios previos demuestran que OM-85 activa NF- κ B tras la estimulación con el preparado (58, 219). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de NF- κ B por *Streptococcus pneumoniae* depende de NOD2 (247). MV130 está compuesto por un 60% de *Streptococcus pneumoniae*, lo que justificaría que la fosforilación de I κ B α y consecuente activación de NF- κ B sea llevada a cabo, fundamentalmente, por NLRs.

7.1. Estudio del papel de IL-10 en el mecanismo de acción de MV130

IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que desempeña un papel crucial durante los procesos infecciosos ya que regula las respuestas inmunitarias inducidas por diversos agentes patógenos evitando daños potenciales en los tejidos del organismo (163). Por tanto, en algunas infecciones IL-10 puede contribuir a perpetuar la cronicidad (163, 248). Además, se ha demostrado que el bloqueo de la señalización de IL-10 durante la infección puede provocar inmunopatologías (220). Por otro lado, estudios recientes sugieren que IL-10 puede también participar en la eliminación de agentes patógenos, favoreciendo la restauración de la microbiota (92). Para dilucidar la contribución de IL-10 en nuestro sistema, se realizaron experimentos de bloqueo con un anticuerpo específico para IL-10 y se cuantificó la producción de citoquinas proinflamatorias a nivel de proteína y la expresión de ARNm. Para ello, hmoDCs en presencia del anticuerpo bloqueante de IL-10 (α -IL-10) o su correspondiente isotipo control, se estimularon con MV130. Como se observa en la **figura R.45**, hmoDCs estimuladas con MV130 en presencia del anticuerpo bloqueante de IL-10 (α -IL-10) incrementan significativamente la producción de todas las citoquinas proinflamatorias analizadas (IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-23) con respecto a hmoDCs estimuladas con MV130 en presencia del isotipo control.

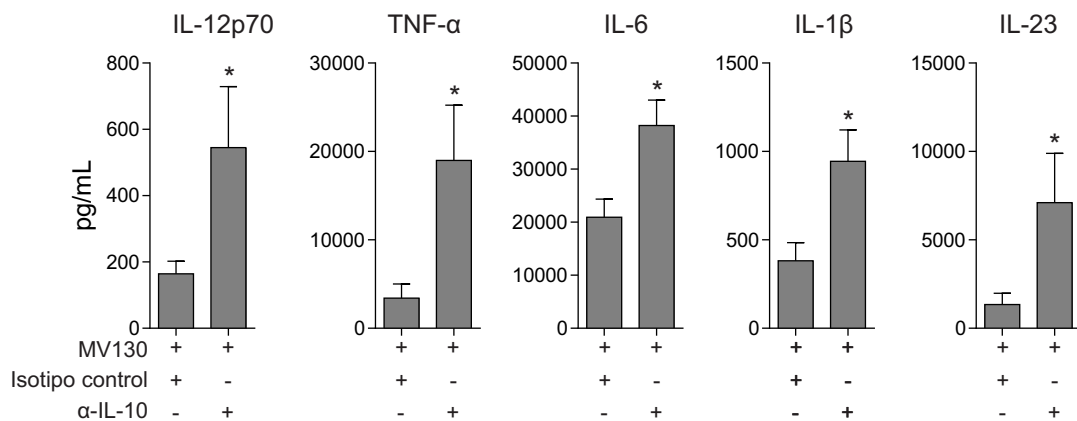


Figura R.45 Producción de IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β y IL-23 por hmoDCs tratadas durante 24 h con MV130 en presencia del anticuerpo bloqueante específico para IL-10 (α -IL-10) o del correspondiente isotipo control. Los resultados muestran la media \pm SEM de 6 experimentos. Los niveles de citoquinas se cuantificaron por ELISA. Test del signo de rangos de Wilcoxon, * $P < 0,05$.

Estos resultados se confirmaron a nivel de expresión de ARN mediante PCR cuantitativa (**Figura R.46**). Como se puede observar en esta figura, también se produce un aumento en los niveles de ARNm de IL-12p35, IL-12p40, TNF- α e IL-6, y de forma menos acusada de IL-23. Sin embargo, el nivel de expresión de ARNm de IL-1 β no se alteró en presencia del anticuerpo bloqueante de IL-10.

Estos resultados demuestran la importancia de IL-10 en el control de respuestas excesivas de citoquinas proinflamatorias, que de lo contrario podría resultar muy perjudicial para el organismo, pudiendo causar daño colateral en distintos tejidos. Además, IL-10 juega un papel muy esencial en

la diferenciación de los dos subgrupos de células Th17 (225, 249). Nuestros resultados sugieren que IL-10 favorecería que hmoDCs activadas con MV130 polaricen la respuesta Th17 con un fenotipo regulador y no patogénico. Aun así, serían necesarios estudios más exhaustivos para confirmarlo de forma fehaciente (249).

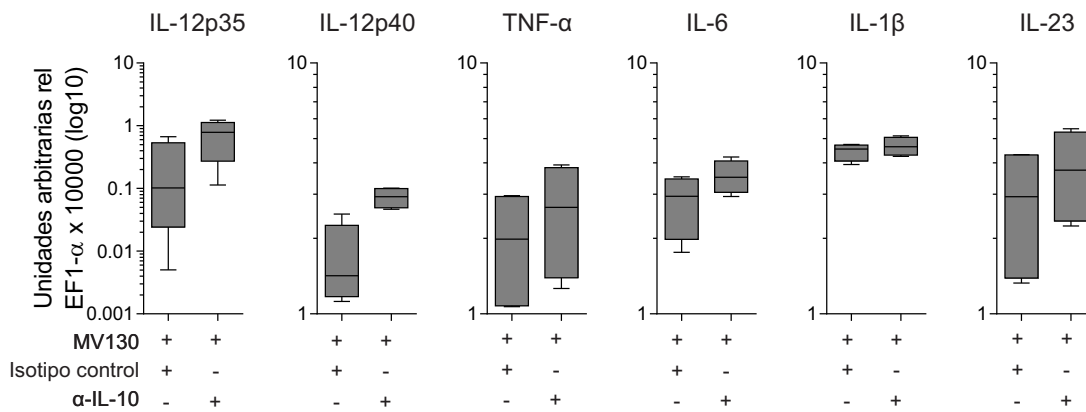


Figura R.46 Niveles de expresión de ARNm en hmoDCs estimuladas con MV130 en presencia del anticuerpo bloqueante de IL-10 y su correspondiente isotipo control. Unidades arbitrarias relativas al EF1-α multiplicado por 10⁴. Los datos representan la media ± SEM de 4 experimentos independientes.

Los análisis de interacción de proteínas con *STRING* indican que existe una interacción directa entre IL-10 y proteínas SOCS (*suppressor of cytokine signaling*). Las proteínas SOCS son una familia de 8 proteínas implicadas en la supresión de la señalización de citoquinas. Entre ellas, SOCS3 es un factor determinante para inducir inmunidad o tolerancia en las DCs (250). IL-10 ejerce su función biológica en forma de homodímeros a través de un complejo de receptores transmembrana (IL-10R1 e IL-10R2) y actúa mediante la activación de la quinasa Janus 1 (Jak1) y la tirosina quinasa 2 (TyK2), que activan los factores de transcripción de la familia

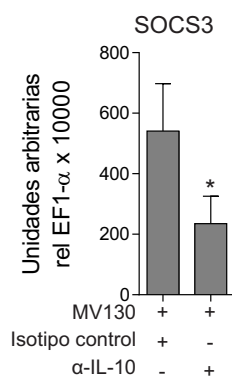


Figura R.47 Niveles de ARNm de SOCS3 determinadas mediante qRT-PCR en hmoDCs activadas con MV130 en presencia del anticuerpo bloqueante de IL-10 (α-IL-10). Resultados son la media ± SEM de 4 experimentos independientes realizados por PCR cuantitativa. Test del signo de rangos de Wilcoxon, *P < 0.05.

STAT (*signal transducers and activator of transcription*). Cuando STAT3 se activa, se transloca al núcleo y activa SOCS3 (251), que está implicada en la inhibición de citoquinas proinflamatorias, suprimiendo sus vías de señalización (252, 253). Se ha demostrado que IL-10 reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias a través de la activación de SOCS3 (254). En la **figura R.47**, se observa que los niveles de expresión de ARNm de SOCS3 aumentan en hmoDCs activadas con MV130 comparadas con los niveles de hmoDCs estimuladas con MV130 en presencia del anticuerpo bloqueante de IL-10. Nuestros resultados sugirieron que IL-10 mediante la activación de SOCS3 podría contribuir a regular la producción de citoquinas proinflamatorias.

7.2. Contribución del inflammasoma en el modo de acción de MV130 en hmoDCs

Los análisis transcriptómicos comparativos sugieren que MV130 es capaz de activar el inflammasoma en hmoDCs, lo que culminaría en la producción de IL-1 β . Para verificar estos resultados, se midió por PCR cuantitativa los niveles de expresión a nivel de ARNm de 3 componentes del inflammasoma: caspasa 1, NALP3 y NLRP1, en hmoDCs activadas con MV130 a distintos tiempos.

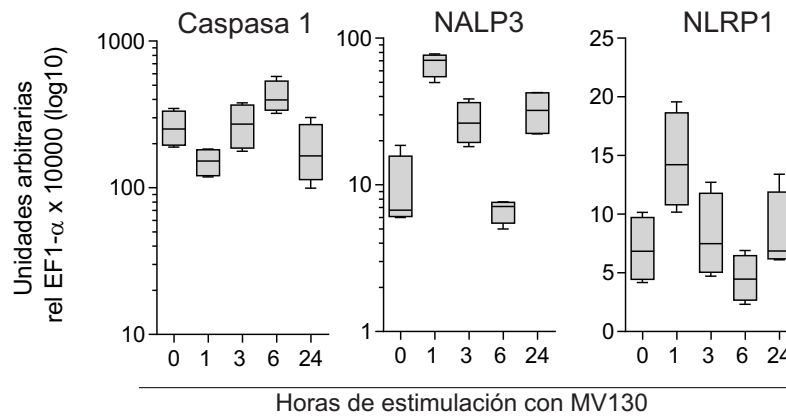


Figura R.48 Niveles de expresión del ARNm determinados por qRT-PCR de los componentes del inflammasoma: caspasa 1, NALP3 y NLRP1 en hmoDCs tratadas con MV130 durante los tiempos indicados. El tiempo 0 h corresponde a hmoDCs sin estimular. Media \pm SEM de 4 experimentos independientes.

La estimulación de hmoDCs con MV130 durante 1 h induce una disminución en la expresión de los niveles de ARNm de caspasa 1 (**Figura R.48**). A partir de las 3 h, los niveles de ARNm aumentan, alcanzando el nivel máximo a 6 h. Posteriormente, los niveles disminuyen hasta llegar prácticamente a niveles de ARN similares a los inducidos tras 1 h de estimulación con MV130 (**Figura R.48**). Por el contrario, los niveles de expresión de ARNm de NALP3 y NLRP1 siguen una tendencia distinta a la observada en caspasa 1. En este caso, los niveles de expresión de ARNm alcanzan su máximo tras 1 h de estimulación con MV130 (**Figura R.48**) y posteriormente decaen hasta 6 h. A las 24 h de estimulación con MV130 se observa un ligero aumento en los niveles de ARNm, pero sin lograr los niveles producidos tras 6 h (**Figura R.48**).

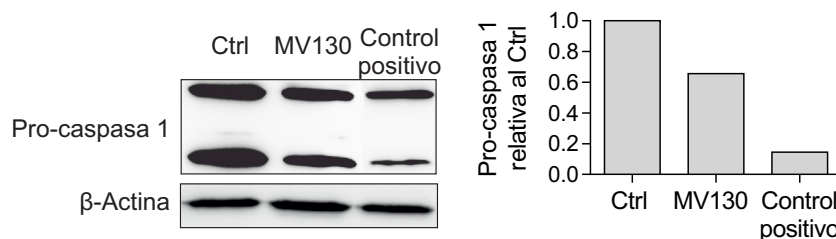


Figura R.49 Western blot para pro-caspasa 1 y análisis cuantitativo del procesamiento de pro-caspasa 1 en hmoDCs estimuladas durante 24 h con las siguientes condiciones: control positivo, control o MV130, y cuantificación de las bandas mediante densitometría. La gráfica representa la cuantificación de las correspondientes bandas pro-caspasa 1 con respecto a la β -actina y relativizada al control positivo.

La activación del inflammasoma culmina en la activación de caspasa 1, la cual se sintetiza a partir de la rotura proteolítica de sus precursores inactivos (pro-caspasas). Además, la caspasa 1 está implicado en la maduración de IL-1 β , ya que es capaz de convertir la pro-IL-1 β en su forma madura IL-1 β (147). Se analizaron los niveles de activación de caspasa 1 a nivel de proteína por Western Blot. Para ello, se cuantificaron los niveles de su forma inactiva (pro-caspasa 1). Estos experimentos mostraron que tras la estimulación de hmoDCs con MV130, aumentó la activación de la caspasa 1 en comparación con el control (**Figura R.49**), lo que justificaría la producción de IL-1 β

8. Estudio de la contribución de los componentes Gram positivos y Gram negativos de MV130 en los efectos ejercidos en hmoDCs

Las bacterias se pueden distinguir según la estructura de su pared celular. Las bacterias Gram positivas poseen una envoltura celular que comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano. Por el contrario, las bacterias Gram negativas tienen una doble membrana celular (externa y citoplasmática) y entre medio de ambas se localiza una fina pared celular de peptidoglicano. MV130 está formado por 90% de bacterias Gram positivas (*Streptococcus pneumoniae* 60%, *Staphylococcus aureus* 15% y *Staphylococcus epidermidis* 15%); y 10% de bacterias Gram negativas (*Moraxella catarrhalis* 3%, *Haemophilus influenzae* 3% y *Klebsiella pneumoniae* 4%). Las bacterias Gram positivas contienen, fundamentalmente, ligandos de TLR2, mientras que las Gram negativas de TLR4 (255). Además, ambos grupos de bacterias inducen respuestas inmunes distintas. Por ello es interesante estudiar la contribución de cada grupo (Gram positivas y Gram negativas) en el efecto que MV130 ejerce en hmoDCs.

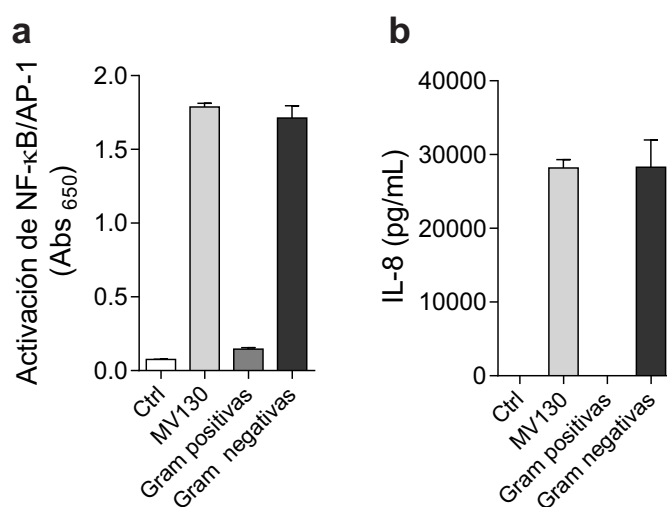


Figura R.50 (a) Activación de NF- κ B/AP-1 en las células THP1- XBlue™ estimuladas con control, MV130, los componentes Gram positivas (*S. epidermidis* 15%, *S. aureus* 15% y *S. pneumoniae* 60%), el conjunto de las bacterias Gram negativas (*H. influenzae* 3%, *M. catarrhalis* 3% y *K. pneumoniae* 4%) (n=3-6). (b) Niveles de IL-8 en células THP1-XBlue™ mediante ELISA (n=3). Media \pm SEM.

Las células THP1-XBlue™ se incubaron en presencia del conjunto de bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas de MV130. Estas bacterias se usaron a la concentración que representan en MV130. En la **figura R.50 (a y b)** se observa que el conjunto de bacterias Gram negativas al igual que MV130 inducen mayor activación de NF- κ B/AP-1 y mayor producción de IL-8 en células THP1-XBlue™ que el control y el conjunto de bacterias Gram positivas. Nuestros resultados revelan que las bacterias Gram negativas son las que contribuyen mayoritariamente tanto en la activación de NF- κ B/AP-1 como a la producción de IL-8 ejercida por MV130.

Para evaluar la capacidad del conjunto de Gram positivas y Gram negativas de modular las DCs, se estimularon las hmoDCs durante 24 h con control, MV130, el conjunto de las bacterias Gram positivas o el conjunto de las bacterias Gram negativas y se analizó la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo. Como se observa en la **figura R.51**, no se observaron cambios en el porcentaje de células que expresan HLA-DR con cada uno de los estímulos, a excepción del conjunto de Gram negativas en el que se observa que existe una disminución de aproximadamente el 20%. Asimismo, tras la estimulación con el conjunto de las bacterias Gram positivas aumentó el número de hmoDCs CD86⁺ en comparación con el resto de condiciones. El porcentaje de células positivas para CD86 cuando las hmoDCs se estimulan con las bacterias Gram negativas o control es muy similar. Por otro lado, la estimulación con las bacterias Gram positivas aumentó significativamente el porcentaje de hmoDCs CD83⁺ en comparación con la estimulación con el control. Además, el porcentaje de células positivas para CD83 fue muy similar en hmoDCs estimuladas con MV130 o las bacterias Gram negativas.

Por lo tanto, nuestros datos indican que la expresión de los marcadores de superficie CD86 y CD83 en hmoDCs estimuladas con las bacterias Gram positivas que componen MV130 es mayor que en hmoDCs estimuladas con control, MV130 o Gram negativas.

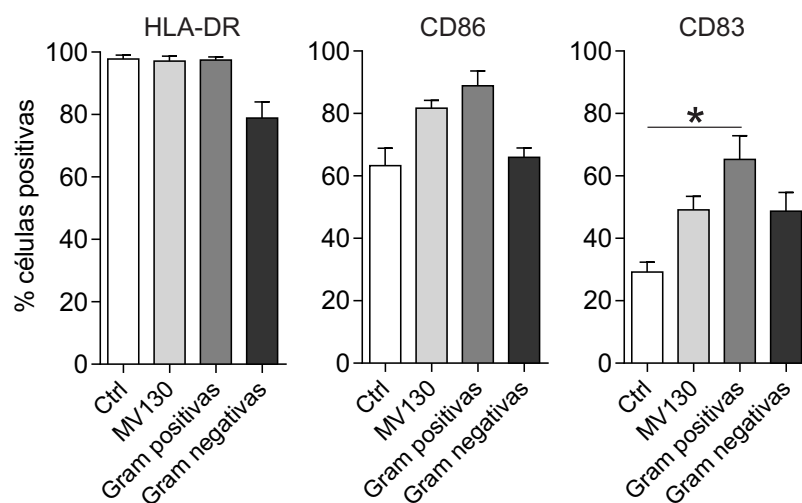


Figura R.51 Expresión de los marcadores de superficie HLA-DR, CD86 y CD83 en hmoDCs tratadas con control, MV130, bacterias Gram positivas o las bacterias Gram negativas contenidos en MV130 durante 24 h. Media \pm SEM (n=4). Test de Friedman de comparación múltiple, * $P<0,05$.

Además, se cuantificaron mediante ELISA los niveles de IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 producidas por hmoDCs tras la estimulación con control, MV130, Gram positivas o Gram negativas (**Figura R.52**). La estimulación de hmoDCs con las bacterias Gram negativas induce niveles de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-10 muy superiores a los producidos por las hmoDCs en presencia de las bacterias Gram positivas. De hecho, los niveles de TNF- α e IL-10 en hmoDCs estimuladas con las bacterias Gram positivas fueron significativamente menores que los niveles tras la estimulación con MV130. En cambio, aunque los niveles de IL-12p70 fueron producidos en mayor medida por las bacterias Gram negativas, la contribución de las bacterias Gram positivas fue mayor al observado en el resto de citoquinas. Cabe destacar que los niveles de citoquinas secretadas por las hmoDCs estimuladas con las bacterias Gram positivas o las bacterias Gram negativas no alcanzan en ningún caso, los niveles producidos por las hmoDCs en presencia de MV130. En ninguno de los casos se observa un efecto sinérgico. Nuestros resultados sugieren que las citoquinas producidas por hmoDCs en presencia de MV130 se deben principalmente a la contribución de las bacterias Gram negativas que componen dicho preparado.

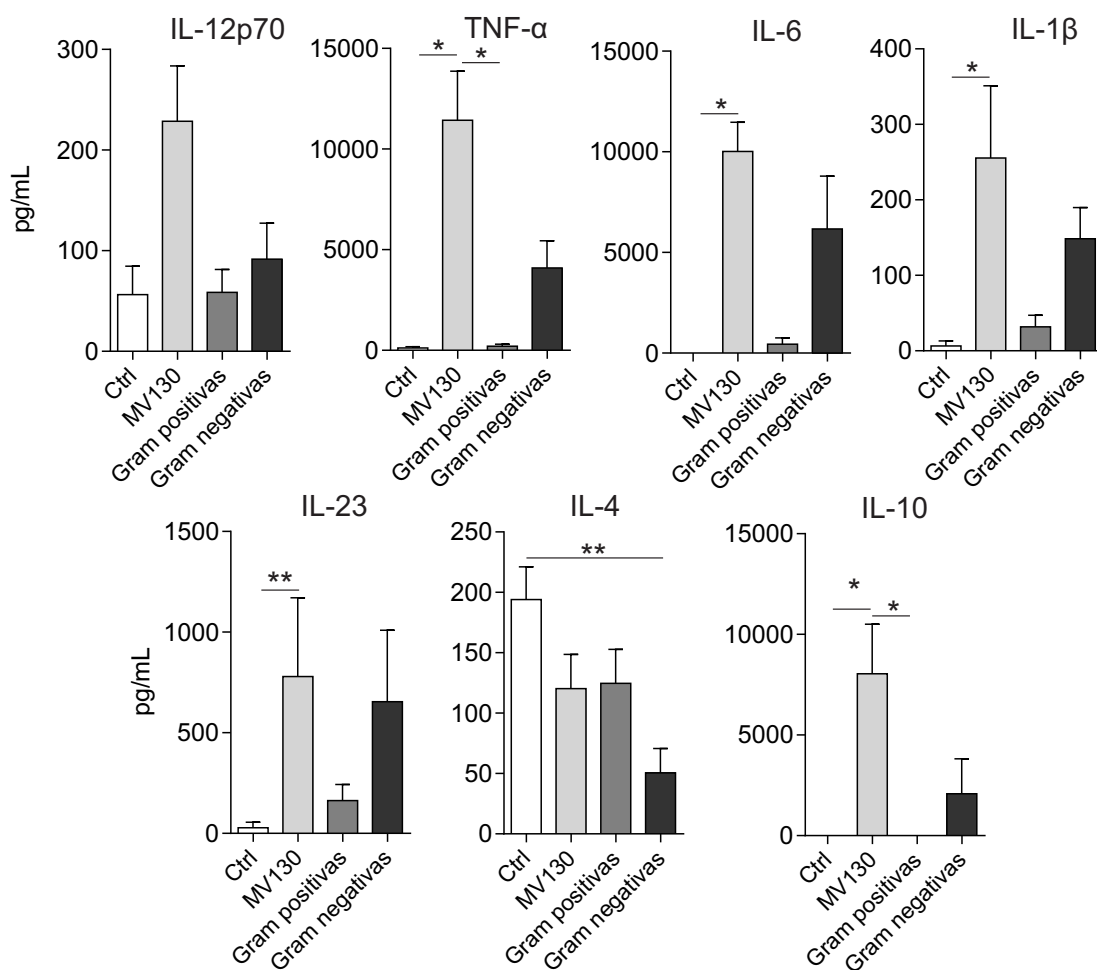


Figura R.52 Niveles de citoquinas producidas por las hmoDCs estimuladas con MV130, el conjunto de las bacterias Gram positivas o el conjunto de las bacterias Gram negativas (n=3-4). Los resultados representan la media \pm SEM. Test de Friedman de comparación múltiple, * P <0,05, ** P <0,01.

Por último, se analizó la capacidad de las bacterias Gram positivas y Gram negativas que componen MV130 para condicionar la capacidad de hmoDCs para polarizar respuestas T. Para ello, se realizó el mismo tipo de experimentos descritos anteriormente y se recogieron los sobrenadantes del co-cultivo para medir los niveles de citoquinas producidas por las células T CD4⁺ vírgenes alogénicas activadas por hmoDCs en presencia de control, MV130, las bacterias Gram positivas, o Gram negativas (**Figura R.53**). Estos resultados revelaron que las bacterias Gram negativas contribuyen en mayor medida a la polarización de células Th1 y Treg productoras de IL-10, inducida por MV130. Sin embargo, los niveles de IL-17A secretados por las células T en presencia de hmoDCs activadas con MV130, son debidos a la contribución de las bacterias Gram negativas con la cooperación, en menor medida, de las bacterias Gram positivas (**Figura R.53**). Curiosamente, los niveles de IL-5 producidos por las células T en presencia de hmoDCs activadas con las bacterias Gram positivas o Gram negativas fueron mayores que los producidos en presencia de hmoDCs estimuladas con control o MV130.

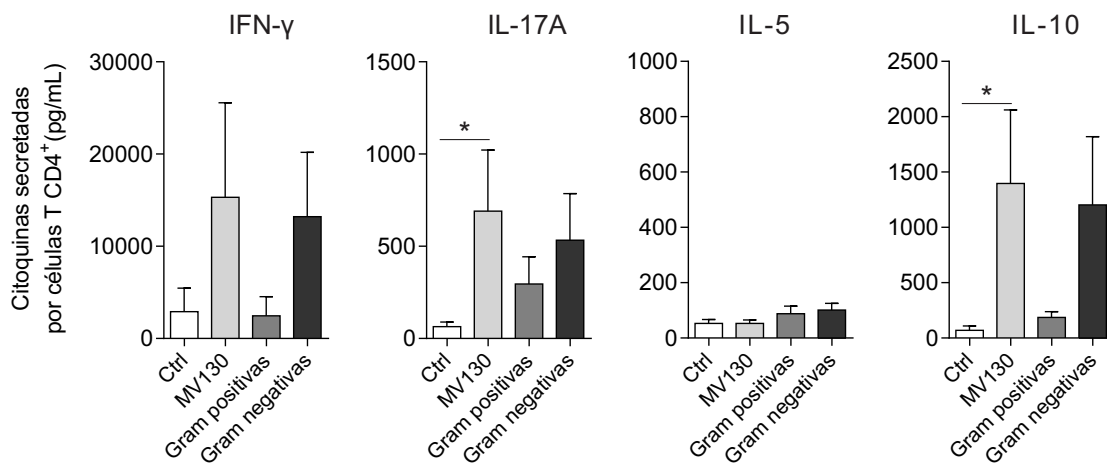


Figura R.53 Efecto en la polarización de las células T por hmoDCs estimuladas con control, MV130, bacterias Gram positivas o las bacterias Gram negativas en co-cultivo con células T CD4⁺ vírgenes alogénicas durante tres días. Media \pm SEM. Test de Friedman de comparación múltiple, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

En resumen, estos resultados sugieren que tanto las bacterias Gram positivas como Gram negativas contribuyen a los efectos globales inducidos por MV130 en hmoDCs. Por un lado, las bacterias Gram positivas aumentan los niveles de expresión de los marcadores de maduración y co-estimulación en hmoDCs, los cuales son necesarios para que las hmoDCs maduren y adquieran la capacidad de presentar antígenos a las células T. Por otro, las bacterias Gram negativas son las principales inductoras de la producción de citoquinas en hmoDCs activadas con MV130.

En esta primera parte, combinando experimentos funcionales *in vitro* realizados a partir de células de donantes sanos y de pacientes que sufren RRTIs con herramientas de análisis del transcriptoma, se ha estudiado la capacidad inmunomoduladora de MV130 (Bactek®). En conjunto, nuestros datos revelan que MV130 actúa sobre las DCs humanas para generar respuestas de tipo Th1/ Th17 y células T productoras de IL-10 mediante mecanismos que dependen de RIPK2 y

MyD88, moléculas clave de NLRs y TLRs, respectivamente. Estos resultados contribuyen a comprender el modo de acción mediante la cual MV130 podría ejercer beneficios clínicos en pacientes que sufren RRTIs. Por un lado, induce una rápida y potente respuesta proinflamatoria, produciendo citoquinas necesarias que favorecen la generación de respuestas Th1 y Th17, lo que podría contribuir a la defensa frente a patógenos intracelulares y extracelulares, respectivamente. Por otro lado, MV130 también es capaz de actuar sobre las DCs y favorecer que generen células T productoras de IL-10. Como se ha demostrado con los experimentos de bloqueo de IL-10, esta citoquina antiinflamatoria podría ser esencial para evitar una respuesta inmune excesiva; que generará un daño grave en el organismo.

BLOQUE II: PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE MV140 (UROMUNE®) EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

MV140 (Uromune®) es una preparación polivalente bacteriana (75% bacterias Gram negativas y 25% bacterias Gram positivas) enteras inactivadas por calor que se utiliza para el tratamiento de infecciones recurrentes del tracto urinario (RUTIs). Al igual que MV130, se administra vía sublingual y representa una inmunoterapia segura y eficaz. Los beneficios clínicos demostrados de MV140 en comparación con el uso de antibióticos, sugieren que MV140 podría ser una estrategia efectiva para reducir la frecuencia, la duración, la gravedad y los costes asociados a las RUTIs (29, 47). Sin embargo, los mecanismos inmunológicos subyacentes implicados en estos beneficios clínicos siguen siendo desconocidos. En este bloque se estudian los mecanismos inmunológicos que MV140 y sus componentes ejercen sobre las DCs humanas.

1. Estudios para optimizar las condiciones de ensayo (dosis y tiempo de respuesta) en células THP1

Al igual que para MV130, se determinó la concentración de MV140 y el tiempo de estimulación óptimo. Para ello, células THP1-XBlue™ se estimularon con el control (todos los excipientes del preparado a excepción de las bacterias) o MV140 y se midió la activación de NF- κ B/AP-1 y los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-8, siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

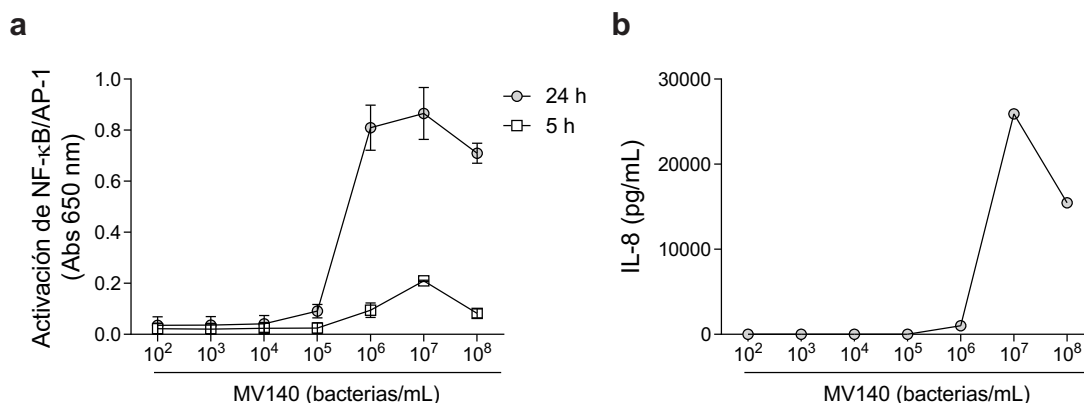


Figura R.54 Análisis de la capacidad de MV140 para activar NF- κ B/AP-1 y para inducir la producción de IL-8 en las células THP1-XBlue™. (a) Activación de NF- κ B/AP-1 producida en THP1-XBlue™ tras 5 y 24 h de incubación con distintas concentraciones del preparado polibacteriano MV140 (n=2). (b) Niveles de IL-8 cuantificados por ELISA producidos por THP1-XBlue™ tras la estimulación con MV140 a distintas concentraciones después de 24 h de tratamiento (n=1).

Como muestra la **figura R.54**, MV140 induce la activación de NF- κ B/AP-1 en células THP1-XBlue™ de manera dosis y tiempo dependiente. Estos resultados demuestran que las condiciones óptimas de trabajo para MV140 en cuanto a dosis y tiempo de estimulación se

refiere son 10^7 bacterias/mL y 24 horas de estimulación, que sirvió de punto de partida para experimentos posteriores.

Por otro lado, también se estudió la implicación de cada uno de los componentes de la vacuna en las respuestas inmunes inducidas. Por ello, en primer lugar, las células THP1-XBlue™ se estimularon con MV140 a la concentración óptima indicada en el ensayo anterior (10^7 bacterias/mL) y con cada una de las bacterias individuales contenidas en MV140 (*Streptococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, y *Proteus vulgaris*) a $2,5 \times 10^6$ bacterias/mL, proporción a la que se encuentran en MV140. Tras 24 h de estimulación se midieron los niveles de activación de NF- κ B/AP-1 y de IL-8. En la **figura R.55a** se observa que MV140 y bacterias Gram negativas por separado inducen una mayor activación de NF- κ B/AP-1 en células THP1-XBlue™ que el control y la bacteria Gram positiva (*S. faecalis*). Cabe destacar que la mayor producción de IL-8 (**Figura R.55b**) se observó en las células THP1-XBlue™ tras 24 h de estimulación con MV140 con respecto al resto de bacterias y el control. Al igual que en los resultados de activación de NF- κ B/AP-1, las células THP1-XBlue™ estimuladas con las bacterias Gram negativas por separado (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris*) produjeron elevados niveles de IL-8 comparadas con el control y *S. faecalis*.

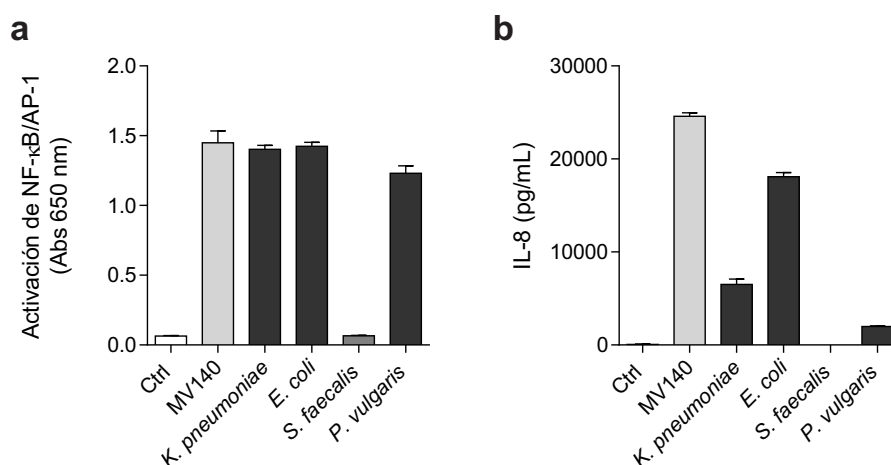


Figura R.55 (a) Activación de NF- κ B/AP-1 en THP1-XBlue™ con MV140 (10^7 bacterias/mL) y componentes individuales (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. faecalis* y *P. vulgaris*) a $2,5 \times 10^6$ bacterias/mL cada una de ellas. (b) Niveles de IL-8 producidos por células THP1-XBlue™ estimuladas con MV140 (10^7 bacterias/mL), *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris* y *S. faecalis* ($2,5 \times 10^6$ bacterias/mL). Los resultados muestran la media \pm SEM (n=3).

En resumen, estos experimentos demuestran que MV140 (Uromune®) activa NF- κ B/AP-1 en THP1 e induce la producción de IL-8. Nuestros resultados con los componentes individuales revelan que las bacterias Gram negativas son las que contribuyen mayoritariamente tanto a la activación de NF- κ B/AP-1 como a la producción de IL-8. Nuestros resultados también muestran que las bacterias Gram negativas juegan un papel principal en este proceso. Teniendo en cuenta que los TLRs están sobre-expresados en la línea celular THP1-XBlue™, estos resultados sugieren que la activación de NF- κ B podría estar mediada por esos receptores. Estos resultados siguen la

misma tendencia que los observados para MV130, donde también la activación de NF- κ B e IL-8 es mediada por las bacterias Gram negativas.

2. Estudio de la capacidad de MV140 y sus componentes para inmunomodular la función en DCs humanas

El siguiente objetivo fue evaluar la capacidad de MV140 y de cada una de las bacterias individuales que lo forman para inmunomodular el fenotipo y la función de DCs humanas. Para ello, hmoDCs se estimularon con control, MV140 y cada una de las bacterias individuales y se analizó la expresión de marcadores de superficie y el perfil de citoquinas inducido. Como se observa en la **figura R.56**, MV140 incrementa significativamente la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD83 y CD86 en hmoDCs respecto al control, demostrando que MV140 promueve la maduración de las hmoDCs. Por otro lado, las tres bacterias Gram negativas (*K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. vulgaris*) y la bacteria Gram positiva (*E. faecalis*) inducen niveles significativamente más altos de CD83 y CD86 en hmoDCs que los inducidos por el control (**Figura R.56**). Cabe destacar que no se observó ninguna diferencia significativa entre dichos componentes individuales. Es interesante recalcar que la mayor inducción de CD86 en hmoDCs se observó con la bacteria Gram positiva *S. faecalis*.

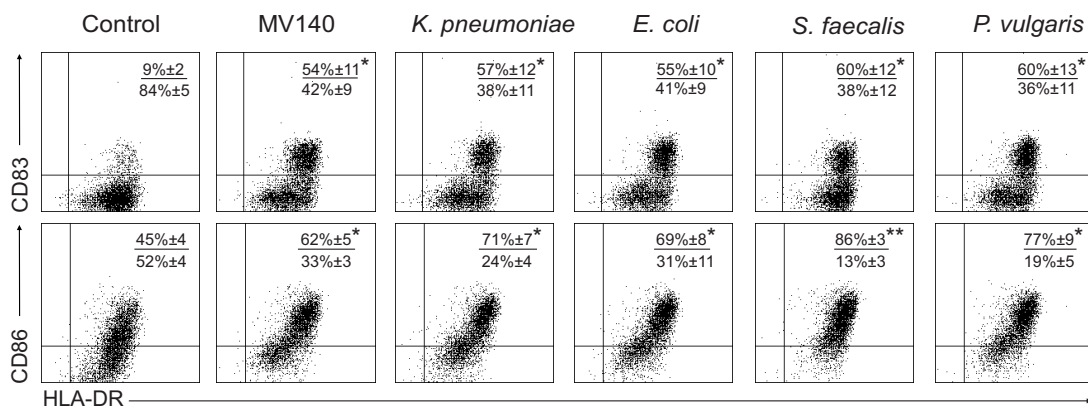


Figura R.56 Citogramas representativos que muestran el porcentaje de hmoDCs que expresan HLA-DR, CD83 y CD86. Las hmoDCs se estimularon con control, MV140 (10^7 bacterias/mL) y cada una de las bacterias por separado: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. faecalis* y *P. vulgaris* ($2,5 \times 10^6$ bacterias/mL) durante 24 h. La media \pm SEM está representada dentro de cada citograma (n=4). Test de Friedman de comparación múltiple, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Además, se observa que la bacteria Gram positiva *S. faecalis* es capaz de inducir un mayor porcentaje de hmoDCs que expresan CD86 respecto a MV140 y al resto de bacterias. Las mismas observaciones que para MV130, donde el conjunto formado por las bacterias Gram positivas fue capaz de producir niveles más altos en la expresión de CD86 comparado con el preparado completo y con las bacterias Gram negativas.

Una vez estudiada la capacidad de MV140 y sus componentes individuales para inducir un fenotipo maduro en las hmoDCs, se analizó la producción de una serie de citoquinas que juegan un papel muy importante en la polarización de los linfocitos T. HmoDCs activadas con MV140

producen niveles significativamente más elevados de las citoquinas proinflamatorias: IL-1 β , IL-6, IL-23 y TNF- α pero no de IL-12p70 y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 con respecto a los observados tras la estimulación con el control (**Figura R.57**). Todas las bacterias individuales son capaces de estimular la producción de citoquinas proinflamatorias pero sin alcanzar los niveles producidos por MV140. La bacteria Gram positiva (*S. faecalis*) es la única capaz de producir niveles de IL-12p70 mayores que MV140 y el control, sin producción de IL-10. Además, induce niveles significativamente más elevados de TNF- α e IL-23 en hmoDCs que el control (**Figura R.57**). Por otro lado, la bacteria *E. coli* induce niveles significativamente más altos de IL-1 β e IL-10 que el control (**Figura R.57**). Cuando se compara MV140 y los componentes individuales, sólo se detectan diferencias significativas para IL-23 (MV140 contra *P. vulgaris* y *S. faecalis* contra *P. vulgaris*) y para IL-10 (MV140 contra *S. faecalis*). En ningún caso, se observaron efectos aditivos. Estos resultados demuestran que hmoDCs activadas con MV140 producen citoquinas proinflamatorias cuya función sería activar respuestas inmunes encaminadas a eliminar patógenos. Por otro lado, MV140 tiene la capacidad de inducir la producción de elevados niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 que, como se ha comentado anteriormente desempeña un papel muy importante en el control de las respuestas inmunes excesivas (256). Otro aspecto muy importante a recalcar es el hecho de que ninguno de los componentes bacterianos individuales incluidos en esta PBP es capaz de imitar por completo la respuesta final generada por MV140, sugiriendo que todos los componentes individuales que constituyen MV140 se requieren para desencadenar las respuestas inmunes observadas.

Cabe destacar que no se observaron efectos aditivos en ningún caso, lo que sugiere que los resultados finales surgen de la integración de las señales que todos los componentes bacterianos de MV140 desencadenan simultáneamente en DCs humanas. Es interesante resaltar que la bacteria Gram positiva *S. faecalis* es la única bacteria capaz de inducir la producción de IL-12p70 en hmoDCs. Sin embargo, los niveles de IL-10 producidos por esta bacteria Gram positiva son prácticamente indetectables y, por tanto, mucho más bajos que los producidos por MV140 y cada una de las bacterias Gram negativas por separado. IL-10 e IL-12 son dos citoquinas con funciones antagónicas. Estudios previos han demostrado que las bacterias Gram negativas y Gram positivas inducen patrones diferentes de citoquinas: monocitos estimulados con bacterias Gram positivas inducen 18 veces más IL-12 que IL-10 y, por el contrario, tras la estimulación con bacterias Gram negativas se produce un promedio de 7 veces más de IL-10 (257). Estos datos estarían en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro trabajo para MV140 y sus componentes individuales. Asimismo, las citoquinas que producen las hmoDCs estimuladas con MV140 juegan un papel muy importante en la polarización de células T. Como se ha descrito en la introducción, IL-1 β , IL-6 e IL-23 son citoquinas proinflamatorias necesarias para la generación de células Th17 (171, 178, 212). Del mismo modo, la citoquina proinflamatoria IL12-p70 y TNF- α están

implicadas en la inducción de respuestas Th1 (157). Por otro lado, IL-4 promueve la generación de respuestas Th2 (99), mientras que IL-10 contribuye al establecimiento de la tolerancia mediante la generación de células T reguladoras (202).

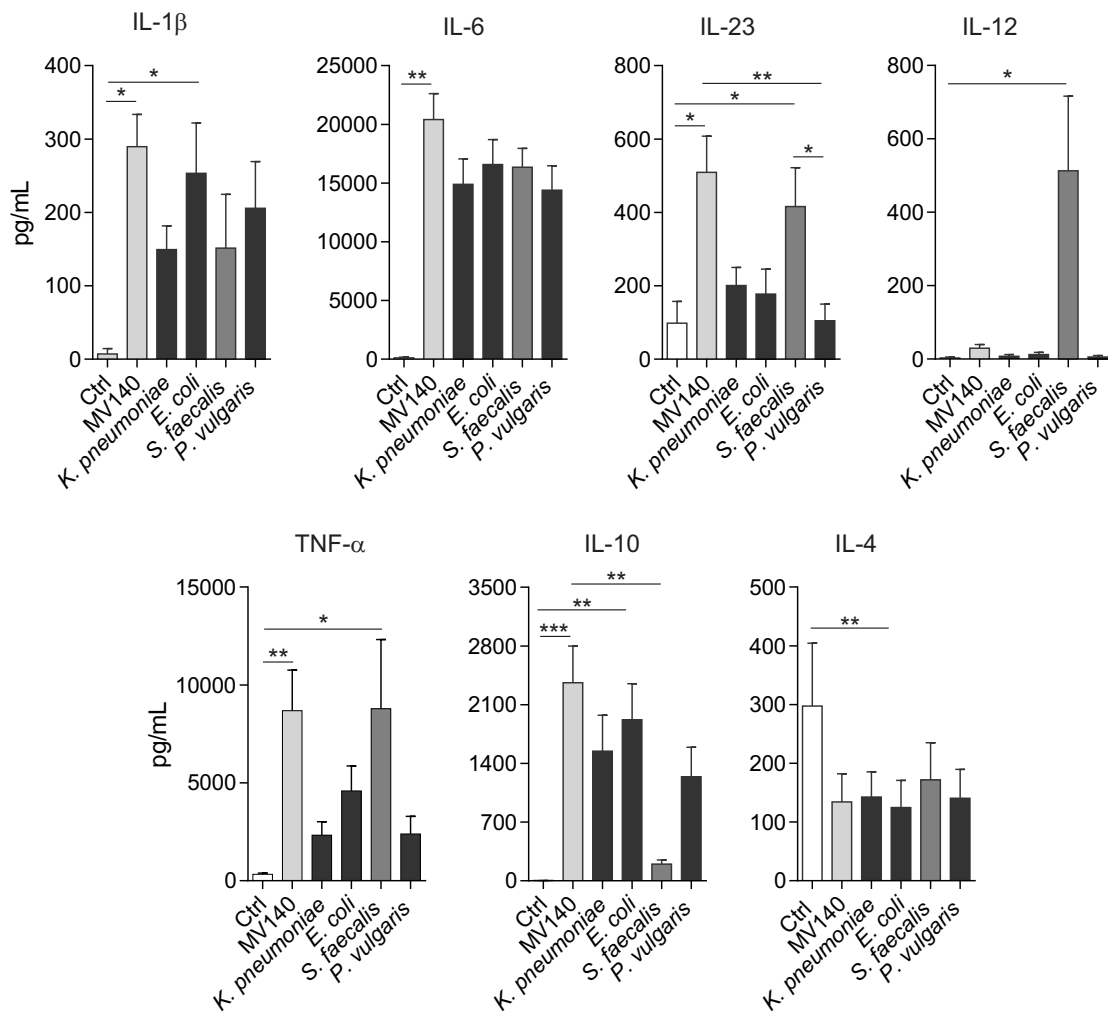


Figura R.57 Perfil de citoquinas en hmoDCs activadas con control, MV140 (10^7 bacterias/mL) o las bacterias individuales ($2,5 \cdot 10^6$ bacterias/mL) durante 24 h. Los niveles de las citoquinas se cuantificaron en los sobrenadantes libres de células por ELISA. Los resultados muestran la media \pm SEM de 5-8 experimentos independientes. Test de Friedman de comparación múltiple, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

3. Estudios de la capacidad de hmoDCs activadas con MV140 y componentes individuales para polarizar respuestas T

Para determinar la capacidad de MV140 y sus componentes individuales para condicionar la habilidad de las DCs humanas para polarizar respuestas T, se desarrollaron experimentos de co-cultivo como los descritos para MV130. En primer lugar, se evaluó la capacidad de las hmoDCs activadas con MV140 para inducir proliferación en células T $CD4^+$ vírgenes alogénicas. Como muestran los experimentos de dilución de CFSE por citometría de flujo (**figura R.58**), hmoDCs estimuladas con MV140 son capaces de inducir mayores porcentajes de proliferación de células T alogénicas $CD4^+$ que las tratadas con el control.

Para determinar el tipo de respuesta T que las hmoDCs activadas con MV140 eran capaces de generar, se midieron en el sobrenadante libre de células las siguientes citoquinas: IFN- γ , IL-17A, IL-5 e IL-10 (**Figura R.59**). Como se observa en esta figura, las hmoDCs activadas con MV140 generan células T productoras de IL-17A, IFN- γ e IL-10 y menos IL-5 que las hmoDCs estimuladas con el control.

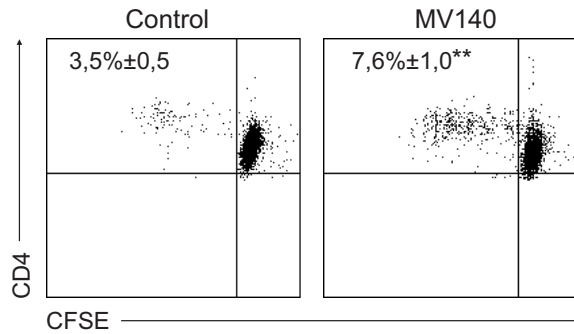


Figura R.58 Citogramas representativos de las células T CD4⁺ vírgenes alogénicas marcadas con CFSE tras tres días de co-cultivo con hmoDCs en presencia de MV140 o el control (n=11-17). La media de la proliferación y el SEM está representada dentro del citograma. Test *t* Student pareada, ***P*<0,01.

Estos datos se confirmaron mediante los experimentos de re-expansión clonal tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h. Tras la re-expansión, las células T CD4⁺ generadas por las hmoDCs activadas con MV140 produjeron niveles significativamente más elevados de IL17A, IFN- γ e IL-10 que los producidos por las células T en presencia de hmoDCs estimuladas con el control. En cambio, los niveles de IL-5 fueron menores que los del control (**figura R.60**).

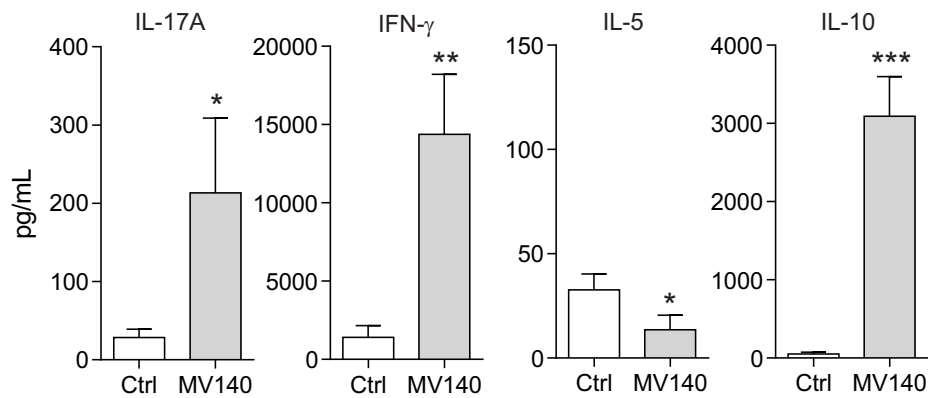


Figura R.59 Citoquinas producidas por las células T CD4⁺ vírgenes alogénicas en presencia de hmoDCs activadas con el control o MV140 tras 3 días cuantificadas por ELISA. Los resultados muestran la media \pm SEM de 11-17 experimentos individuales. Test *t* Student pareada, **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001.

Para confirmar estos resultados se llevaron a cabo experimentos de re-expansión y tinción intracelular a nivel de célula única. Como se observa en la **figura R.61**, hmoDCs activadas con MV140 promueven la generación de células T CD4⁺ capaces de producir niveles significativamente más elevados de IL17A (7,10% \pm 1,6), IFN- γ (14,0% \pm 2,29) e IL-10 (3,9% \pm 0,7) que células T CD4⁺ en presencia de hmoDCs estimuladas con control (3% \pm 0,4, 8,6% \pm 1,8, 1,9% \pm 0,2, respectivamente). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en las células T CD4⁺ productoras de IL-4.

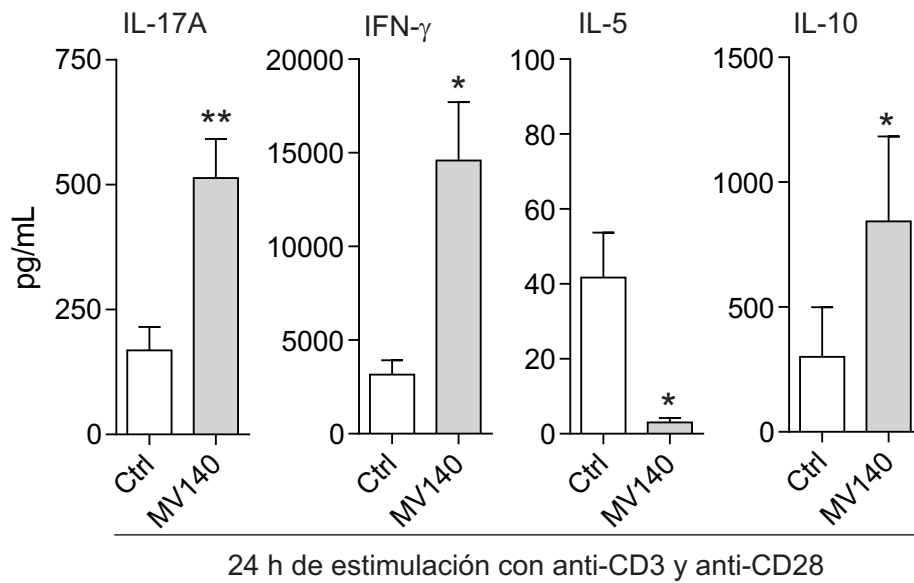


Figura R.60 Citoquinas producidas tras la estimulación policlonal con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h de las células T generadas tras tres días de co-cultivo en presencia de hmoDCs activadas con MV140 o control. Se cuantificaron por ELISA en los sobrenadantes libres de células. Los datos representan la media \pm SEM de 4-6 experimentos independientes. Test *t* Student pareada, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

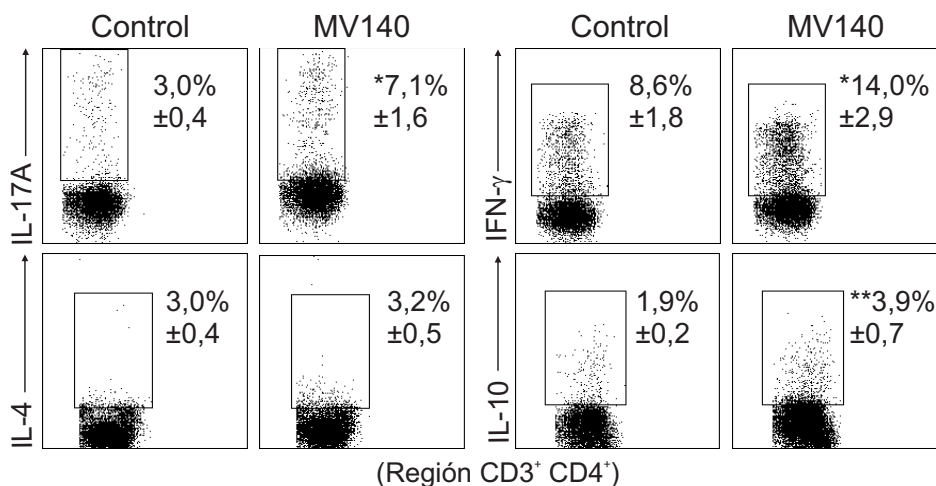


Figura R.61 Citometría de flujo para determinar el porcentaje de células T CD3⁺CD4⁺ que producen IL-17A, IFN- γ , IL-4 e IL-10 generadas tras tres días de co-cultivo en presencia de hmoDCs estimuladas con control o MV140 y células T CD4⁺ alogénicas. Se muestra un citograma representativo de cada citoquina. Los resultados muestran la media \pm SEM (indicados dentro de los citogramas) de 7-11 experimentos independientes. Test *t* Student pareada, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

La producción de IL-12p70 y TNF- α por las DCs promueve la diferenciación de células Th1 productoras de IFN- γ , que a su vez activa linfocitos T citotóxicos, células NK y macrófagos para desarrollar respuestas inmunes frente a patógenos intracelulares (163). Nuestros datos muestran que hmoDCs activadas con MV140 producen TNF- α , lo que justificaría finalmente la generación de células Th1 productoras de IFN- γ . Por otro lado, la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-23 por parte de hmoDCs activadas con MV140 justificaría la generación de células Th17 productoras de IL-17A. Las células Th17 participan en la eliminación de patógenos extracelulares tales como hongos y bacterias extracelulares (258). Las hmoDCs activadas con MV140 no generan células

Th2, como se esperaba debido a los bajos niveles de IL-4 detectados (164). Por otro lado, la producción de IL-10 en las células T co-cultivadas con las hmoDCs activadas con MV140 sugiere un mecanismo regulador por el cual hmoDCs estimuladas con MV140 generarían células Treg (221).

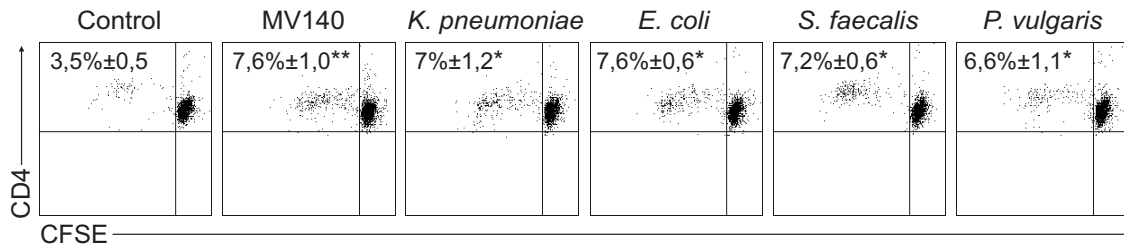


Figura R.62 Citogramas representativos de las células T CD4⁺ vírgenes después de tres días de co-cultivo con hmoDCs alógenas en presencia de MV140, cada uno de los componentes individuales o el control. Los porcentajes de proliferación se encuentran dentro del citograma (n=5-6 experimentos independientes). Test de Kruskal Wallis para comparación múltiple, *P<0,05. Se muestra la media ± SEM.

Además, se estudió la capacidad de cada componente individual para generar respuestas en células T. Para ello, se desarrollaron experimentos de co-cultivo como los descritos en el párrafo anterior. Experimentos de dilución con CFSE mediante citometría de flujo demostraron que tanto las bacterias Gram negativas (*K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. vulgaris*) como la bacteria Gram positiva (*S. faecalis*) producen un aumento significativo en la proliferación de células T CD4⁺ vírgenes alógenas, comparado con el control (**Figura R.62**).

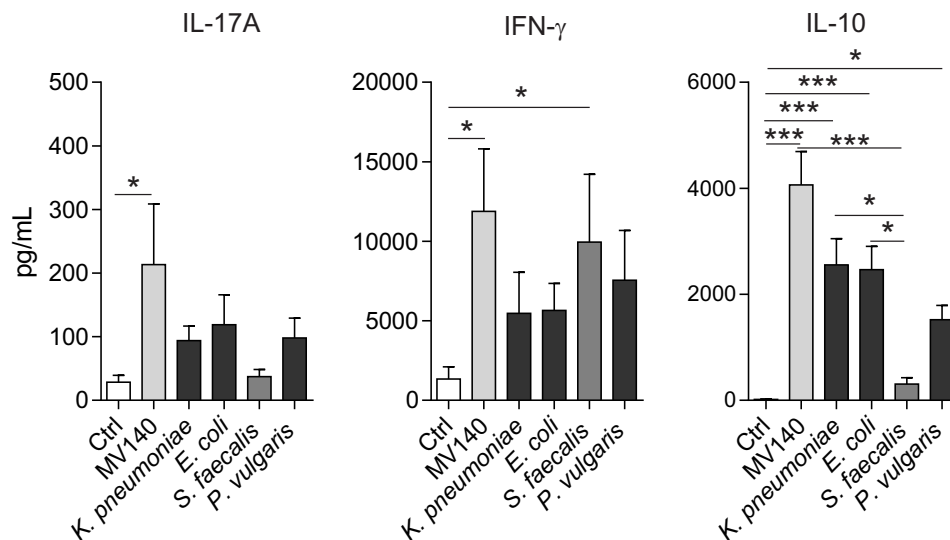


Figura R.63 Citoquinas producidas por las células T CD4⁺ vírgenes alógenas inducidas por hmoDCs tratadas con los estímulos indicados. Tras tres días de co-cultivo se cuantificaron en el sobrenadante libre de células las citoquinas inducidas por ELISA. Los resultados representan la media ± SEM de 5-10 experimentos. Test de Kruskal-Wallis para comparación múltiple, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Con el fin de determinar la contribución de cada uno de los componentes individuales para condicionar la capacidad de DCs humanas para polarizar células T, se cuantificó en los sobrenadantes de estos co-cultivos las citoquinas IL-17A, IFN-γ, e IL-10. Aunque las bacterias Gram negativas favorecen la generación de células T productoras de IL-17A, IFN-γ e IL-10, los

niveles fueron, en todos los casos, más bajos que los producidos por las células T generadas por hmoDC activadas con MV140 (**Figura R.63**). En el caso de la IL-10 se detectaron diferencias significativas cuando las hmoDCs se estimularon con *K. pneumoniae* y *E. coli* o con MV140 comparadas al control y la bacteria Gram positiva *S. faecalis*. Cabe destacar que las células T en presencia de hmoDCs activadas por *S. faecalis* producen niveles de IFN- γ significativamente más altos que el control pero sin producción de IL-10. Este hecho concuerda con el perfil de citoquinas que *S. faecalis* genera en las hmoDCs (**Figura R.57**). Asimismo, los niveles de TNF- α producidos por las hmoDCs estimuladas con *S. faecalis* son mayores comparándolo con el resto de las bacterias individuales y MV140.

4. Estudio de la capacidad de MV140 para activar células dendríticas totales sanguíneas

A continuación, se estudió la capacidad de MV140 para modificar el fenotipo y la función de las DCs totales (tDCs) extraídas de la sangre de los donantes sanos (**figura R.64**). Las células dendríticas sanguíneas totales contienen tanto mDCs como pDCs.

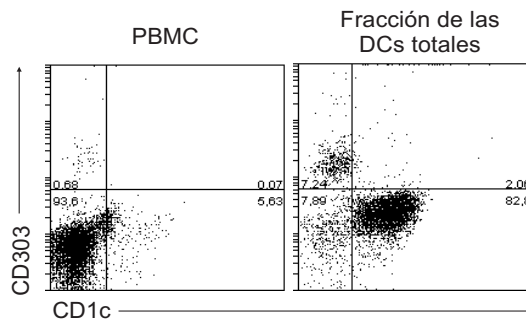


Figura R.64 Citogramas representativos de los diferentes subtipos de DCs presentes en el PBMC y la fracción de tDCs obtenidas para cada caso: pDCs: HLA-DR⁺, CD19⁻, CD303⁺; mDCs: HLA-DR⁺, CD19⁺, CD1c⁺. Ejemplo representativo de un n=3.

Las tDCs activadas con MV140 producen niveles más elevados de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 e IL-23, y TNF- α y también niveles altos de IL-10 que las tDCs estimuladas con el control (**Figura R.65**).

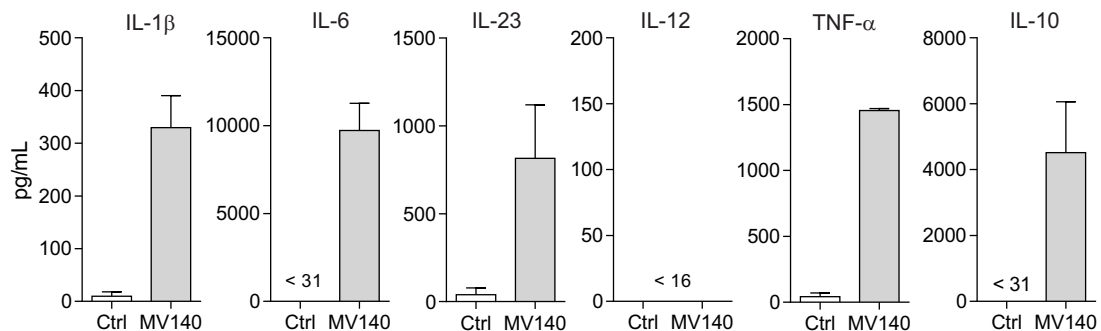


Figura R.65 Producción de citoquinas producidas por la fracción de tDCs después de 24 h de estimulación con control o MV140. Los datos representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Mediante experimentos de co-cultivo similares a los demostrados anteriormente, las tDCs estimuladas con MV140 generan células T CD4⁺ productoras de IL-17A, IFN- γ e IL-10 pero

no IL-5 (**Figura R.66**). La re-estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h confirmaron que células T generadas a partir de tDCs estimuladas con MV140 producían también niveles más elevados de IL-17A, IFN- γ e IL-10 comparadas con el control (**Figura R.66 y 67**).

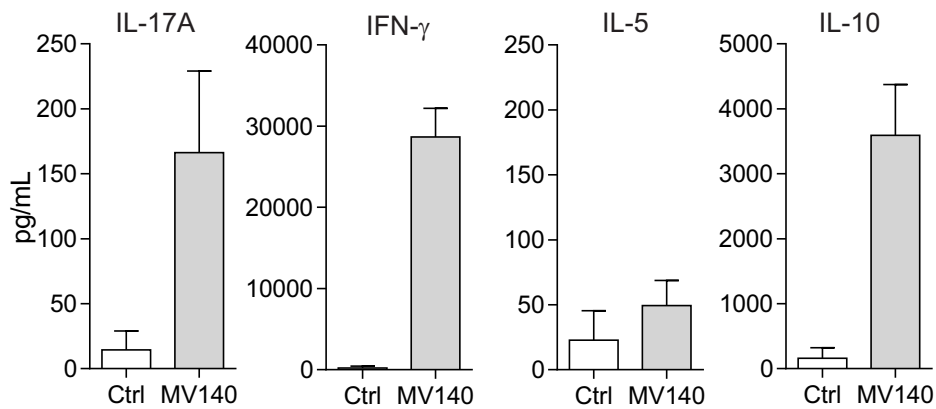


Figura R.66 Citoquinas producidas por células T CD4⁺ vírgenes alogénicas en presencia de tDCs activadas con control o MV140 tras 3 días de co-cultivo. El resultado es la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

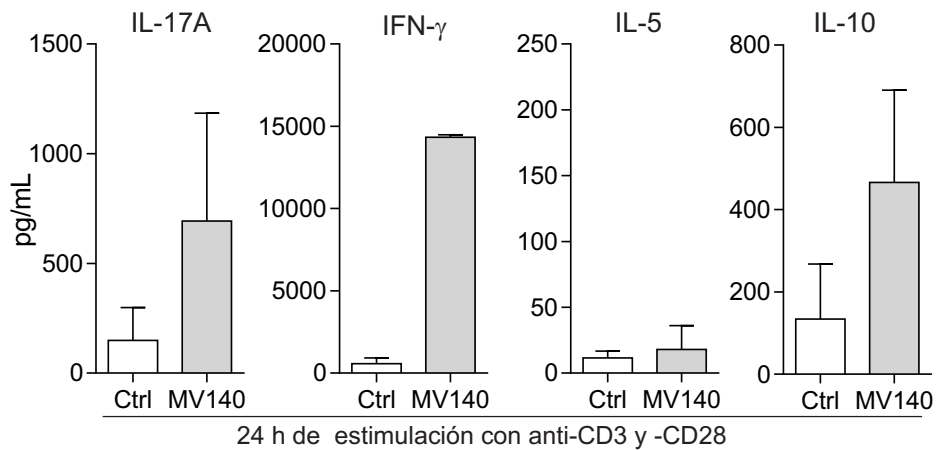


Figura R.67 Después de tres días de co-cultivo, las células T generadas se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h. Las citoquinas producidas tras la re-expansión clonal se cuantificaron por ELISA. Los resultados son la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

En resumen, estos resultados confirman que MV140 actúa directamente sobre las DCs totales humanas aisladas a partir de sangre periférica de donantes sanos. Estos resultados verifican la capacidad de MV140 para activar tDCs *ex vivo* y contribuyen a reforzar la relevancia potencial de estos resultados *in vivo*.

5. Estudios de los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de MV40 en DCs humanas

Como se ha comentado anteriormente, las DCs están equipadas con un amplio abanico de receptores de reconocimiento de patógenos, que funcionan como sensores de PAMPs, DAMPs, etc. (90, 259). La función de TLRs y CLR en el inicio de respuestas inmunes innatas y su capacidad para regular la polarización células T ha sido intensamente investigada (117, 124, 260).

Para conocer la implicación de estos receptores y sus vías de señalización en el mecanismo de acción de MV140 en las DCs, se realizaron experimentos de inhibición de Syk y MyD88, que son las principales moléculas en la iniciación de la vía de los CLR y TLR (261), respectivamente. Para ello, se emplearon piceatannol (un inhibidor farmacológico selectivo de Syk) (262, 263) y/o Pepinh-MYD (un péptido intracelular que bloquea la vía de MyD88) (242).

La producción de las citoquinas IL-1 β e IL-23 implicadas en la generación de respuestas Th17 disminuyó significativamente (en torno al 75% de inhibición) cuando las células se pre-incubaron simultáneamente con piceatannol y Pepinh-MYD. Este efecto fue promovido principalmente por piceatannol para ambas citoquinas (alrededor del 55% de inhibición) con efectos aditivos similares observados en presencia de Pepinh-MYD. Para IL-6, se apreciaron las mismas tendencias pero con porcentajes de inhibición menores (alrededor del 45%) que los producidos para IL-1 β e IL-23 (**Figura R.68**). Estos resultados sugieren que los CLR acoplados a Syk en cooperación con los TLR acoplados a MyD88 son las principales vías en las respuestas Th17 promovidas por hmoDCs activadas con MV140. Los niveles de IL-10 son bloqueados significativamente por el piceatannol (alrededor del 76% de inhibición), mientras que Pepinh-MYD induce una inhibición también significativa del 30% pero sin efectos aditivos (**Figura R.68**). Este hecho sugiere que la vía de los CLR acoplados a Syk juega un papel esencial en la producción de IL-10. En el caso de TNF- α , se observa un porcentaje de inhibición del 25% con la incubación por separado de ambos inhibidores. La incubación simultánea con ambos inhibidores produce una disminución en los niveles de TNF- α de aproximadamente un 40%, lo que sugiere la contribución de otros PRRs en la producción de esta citoquina (**Figura R.68**). Estos datos indican que los CLR juegan un papel fundamental en la producción de citoquinas por hmoDCs activados por MV140, especialmente en el caso de IL-10

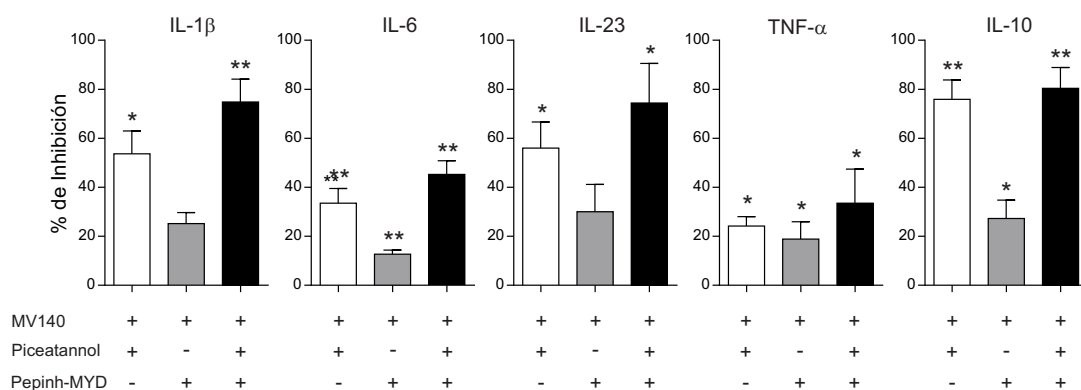


Figura R.68 Porcentajes de inhibición de la producción de IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α e IL-10 tras estimular las hmoDCs durante 4 horas con MV140 (10^7 bacterias/mL) en presencia de los inhibidores indicados y relativo al control correspondiente. Los resultados muestran la media \pm SEM de 5-10 experimentos. Test *t* Student pareada, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Estudios recientes han demostrado que puede existir una asociación y colaboración entre Syk y TLR4 tras estimulación con LPS (129, 264). MV140 está compuesta por un 75% de bacterias

Gram negativas, por tanto, tras la estimulación con MV140, CLRs y TLR4 podrían activarse vía Syk, lo que podría explicar los niveles observados con piceatannol.

En la primera parte de la Tesis se ha demostrado la implicación de TLRs acopladas a MyD88 en el mecanismo molecular de MV130. Sin embargo, la participación de MyD88 es diferente en ambas PBPs. Nuestros resultados muestran una mayor contribución de MyD88 en la generación del fenotipo y función de DCs humanas activadas con MV130 respecto a MV140. Se ha descrito que el PGN, componente fundamental de las bacterias Gram positivas es detectado por TLR2 para iniciar la cascada de señalización que es vía dependiente de MyD88 (242). Por el contrario, el LPS, característico de las bacterias Gram negativas, señala vía TLR4 de manera dependiente o independiente de MyD88 (124). La vía dependiente de MyD88 ocurre tras una breve estimulación e induce una activación temprana de NF- κ B que inicia la producción de citoquinas proinflamatorias (124). Cuando la estimulación es sostenida en el tiempo (como en el caso de MV140, que contiene un 75% de bacterias Gram negativas en su composición), TLR4 es internalizado y a través de TRAM / TRIF puede inducir una activación tardía de NF- κ B con la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto, es posible que mecanismos de acción mediados por vías de señalización TLR4 e independientes de MyD88 puedan también contribuir a los efectos observados para MV140.

6. Mecanismos de señalización de TLRs y CLRs que contribuyen en el modo de acción de MV140 en DCs

La estimulación de CLRs y TLRs inicia una cascada de señalización intracelular que culmina en la activación de NF- κ B y MAPKs, desencadenando la producción de distintos tipos de citoquinas que inician respuestas inflamatorias (265). Para estudiar como NF- κ B y MAPKs contribuyen al perfil de citoquinas producidos por las hmoDCs activadas con MV140, se llevaron a cabo experimentos de inhibición utilizando inhibidores farmacológicos específicos para distintas MAPKs: U0126 (MEK1/2), SP600125 (JNK) y SB202190 (p38); y Bay 11-7082 (NF- κ B) (**Figura R.69**).

U0126, inhibidor farmacológico específico de MEK1/2, inhibió significativamente la producción de IL-10 sin afectar la producción de otras citoquinas implicadas en la polarización de las células Th17 o Th1 (**Figura R.69**). Por otro lado, el inhibidor de JNK SP600125 inhibió significativamente la producción de TNF- α sin alterar los niveles de IL-10, IL-1 β o IL-6. La inhibición de JNK dio lugar al incremento significativo de la producción de la IL-23 por hmoDCs activadas con MV140, lo que sugiere un potencial efecto bloqueante de JNK en la generación de células Th17 (**Figura R.69**). La inhibición de p38 redujo significativamente la producción de citoquinas que polarizan respuestas Th17 y Th1, así como IL-10 en las hmoDCs activadas con MV140. La producción de IL-23 e IL-10 fue inhibida casi en su totalidad por SB202190

(inhibidor de p38). Por otro lado, Bay 11-7082, un inhibidor farmacológico de NF- κ B, disminuyó significativamente la producción de todas las citoquinas ensayadas, suprimiendo casi en su totalidad la producción de IL-23 e IL-10. A continuación, se estudió la capacidad de MV140 para inducir la activación de las distintas MAPKs y NF- κ B a nivel de proteína en células THP1 y la contribución relativa de TLRs y CLR.

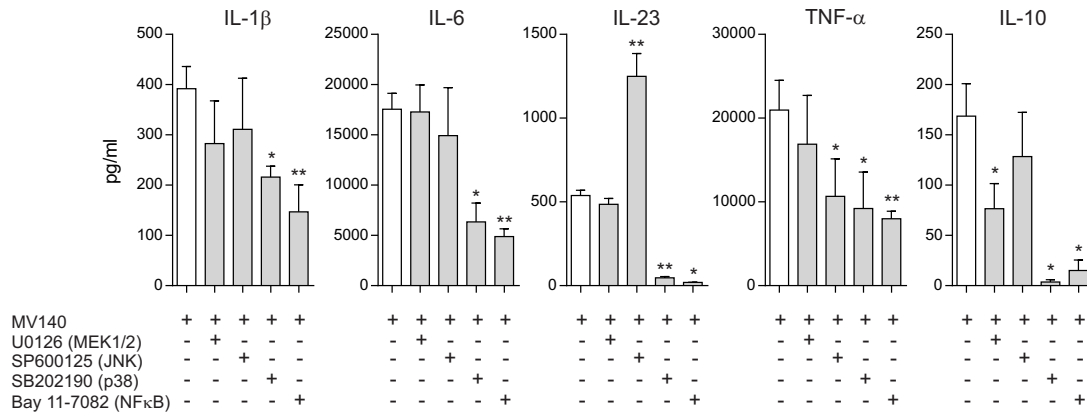


Figura R.69 MAPKs y NF- κ B contribuyen de forma diferencial a los mecanismos de acción de MV140. Producción de IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α e IL-10 por hmoDCs activadas con MV140 en presencia de los inhibidores indicados. Los resultados son media \pm SEM de 4 a 6 experimentos independientes. Test *t* Student pareada, * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001.

MV140 induce una activación rápida de MAPK ERK1/2 (fosforilación en Thr202/Tyr204), JNK (fosforilación de Thr183/Tyr185) y p38 (fosforilación de Thr180/Tyr182) así como NF- κ B determinado mediante la fosforilación del inhibidor I κ B α en Ser32/36 en células THP1 (**Figura R.70**). La activación de ERK, JNK y NF- κ B se inhibe completamente previa incubación con piceatannol y Pepinh-MYD de manera simultánea. La activación de p38 se inhibió tras la estimulación de las células THP1 por los dos inhibidores (**Figura R.70**). La señalización de CLR acoplada a Syk induce la activación de PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B e inflammasoma (132, 133, 266). Tras la estimulación de los TLRs, la vía dependiente de MyD88 culmina en la activación de MAPK (ERK, JNK y p38MAPKs) y NF- κ B (260) que regulan diferencialmente la maduración fenotípica y funcional, la producción de citoquinas y la capacidad de polarización de las células T en DC humanas (267, 268). Asimismo, NF- κ B es también un factor de transcripción crucial en el control de estas respuestas inmunes en las DCs (269, 270). Los resultados en Western Blot demuestran que NF- κ B y p38 son esenciales en las respuestas inmunes Th1/Th17 e IL-10 de las DCs humanas activadas con MV140. Sin embargo, ERK y JNK contribuyen significativamente a las respuestas de IL-10 y Th1, respectivamente. Estos datos están de acuerdo con estudios previos que muestran que p38, y en menor medida las vías de señalización JNK, regulan positivamente la maduración funcional y la producción de citoquinas en DCs humanas, mientras que ERK podría favorecer la producción de IL-10 (83, 267, 271, 272). Por último, nuestros resultados mostraron que la activación de ERK /JNK y la activación de NF- κ B, ambas mediadas por MV140, deben ser inducidas por CLR y TLRs. Otros PRRs y vías de señalización alternativas también podrían

contribuir a la activación de p38. Nuestros datos de inhibición para IL-10 e IL-23 en presencia de piceatannol sugieren que CLR y vías mediadas por Syk podrían ser indispensables para la activación funcional de esta MAPK.

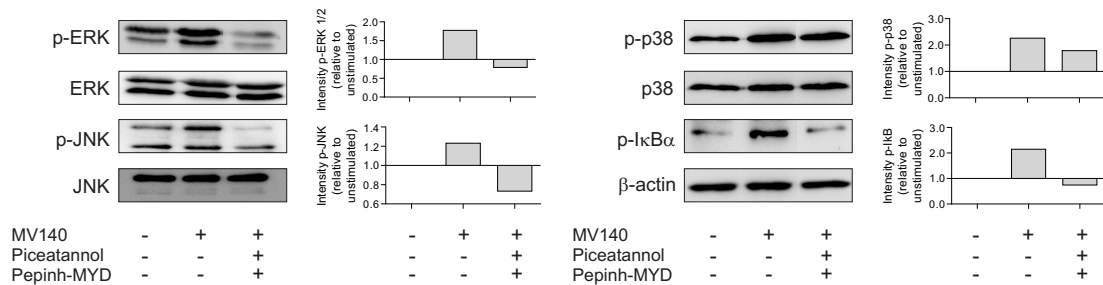


Figura R.70 Western blot de quinasas y NF-κB de extractos de proteínas de células THP1 estimuladas durante 15 min en las condiciones indicadas y cuantificación de las bandas fosforiladas reactivas mediante densitometría. Se muestra un ejemplo representativo de 3 experimentos independientes. La β-actina se usó como un control de carga.

En esta segunda parte de la Tesis, se ha dilucidado parte de los mecanismos inmunológicos por los cuales MV140 (Uromune®) podría ejercer beneficios clínicos para el tratamiento de RUTIs. Se ha demostrado que MV140 actúa directamente sobre las DCs humanas para generar respuestas Th1, Th17 y células T productoras de IL-10. Es importante recalcar que ninguno de los componentes incluidos en este PBP logró imitar completamente la respuesta final inducida por MV140, sugiriendo que se requieren todos ellos para desencadenar la respuesta inmune observada. Respecto al mecanismo molecular, MV140 actúa en las DCs humanas a través de las vías de señalización de CLR y TLRs, acoplados a Syk y MyD88 respectivamente, que culminan en la activación de distintas MAPKs (JNK, ERK y p38MAPKs) así como de NF-κB.

DISCUSSION FINAL

DISCUSIÓN FINAL

En esta Tesis Doctoral se han dilucidado a nivel molecular parte de los mecanismos inmunológicos asociados al beneficio clínico observado para las PBP_s MV130 (Bactek®) y MV140 (Uromune®) en el tratamiento de RRTIs y RUTIs (enfermedades infecciosas recurrentes del tracto respiratorio y urinario, respectivamente).

Las RRTIs y las RUTIs representan un problema muy serio de salud con una gran repercusión socioeconómica (1, 31). Algunos estudios sugieren que las infecciones recurrentes podrían estar asociadas a defectos del sistema inmune, tanto innatos como adquiridos, que alteran la capacidad de reconocer y eliminar agentes patógenos, conduciendo así al desarrollo de múltiples infecciones crónicas (55). Hasta la fecha, el tratamiento de referencia consiste en la administración repetida y prolongada de numerosos ciclos de antibióticos. Estos tratamientos han demostrado eficacia clínica y han contribuido a reducir significativamente las tasas de infecciones recurrentes. Sin embargo, existen problemas importantes asociados al uso masivo de antibióticos como, por ejemplo, el aumento de patógenos resistentes a los mismos o alteraciones significativas en la microbiota (disbiosis) lo que favorece las infecciones por hongos y bacterias (27, 53, 273). Por ello, urge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de las RRTIs y RUTIs que permitan contrarrestar los efectos nocivos de los antibióticos. En este sentido, las vacunas bacterianas administradas a través de las mucosas han despertado gran atención por parte de la comunidad científica y médica en los últimos años. El éxito de estas vacunas se debe en gran parte a su capacidad para inducir respuestas inmunes efectoras que permitan la eliminación del patógeno, generando posteriormente respuestas antiinflamatorias que contribuyen a mantener la homeostasis en la mucosa (4, 5).

Entre estas vacunas, las PBP_s administradas vía sublingual han demostrado seguridad y eficacia clínica tanto para el tratamiento de RRTIs como RUTIs. Aunque los mecanismos inmunológicos que subyacen a este beneficio clínico no se conocen con exactitud, se piensa que tanto mecanismos antígeno-específicos dirigidos frente a los componentes que constituyen las PBP_s como mecanismos no específicos podrían actuar de manera cooperativa y sinérgica (4, 5). Por un lado, las PBP_s confieren un efecto protector, evitando posibles re-infecciones, ya que son capaces de inducir una respuesta humoral rápida y específica de antígeno que puede ser dependiente o independiente de las células T (14). Por otro lado, los componentes contenidos en las PBP_s también desencadenan respuestas inespecíficas capaces de inmunomodular diferentes tipos celulares del sistema inmune innato, como por ejemplo las DCs, que contribuyen a la defensa frente a los patógenos y a la iniciación de respuestas inmunes adaptativas (75). Gracias a la cooperación entre estos dos mecanismos se logra una respuesta óptima y duradera que confiere protección al paciente y justificaría el beneficio clínico asociado al tratamiento. MV130 y MV140

son PBPs formadas por distintos tipos de bacterias enteras inactivadas por calor. Diferentes estudios sugieren que las formulaciones basadas en bacterias enteras inactivadas son capaces de inducir respuestas inmunes más potentes y eficaces que los lisados bacterianos (4, 65, 70). Recientemente se han publicado varios trabajos que contribuyen a explicar parte de los mecanismos que apoyan esta ventaja. En uno de ellos, Alsina y col. observan que si bien pacientes con deficiencias en MyD88 o IRAK4 sufren una profunda pérdida de la capacidad de respuesta frente a agonistas purificados de TLRs, las respuestas frente a bacterias enteras inactivadas se mantienen intactas (62). A pesar de los defectos en las rutas de señalización iniciadas tras la activación de TLRs, el PBMC de pacientes con deficiencias en IRAK4 o MyD88 es capaz de iniciar y mantener la expresión de genes esenciales en respuestas inflamatorias cuando se exponían a *S. pneumoniae* o *S. aureus*, demostrando que las bacterias enteras muestran una mayor capacidad de activación del sistema inmune. Por otro lado, es importante recalcar que MV130 y MV140 se administran vía sublingual. A diferencia de la administración oral, la inmunización sublingual protege a los preparados bacterianos de la degradación gastrointestinal y es capaz de inducir respuestas más potentes y duraderas (57). Además, las respuestas inmunes que se ejercen no sólo actúan de manera local en la vía sublingual, sino que también afecta a los órganos linfoides periféricos y otros tejidos distantes, como las mucosas y parénquimas respiratorios y urinarios. La mucosa sublingual contiene bajo el epitelio una red densa de DCs que juegan un papel esencial en la iniciación, mantenimiento y conexión de respuestas inmunes innatas y adaptativas (85, 256). Las DCs están equipadas con una amplia batería de PRRs (TLRs, CLRs, NLRs, RLRs, etc) para detectar prácticamente cualquier antígeno e iniciar así las respuestas inmunes adecuadas tras la internalización e integración de señales recibidas según el contexto global de reconocimiento (48).

Desde un punto de vista clínico, las propiedades inmunomoduladoras no específicas de las PBPs administradas vía sublingual es de crucial interés, no sólo porque contribuyen a prevenir futuras infecciones contra los patógenos específicos contenidos en la vacuna, sino porque además pueden jugar un papel muy relevante en la protección de los pacientes frente a infecciones desencadenadas por otros patógenos no relacionados (274). Los mecanismos inmunológicos asociados a las propiedades inmunomoduladoras de las PBPs MV130 y MV140 son totalmente desconocidos hasta la fecha. Por ello, el objetivo fundamental de esta Tesis ha sido el estudio de los mecanismos moleculares inmunológicos asociados a las propiedades inmunomoduladoras de MV130 y MV140. En particular, el trabajo se ha centrado en estudiar la capacidad de estas PBPs para inmunomodular la función de las DCs humanas, incluyendo su capacidad para polarizar células T, y determinar los mecanismos inmunológicos implicados en estos procesos a nivel molecular.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran, por primera vez, que tanto

MV130 como MV140 actúan directamente sobre DCs humanas condicionando su capacidad para generar respuestas de tipo Th1 y Th17 potencialmente implicadas en la eliminación de patógenos intracelulares y extracelulares, respectivamente. Al mismo tiempo ambas PBP's inducen la producción de elevados niveles de IL-10 por parte de DCs humanas favoreciendo la generación de células Treg productoras de IL-10 que contribuirían a crear un entorno antiinflamatorio tras las respuestas efectoras iniciales, a evitar respuestas inmunes excesivas que podrían ser perjudiciales para el organismo y a la completa eliminación del patógeno (156, 175, 178, 221). Aunque MV130 y MV140 son PBP's constituidas por bacterias enteras inactivadas por calor, es importante destacar que su composición varía significativamente tanto cualitativa como cuantitativamente. MV130 está formada por un conjunto de bacterias, en distintas proporciones, causantes del mayor número de infecciones respiratorias en Europa. El 90% de las bacterias contenidas en MV130 son Gram positivas (60% *S. pneumoniae*, 15% *S. aureus* y 15% *S. epidermidis*) y el 10% restante son Gram negativas (3% *M. catharralis*, 3% *H. influenzae* y 4% *K. pneumoniae*). Por el contrario, MV140 está formada por proporciones iguales de bacterias enteras inactivadas por calor causantes de un gran número de infecciones urinarias. Es muy importante recalcar que en el caso de MV140, el 75% las bacterias son Gram negativas (25% *E. coli*, 25% *P. vulgaris*, 25% *K. pneumoniae*) y el 25% Gram positivas (25% *S. faecalis*). Nuestros resultados demuestran que, aunque ambas PBP's generan respuestas fenotípicas y funcionales similares a nivel de DCs y células T en humanos, los mecanismos inmunológicos que conducen a estos fenotipos y funciones son diferentes dependiendo de la composición bacteriana de cada uno de los preparados. Así pues, MV130 es capaz de modular la función de las DCs actuando a través de TLRs y NLRs que señalizan por medio de MyD88 y RIPK2, respectivamente, mientras que MV140 actúa fundamentalmente vía CLR's acoplados a Syk en cooperación con TLRs que señalizan vía MyD88.

Por otro lado, es importante mencionar que probablemente otros mecanismos inmunológicos de inmunidad innata entrenada puedan estar implicados en el modo de acción de MV130 y MV140 (50, 60). Durante muchos años se ha considerado que la inmunidad innata se caracterizaba por respuestas rápidas, inespecíficas y carentes de memoria inmunológica. Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que células clásicas del sistema inmune innato, tales como monocitos, NK, macrófagos o DCs pueden adquirir cierta memoria inmunológica a través de mecanismos de reprogramación epigenética y/o metabólica tras una exposición inicial a patógenos (189, 275). Estos procesos de reprogramación tras exposición al primer patógeno, permiten que las células del sistema inmune innato desencadenen respuestas más eficaces ante nuevos contactos con ese mismo patógeno o incluso frente a otros patógenos diferentes. Esto explicaría porque la administración de OM-85 (vacuna compuesta de lisados bacterianos) puede inducir una protección cruzada frente a otros patógenos como *Salmonella typhimurium* y el virus de la gripe en ratones (276). Del mismo modo, en el ensayo clínico piloto con MV130 se observó que uno de

los pacientes participantes redujo la tasa de infecciones por herpes oral de 12 a 3 tras un año de tratamiento con MV130, lo que sugiere efectos no específicos quizá mediados por mecanismos de inmunomodulación y/o inmunidad entrenada capaces de reforzar las respuestas antivirales (14).

En resumen, nuestros datos indican que MV130 y MV140 favorecen respuestas Th1, Th17 y células T productoras de IL-10 que contribuyen a eliminar patógenos y a mantener homeostasis en el tracto respiratorio y urinario, respectivamente, y que explicarían parte de los mecanismos inmunológicos implicados en el modo de acción de estas PBP. Sin embargo, es muy relevante resaltar que nuestros resultados demuestran que los mecanismos inmunológicos implicados a nivel molecular son diferentes en cada caso y totalmente dependientes de la composición bacteriana de los preparados (**Figura D.71**). Por tanto, la traslación de este concepto molecular a la clínica diaria podría contribuir, en un futuro, a diseñar nuevas vacunas específicas en cuanto a composición bacteriana y mecanismos de acción se refiere. El conocimiento de los mecanismos inmunológicos que subyacen al modo de acción de MV130 y MV140 podría ser de gran utilidad para su utilización o para el diseño de nuevos preparados que pudieran emplearse para el tratamiento de otras patologías tales como asma, EPOC, cáncer o trasplante de órganos donde las infecciones recurrentes pueden jugar un papel determinante en el pronóstico del paciente. La utilización de estas vacunas específicas de composición y mecanismos de acción definido podría contribuir en un futuro próximo a implementar el concepto de medicina personalizada.

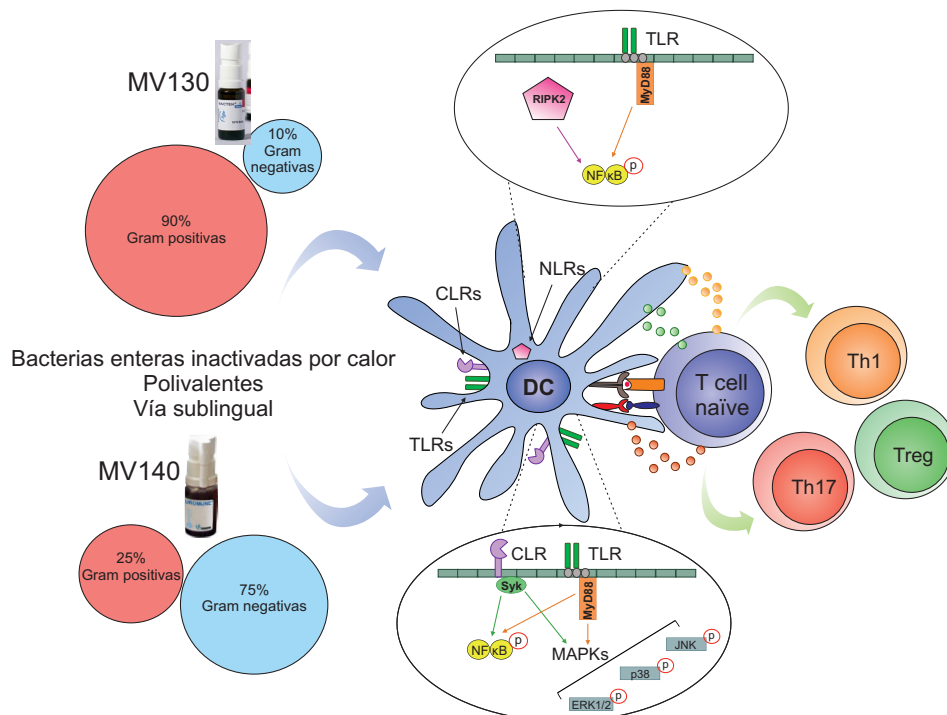


Figura D.71 Mecanismos de acción propuesto para MV130 (90% Gram positivas y 10% Gram negativas) y MV140 (25% Gram positivas y 75% Gram negativas) en DCs humanas. MV130 estimula las hmoDCs a través de TLRs acoplados a MyD88 y NLRs acoplados a RIPK2 lo que culmina en la activación de NF-κB. Sin embargo, MV140 actúa a través de CLR acoplados a Syk y TLRs acoplados a MyD88 lo que culmina en la activación de MAPKs y NF-κB en DCs humanas estimuladas con MV130 o MV140 favorecen la generación de células Th1/Th17 y Treg de IL-10 a partir de células T CD4⁺ vírgenes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. MV130 induce la activación de NF- κ B/AP-1 y la producción de IL-8 en células THP1 de manera dosis y tiempo dependientes. Las condiciones óptimas de activación son 10^7 bacterias/mL y 24 horas de incubación.
2. HmoDCs de pacientes con RRTIs y donantes sanos estimuladas con MV130 adquieren un fenotipo maduro tras 24 horas de estimulación (aumento de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD83). No se observan diferencias significativas entre hmoDCs obtenidos de pacientes y donantes sanos.
3. HmoDCs de pacientes con RRTIs y donantes sanos estimuladas con MV130 durante 24 h producen niveles de IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-12, TNF- α e IL-10 significativamente más elevados que hmoDCs estimuladas con el control y sin diferencias significativas entre ambos grupos. La IL-10 producida por las hmoDCs estimuladas con MV130 podría jugar un papel regulador evitando respuestas inmunes excesivas.
4. HmoDCs obtenidos a partir de pacientes con RRTIs e individuos sanos estimulados con MV130 inducen un aumento significativo de la proliferación de células T CD4⁺ vírgenes alogénicas con respecto al control, sin diferencias significativas entre ambos grupos. En ambos casos, hmoDCs estimuladas con MV130 promueven la generación de células T efectoras Th1, Th17 así como células Treg productoras de IL-10.
5. Los análisis de comparación global del transcriptoma de hmoDCs activadas con MV130 o control demuestran 1456 genes diferencialmente expresados con un FC>2 y una $P<0,05$ (750 genes sobre-expresados y 706 genes con expresión disminuida). En el análisis de enriquecimiento funcional mediante ontologías génicas, se observa que en la categoría de “procesos biológicos” el 50% de los genes se agruparon en tres procesos: transducción de señales, respuesta inmune y apoptosis. Además, el análisis de vías mediante KEGG muestra 10 vías diferencialmente expresadas en la condición de MV130 respecto al control.
6. MV130 estimula en hmoDCs tanto NLRs acopladas a RIPK2 como los TLRs acoplados a MyD88. Además, la citoquina antiinflamatoria IL-10 producida por hmoDCs tras estimulación con MV130 contribuye a crear un entorno antiinflamatorio tras las respuestas efectoras iniciales, evitando así respuestas inmunes excesivas que podrían ser perjudiciales para el organismo y contribuyendo a la eliminación completa de los patógenos. La estimulación con MV130 en hmoDCs modifica ciertos componentes del inflamasoma e induce la activación de caspasa 1.

7. El fenotipo maduro adquirido en hmoDCs tras la estimulación con MV130 es mediado principalmente por el conjunto de bacterias Gram positivas que componen MV130. Por el contrario, la producción de las citoquinas de hmoDCs estimulada con MV130 es llevada a cabo principalmente por las bacterias Gram negativas
8. MV140 induce la activación NF- κ B/AP-1 y la producción de IL-8 en células THP1. Las condiciones óptimas de activación son 10^7 bacterias/mL y 24 horas de incubación. La bacteria Gram positiva (*S. faecalis*) de MV140 es el único componente que no induce la activación de NF- κ B/AP-1, ni la producción de IL-8. Por lo tanto, las bacterias Gram negativas que forman MV140 (*K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. vulgaris*) son los principales componentes involucrados en estos procesos.
9. MV140 induce la maduración de hmoDCs, aumentando la expresión de marcadores de maduración (CD86 y CD83). Todos los componentes que forman MV140 contribuyen significativamente a los efectos observados.
10. HmoDCs producen un aumento en los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-12 e IL-10 después de la estimulación con MV140 comparado con el control. Tanto las bacterias Gram positivas como Gram negativas contribuyen significativamente a los efectos observados. La bacteria Gram positiva (*S. faecalis*) es el único componente productor de IL-12 pero no IL-10.
11. HmoDCs estimuladas con MV140 induce un aumento significativo de la proliferación de células T CD4⁺ vírgenes alogénicas respecto al control. HmoDCs tratadas con MV140 promueven la generación de células T efectoras Th1, Th17 así como células Treg productoras de IL-10.
12. MV140 actúa a través de las vías de señalización de CLR acoplados a Syk y TLRs acoplados a MyD88, que culminan en la activación de MAPKs y NF- κ B en DCs humanas. Los CLR, en cooperación con los TLRs, parecen ser los principales inductores de las respuestas inmunes implicadas en la generación de células Th17 y productoras de IL-10. La activación de NF- κ B y p38 inducida por MV140 es esencial para la generación de respuestas inmunes que promueven Th1, Th17 y de IL-10 por parte de las DCs humanas, mientras que JNK y ERK contribuyen significativamente a las respuestas de tipo Th1 e IL-10.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Florin TA, Plint AC, Zorc JJ. Viral bronchiolitis. *The Lancet*. 2016;389(10065):211-24.
2. Betsy Foxman. Epidemiology of Urinary Tract Infections: Incidence, Morbidity, and Economic Costs. *Am J Med* 2002;113 (Suppl 1A.): 5S-13S.
3. Burki TK. The economic cost of respiratory disease in the UK. *The Lancet Respiratory Medicine*.2017. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30108-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30108-X).
4. Sánchez-Ramón S, Diego RPd, Dieli-Crimi R, Subiza J-L. Extending the Clinical Horizons of Mucosal Bacterial Vaccines: Current Evidence and Future Prospects. *Current Drug Targets*. 2014;15(12):1132-43.
5. Marta Tejera-Alhambra, Oscar Palomares, Rebeca Pérez de Diego, Ignacio Díaz-Lezcano, Silvia Sánchez-Ramón. New Biological Insights in the Immunomodulatory Effects of Mucosal Polybacterial Vaccines in Clinical Practice. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22(00):1-10.
6. Díez-Domingo J, Pérez-Yarza EG, Melero JA, Sánchez-Luna M, Aguilar MD, Blasco AJ, et al. Social, economic, and health impact of the respiratory syncytial virus: a systematic search. *BMC Infectious Diseases*. 2014;14(544):1-14.
7. WHO. The top 10 causes of death <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. 2017.
8. Zumla A, Hui DS, Al-Tawfiq JA, Gautret P, McCloskey B, Memish ZA. Emerging respiratory tract infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(10):910-1.
9. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):16-27.
10. Janet S.M. Li, Jennifer K. Peat, Wei Xuan, and Geoffrey Berry. Meta-Analysis on the Association Between Environmental Tobacco Smoke (ETS) Exposure and the Prevalence of Lower Respiratory Tract Infection in Early Childhood. *Pediatric Pulmonology*. 1999;25:5-13.
11. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):7-20.
12. Gordon SB, Bruce NG, Grigg J, Hibberd PL, Kurmi OP, Lam K-bH, et al. Respiratory risks from household air pollution in low and middle income countries. *The Lancet Respiratory Medicine*.2014;2(10):823-60.
13. Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, et al. Viruses and Bacteria in the Etiology of the Common Cold. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):539–42.
14. Alecsandru D, Valor L, Sanchez-Ramon S, Gil J, Carbone J, Navarro J, et al. Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(1):100-7.
15. Lieberman D, Lieberman D, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Hoffman S, Ohana B, et al. Infectious etiologies in acute exacerbation of COPD. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2001;40(3):95-102.

16. Labaki WW, Martinez CH, Han MK. COPD in 2016: some answers, more questions. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2016;4(12):941-3.
17. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(12):827-35.
18. Salami O, Marsland BJ. Has the airway microbiome been overlooked in respiratory disease? *Genome Med*. 2015;7(62):1-3.
19. Huang YJ, Boushey HA. The microbiome in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(1):25-30.
20. Krause R, Moissl-Eichinger C, Halwachs B, Gorkiewicz G, Berg G, Valentin T, et al. Mycobiome in the Lower Respiratory Tract - A Clinical Perspective. *Front Microbiol*. 2016;7(2169):1-9.
21. Elenius V, Palomares O, Waris M, Turunen R, Puhakka T, Ruckert B, et al. The relationship of serum vitamins A, D, E and LL-37 levels with allergic status, tonsillar virus detection and immune response. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172350.
22. Foundation JM. Available at: <http://www.info4pi.org/> (accessed 25 February 2011).
23. Simon J, Howard SH, Sally C, Davies. Antimicrobial Resistance: A Global Challenge. *Sci Transl Med*. 2014;6(236):1-2.
24. Cannon B. Resistance fighters. *Nature*. 2014;509:S6-S8.
25. Reardon S. Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature*. 2014;8(509):141-2.
26. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(5):269-84.
27. Zowawi HM, Harris PN, Roberts MJ, Tambyah PA, Schembri MA, Pezzani MD, et al. The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. *Nat Rev Urol*. 2015;12(10):570-84.
28. Nicolle LE. Managing recurrent urinary tract infections in women. *Womens Health (Lond)*. 2005;1(1):39-50.
29. Lorenzo-Gomez MF, Padilla-Fernandez B, Garcia-Criado FJ, Miron-Canelo JA, Gil-Vicente A, Nieto-Huertos A, et al. Evaluation of a therapeutic vaccine for the prevention of recurrent urinary tract infections versus prophylactic treatment with antibiotics. *Int Urogynecol J*. 2013;24(1):127-34.
30. Dason S, Dason JT, Kapoor A. Guidelines for the diagnosis and management of recurrent urinary tract infection in women. *Can Urol Assoc J*. 2011;5(5):316-22.
31. Johansen TE, Botto H, Cek M, Grabe M, Tenke P, Wagenlehner FM, et al. Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38 Suppl:64-70.
32. Beerepoot M, Geerlings S. Non-Antibiotic Prophylaxis for Urinary Tract Infections.

Pathogens. 2016;16(5):1-8.

33. Martens E, Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics*. 2017. DOI: 10.1038/ja.2017.30.
34. Gelband H, Miller-Petrie M, Pant S, Gandra S, Levinson J, Barter D, et al. The state of the world's antibiotics 2015. 2015.
35. <https://www.weforum.org/events/world-economic-forum-annual-meeting-2017>. WEF. 2017.
36. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(1):42-51.
37. Amaral M, Guedes G, Epifanio M, Wagner M, Jones M, Mattiello R. Network meta-analysis of probiotics to prevent respiratory infections in children and adolescents. *Pediatric Pulmonology*. 2017. DOI: 10.1002/ppul.23643
38. Lhermie G, Grohn YT, Raboisson D. Addressing Antimicrobial Resistance: An Overview of Priority Actions to Prevent Suboptimal Antimicrobial Use in Food-Animal Production. *Front Microbiol*. 2016;7(2114):1-11.
39. Brown D. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(12):821-32.
40. Force TBART. The Cost of Antibiotic Resistance: Effect of Resistance Among *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* on Length of Hospital Stay Infection Control and Hospital Epidemiology. 2002;23(2):106-8.
41. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science*. 2016;352(6285):544-5.
42. Pamer EG. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*. 2016;352(6285):535-8.
43. Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*. 2015;20(4):5286-98.
44. Ruben T, Dean G B, Grant K W, John I M, Alita A M. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2015;14(8):529-42.
45. Steurer-Stey C, Bachmann LM, Steurer J, Tramèr MR. Oral Purified Bacterial Extracts in Chronic Bronchitis and COPD: Systematic Review. *Chest* 2004;126(5):1645-55.
46. Bitar MA, Saade R. The role of OM-85 BV (Broncho-Vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013;77(5):670-3.
47. Lorenzo-Gomez MF, Padilla-Fernandez B, Garcia-Cenador MB, Virseda-Rodriguez AJ, Martin-Garcia I, Sanchez-Escudero A, et al. Comparison of sublingual therapeutic vaccine with antibiotics for the prophylaxis of recurrent urinary tract infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015;5(50):1-8.

48. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 2015;16(4):343-53.
49. Sayour EJ, Mitchell DA. Manipulation of Innate and Adaptive Immunity through Cancer Vaccines. *Journal of Immunology Research.* 2017;2017(3145742):1-7.
50. Kurtz J. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 2005;26(4):186-92.
51. Hackett C. Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy Prospects and research challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2003;112(4):686-94.
52. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med.* 2005;11(4Suppl):S45-53.
53. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 2012;336(6086):1268-73.
54. Lamichhane A, Azegamia T, Kiyono H. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine.* 2014;32(49):6711-23.
55. Eva M, Carlos Alberto G. Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 2000;27(2000):305-11.
56. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology.* 2011;13(6):509-17.
57. Cuburu N, Kweon MN, Song JH, Hervouet C, Luci C, Sun JB, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine.* 2007;25(51):8598-610.
58. Parola C, Salogni L, Vaira X, Scutera S, Somma P, Salvi V, et al. Selective activation of human dendritic cells by OM-85 through a NF- κ B and MAPK dependent pathway. *PLoS One.* 2013;8(12):1-11.
59. Pasquali C, Salami O, Taneja M, Gollwitzer ES, Trompette A, Pattaroni C, et al. Enhanced Mucosal Antibody Production and Protection against Respiratory Infections Following an Orally Administered Bacterial Extract. *Front Med (Lausanne).* 2014;1:41.
60. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe.* 2011;9(5):355-61.
61. Holmgren J, Svennerholm A. Development of oral vaccines against cholera and enterotoxinogenic *Escherichia coli* diarrhea. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1990;76:47-53.
62. Alsina L, Israelsson E, Altman MC, Dang KK, Ghandil P, Israel L, et al. A narrow repertoire of transcriptional modules responsive to pyogenic bacteria is impaired in patients carrying loss-of-function mutations in MYD88 or IRAK4. *Nat Immunol.* 2014;15(12):1134-42.
63. Helen B, Clay F. Introduction to Bacterial Signals and Chemical Communication. *Chemical Reviews.* 2011;111(1):1-3.
64. Kunisawa J, Nochi T, Kiyono H. Immunological commonalities and distinctions between

airway and digestive immunity. *Trends Immunol.* 2008;29(11):505-13.

65. Negri DR, Riccomi A, Pinto D, Vendetti S, Rossi A, Cicconi R, et al. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. *Vaccine.* 2010;28(25):4175-80.
66. Nizard M, Diniz MO, Roussel H, Tran T, Ferreira LC, Badoual C, et al. Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(8):2175-87.
67. Shim BS, Choi Y, Cheon IS, Song MK. Sublingual delivery of vaccines for the induction of mucosal immunity. *Immune Netw.* 2013;13(3):81-5.
68. Rose MA. Mucosal immunization in perspective. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(7):2115-7.
69. Moingeon P, Mascarell L. Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clinical and Developmental Immunology.* 2011;2012(623474):1-8.
70. Garn H, Bahn S, Baune BT, Binder EB, Bisgaard H, Chatila TA, et al. Current concepts in chronic inflammatory diseases: Interactions between microbes, cellular metabolism, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(1):47-56.
71. Wu K, Yao R, Wang H, Pang D, Liu Y, Xu H, et al. Mucosal and systemic immunization with a novel attenuated pneumococcal vaccine candidate confer serotype independent protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Vaccine.* 2014;32(33):4179-88.
72. Tang H, Fang Z, Saborio GP, Xiu Q. Efficacy and Safety of OM-85 in Patients with Chronic Bronchitis and/or Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung.* 2015;193(4):513-9.
73. Esposito S, Marchisio P, Prada E, Daleno C, Porretti L, Carsetti R, et al. Impact of a mixed bacterial lysate (OM-85 BV) on the immunogenicity, safety and tolerability of inactivated influenza vaccine in children with recurrent respiratory tract infection. *Vaccine.* 2014;32(22):2546-52.
74. Bauer HW, Alloussi S, Egger G, Blumlein HM, Cozma G, Schulman CC, et al. A long-term, multicenter, double-blind study of an *Escherichia coli* extract (OM-89) in female patients with recurrent urinary tract infections. *Eur Urol.* 2005;47(4):542-8.
75. Benito-Villalvilla C, Cirauqui C, Diez-Rivero CM, Casanovas M, Subiza JL, Palomares O. MV140, a sublingual polyvalent bacterial preparation to treat recurrent urinary tract infections, licenses human dendritic cells for generating Th1, Th17, and IL-10 responses via Syk and MyD88. *Mucosal Immunol.* 2016. DOI: 10.1038/mi.2016.112.
76. Andreu A, I. P. Etiology of community-acquired lower urinary infections and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*: a national surveillance study. *Med Clin* 2008;130(13):481-6.
77. Novak N, Koch S, Allam JP, Bieber T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(1):50-9.
78. Hespel C, Moser M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol.* 2012;42(10):2535-43.
79. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs

- of mice: I. morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine* 1973;137(5):1142–62.
80. Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53(2 Suppl 2):S171-6.
81. Palomares O, O'Mahony L, Akdis CA. The many routes of dendritic cells to ensure immune regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(6):1541-2.
82. Oh J, Shin JS. The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance. *Immune Netw*. 2015;15(3):111-20.
83. Cohn L, Delamarre L. Dendritic cell-targeted vaccines. *Front Immunol*. 2014;5(255):1-11.
84. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
85. Novak N, Bieber T. 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(2 Suppl):S370-S4.
86. Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, Pliquet E, Horiot S, Turfkruyer M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(4):1020-30.
87. Zhou H, Wu L. The development and function of dendritic cell populations and their regulation by miRNAs. *Protein & Cell*. 2017:1-13.
88. Walsh KP, Mills KH. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol*. 2013;34(11):521-30.
89. Andres Alloatti, Fiorella Kotsias, Joao Gamelas Magalhaes, Sebastian Amigorena. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunological Reviews*. 2016;272:97-108.
90. Durand M, Segura E. The known unknowns of the human dendritic cell network. *Front Immunol*. 2015;6:129.
91. Schraml BU, Reis e Sousa C. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:13-20.
92. Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, Traidl-Hoffmann C, Cavkaytar O, Akdis M, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun*. 2014;15(8):511-20.
93. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res*. 2017;27(1):74-95.
94. Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol*. 2014;5:7.
95. Macri C, Dumont C, Johnston AP, Mintern JD. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin Transl Immunology*. 2016;5(e66):1-8.

96. Geginat J, Nizzoli G, Paroni M, Maglie S, Larghi P, Pascolo S, et al. Immunity to Pathogens Taught by Specialized Human Dendritic Cell Subsets. *Front Immunol.* 2015;6(527):1-13.
97. Veron P, Boutin S, Martin S, Chaperot L, Plumas J, Davoust J, et al. Highly efficient transduction of human plasmacytoid dendritic cells without phenotypic and functional maturation. *J Transl Med.* 2009;7:10.
98. Du W, Li J, Liu W, He Y, Yao J, Liu Y, et al. Interleukin-3 receptor α chain (CD123) is preferentially expressed in immature T-ALL and may not associate with outcomes of chemotherapy. *Tumor Biology.* 2016;37(3):3817-21.
99. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(3388–3393).
100. Ruiter B, Shreffler WG. The role of dendritic cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):921-8.
101. Palomares O, Ruckert B, Jartti T, Kucuksezer UC, Puhakka T, Gomez E, et al. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(2):510-20, 20 e1-9.
102. Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood.* 2010;115(26):5366-75.
103. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(6):392-404.
104. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor α . *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-18.
105. Qu C, Brinck-Jensen NS, Zang M, Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int J Infect Dis.* 2014;19:1-5.
106. Sallusto F, Lanzavecchia A. Monocytes join the dendritic cell family. *Cell.* 2010;143(3):339-40.
107. Marina Celia, Federica Sallusto, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology.* 1997;9:10-6.
108. Bell SJ, Rigby R, English N, Mann SD, Knight SC, Kamm MA, et al. Migration and Maturation of Human Colonic Dendritic Cells. *The Journal of Immunology.* 2001;166(8):4958-67.
109. Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.* 2007;28(5):227-33.
110. Hammer GE, Ma A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:743-91.
111. Wu X, Gao H, Bleday R, Zhu Z. Homeobox transcription factor VentX regulates

- differentiation and maturation of human dendritic cells. *J Biol Chem.* 2014;289(21):14633-43.
112. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of Interleukin 10–Producing, Nonproliferating Cd4+ T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *T* 192(9), 1213–1222. *The Journal of Experimental Medicine.* 2000;192(9):1213-22.
113. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(6):476-83.
114. Wei Chen, Xueqing Liang, Amanda J. Peterson, David H. Munn, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol.* 2008;181(8):5396–404.
115. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 2007;204(1):105-15.
116. Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2015;7(1):1-18.
117. Iborra S, Sancho D. Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors. *Immunobiology.* 2015;220(2):175-84.
118. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):10.
119. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-73.
120. Krachler AM, Woolery AR, Orth K. Manipulation of kinase signaling by bacterial pathogens. *J Cell Biol.* 2011;195(7):1083-92.
121. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980;287(5785):795-801.
122. Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, Pugin J. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood.* 2007;109(4):1574-83.
123. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(5):979-87.
124. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
125. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):546-58.
126. Netea MG, Wijmenga C, O’Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol.* 2012;13(6):535-42.
127. Arnold-Schrauf C, Berod L, Sparwasser T. Dendritic cell specific targeting of MyD88 signalling pathways *in vivo*. *Eur J Immunol.* 2015;45(1):32-9.

-
128. Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific Inhibition of MyD88-Independent Signaling Pathways of TLR3 and TLR4 by Resveratrol: Molecular Targets Are TBK1 and RIP1 in TRIF Complex. *The Journal of Immunology*. 2005;175(5):3339-46.
129. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Bae YS. The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *Br J Pharmacol*. 2012;167(5):990-9.
130. Wei Hu1, Aakanksha Jain, Yajing Gao, Igor M. Dozmorov, Rajakumar Mandraju, Edward K. Wakeland, et al. Differential outcome of TRIF-mediated signaling in TLR4 and TLR3 induced DC maturation. *PNAS*. 2015;112(45):13994-9.
131. Kolli D, Velayutham TS, Casola A. Host-Viral Interactions: Role of Pattern Recognition Receptors (PRRs) in Human Pneumovirus Infections. *Pathogens*. 2013;2(2):232-63.
132. Kerrigan AM, Brown GD. Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol*. 2011;32(4):151-6.
133. Sancho D, Reis e Sousa C. Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(1):46-52.
134. Yan H, Kamiya T, Suabjakyong P, Tsuji NM. Targeting C-Type Lectin Receptors for Cancer Immunity. *Front Immunol*. 2015;6(408):1-9.
135. Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:491-529.
136. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*. 2006;7(12):1258-65.
137. Whitney PG, Bar E, Osorio F, Rogers NC, Schraml BU, Deddouche S, et al. Syk signaling in dendritic cells orchestrates innate resistance to systemic fungal infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(7):1-15.
138. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21(4):317-37.
139. Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*. 2009;227(1):106-28.
140. Elinav E, Strowig T, Henao-Mejia J, Flavell RA. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity*. 2011;34(5):665-79.
141. Vieira SM, Cunha TM, Franca RF, Pinto LG, Talbot J, Turato WM, et al. Joint NOD2/RIPK2 signaling regulates IL-17 axis and contributes to the development of experimental arthritis. *J Immunol*. 2012;188(10):5116-22.
142. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*. 2016;57(1):5-14.
143. Gurung P, Kanneganti TD. Immune responses against protozoan parasites: a focus on the emerging role of Nod-like receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(16):3035-51.
144. Nachbur U, Stafford CA, Bankovacki A, Zhan Y, Lindqvist LM, Fiil BK, et al. A RIPK2

- inhibitor delays NOD signalling events yet prevents inflammatory cytokine production. *Nat Commun.* 2015;6(6442):1-13.
145. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(1):9-20.
146. Liu D, Rhebergen AM, Eisenbarth SC. Licensing Adaptive Immunity by NOD-Like Receptors. *Front Immunol.* 2013;4(486).
147. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010;140(6):821-32.
148. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015;21(7):677-87.
149. Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6(262):1-9.
150. Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol.* 2010;30(5):628-31.
151. Oshiumi H, Kouwaki T, Seya T. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response. *Front Immunol.* 2016;7(200):1-6.
152. Murshid A, Borges TJ, Lang BJ, SK. C. The Scavenger Receptor SReC-i Cooperates with Toll-Like Receptors to Trigger inflammatory innate immune Responses. *Frontiers in Immunology.* 2016;7(226):1-5.
153. Jonathan H. Esensten, Ynes A. Helou, Gaurav Chopra, Arthur Weiss, A. J. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity.* 2016;44(4):973-88.
154. Weifeng Liu, C. S, Zang. AX. Co-stimulate or Co-inhibit Regulatory T Cells, Which Side to Go. *Immunological Investigations.* 2016;45(8):813-31.
155. Burgler S, Mantel PY, Bassin C, Ouaked N, Akdis CA, Schmidt-Weber CB. RORC2 is involved in T cell polarization through interaction with the FOXP3 promoter. *J Immunol.* 2010;184(11):6161-9.
156. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:317-34.
157. Sallusto F, Monticelli S. The many faces of CD4 T cells: roles in immunity and disease. *Semin Immunol.* 2013;25(4):249-51.
158. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):149-63.
159. Wang YH, Voo KS, Liu B, Chen CY, Uygungil B, Spoede W, et al. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med.* 2010;207(11):2479-91.
160. Bai H, Cheng J, Gao X, Joyee AG, Fan Y, Wang S, et al. IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *J Immunol.* 2009;183(9):5886-95.

161. Boniface K, Blumenschein WM, Brovont-Porth K, McGeachy MJ, Basham B, Desai B, et al. Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. *J Immunol*. 2010;185(1):679-87.
162. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25(4):305-12.
163. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):984-1010.
164. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):838-48.
165. Palomares O. The Role of Regulatory T Cells in IgE-Mediated Food Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(6):371-82.
166. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(4):735-46; quiz 47-8.
167. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature*. 2012;484(7395):514-8.
168. Wang Z, Friedrich C, Hagemann SC, Korte WH, Goharani N, Cording S, et al. Regulatory T cells promote a protective Th17-associated immune response to intestinal bacterial infection with *C. rodentium*. *Mucosal Immunol*. 2014;7(6):1290-301.
169. Kumar P, Chen K, Kolls JK. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(3):373-80.
170. Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol*. 2009;2(5):403-11.
171. Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Basinski TM, Mantel PY, Siegmund K, et al. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(3):588-95, 95 e1-7.
172. Sallusto F, Zielinski CE, Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur J Immunol*. 2012;42(9):2215-20.
173. van den Berg WB, McInnes IB. Th17 cells and IL-17 a--focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;43(2):158-70.
174. Rathore JS, Wang Y. Protective role of Th17 cells in pulmonary infection. *Vaccine*. 2016;34(13):1504-14.
175. Wawrzyniak M, O'Mahony L, Akdis M. Role of Regulatory Cells in Oral Tolerance. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017;9(2):107-15.
176. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.

177. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008;453(7198):1051-7.
178. Akdis M, Palomares O, van de Veen W, van Splunter M, Akdis CA. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(6):1438-49; quiz50-1.
179. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*. 2006;117(4):433-42.
180. Song X, He X, Li X, Qian Y. The roles and functional mechanisms of interleukin-17 family cytokines in mucosal immunity. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(4):418-31.
181. Sirvent S, Soria I, Cirauqui C, Cases B, Manzano AI, Diez-Rivero CM, et al. Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(2):558-67 e11.
182. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *European Journal of Immunology*. 2010;40(5):1232-40.
183. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.
184. Noecker C, McNally CP, Eng A, Borenstein E. High-resolution characterization of the human microbiome. *Transl Res*. 2017;179:7-23.
185. Florent Ginhoux, Andreas Schlitzer. CD11b+ DCs rediscovered: implications for vaccination. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(4):445-7.
186. Hoffmann J, Schmitt M, Ni M, Schmitt A. Next-generation dendritic cell-based vaccines for leukemia patients. *Immunotherapy*. 2017;9(2):173-81.
187. Barallobre-Barreiro J, Chung Y-L, Mayr M. La proteómica y la metabolómica: los mecanismos de la enfermedad cardiovascular y el descubrimiento de biomarcadores. *Revista Española de Cardiología*. 2013;66(8):657-61.
188. Wang H, Zheng H, Wang J, Wang C, Wu FX. Integrating Omics Data With a Multiplex Network-Based Approach for the Identification of Cancer Subtypes. *IEEE Transactions on NanoBioscience*. 2016;15(4):335-42.
189. Banchereau R, Baldwin N, Cepika AM, Athale S, Xue Y, Yu CI, et al. Transcriptional specialization of human dendritic cell subsets in response to microbial vaccines. *Nat Commun*. 2014;5(5283):1-14.
190. Tebani A, Abily-Donval L, Afonso C, Marret S, Bekri S. Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
191. Hauptmann M, Schaible UE. Linking microbiota and respiratory disease. *FEBS Lett*. 2016;590(21):3721-38.
192. Brown RL, Clarke TB. The regulation of host defences to infection by the microbiota.

Immunology. 2017;150(1):1-6.

193. Cyndi Goh, Julian C Knight. Enhanced understanding of the host–pathogen interaction in sepsis: new opportunities for omic approaches. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2017;5(3):212-23.
194. Rebollar EA, Antwis RE, Becker MH, Belden LK, Bletz MC, Brucker RM, et al. Using “Omics” and Integrated Multi-Omics Approaches to Guide Probiotic Selection to Mitigate Chytridiomycosis and Other Emerging Infectious Diseases. *Front Microbiol*. 2016;7:68.
195. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and Cell Biology*. 1999;77:499-508.
196. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*. 2003;275(1-2):251-5.
197. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
198. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*. 2001;125(1-2):279-84.
199. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W478-83.
200. Pedro C-S, Monica C, Francisco T, JoseM C, Alberto P-M. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. 2006.
201. Da Wei H, Brad T S, Richard A L. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. 2008.
202. Mascarell L, Lombardi V, Louise A, Saint-Lu N, Chabre H, Moussu H, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(3):603-9 e5.
203. Kucuksezer UC, Palomares O, Ruckert B, Jarthi T, Puhakka T, Nandy A, et al. Triggering of specific Toll-like receptors and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):875-85.
204. Moingeon P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: practical implications for the clinician. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(3):228-41.
205. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. 2013;12(86):1-15.
206. Zhang L, Shao L, Creighton CJ, Zhang Y, Xin L, Ittmann M, et al. Function of phosphorylation of NF- κ B p65 ser536 in prostate cancer oncogenesis. *Oncotarget*. 2015;20(6):6281-94.
207. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
208. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of

- monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
209. Breton G, Zheng S, Valieris R, Tojal da Silva I, Satija R, Nussenzweig MC. Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c+ or CD141+ DCs. *J Exp Med*. 2016;213(13):2861-70.
210. Angelina A, Sirvent S, Palladino C, Vereda A, Cuesta-Herranz J, Eiwegger T, et al. The lipid-interaction capacity of Sin a 2 and Ara h 1, major mustard and peanut allergens of the cupin superfamily, endorses allergenicity. *Allergy*. 2016;71(9):1284-94.
211. Striz I, Brabcova E, Kolesar L, Sekerkova A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(9):593-612.
212. Fedele G, Spensieri F, Palazzo R, Nasso M, Cheung GY, Coote JG, et al. Bordetella pertussis commits human dendritic cells to promote a Th1/Th17 response through the activity of adenylate cyclase toxin and MAPK-pathways. *PLoS One*. 2010;5(1):e8734.
213. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, Kool M, et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med*. 2010;207(10):2097-111.
214. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(9):585-600.
215. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):701-21 e1-70.
216. Abdi K, Singh NJ. Making many from few: IL-12p40 as a model for the combinatorial assembly of heterodimeric cytokines. *Cytokine*. 2015;76(1):53-7.
217. Demont A, Hacini-Rachinel F, Doucet-Ladeveze R, Ngom-Bru C, Mercenier A, Prioult G, et al. Live and heat-treated probiotics differently modulate IL10 mRNA stabilization and microRNA expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(4):1264-7 e1-10.
218. Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):215-25.
219. Luan H, Zhang Q, Wang L, Wang C, Zhang M, Xu X, et al. OM85-BV induced the productions of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha via TLR4- and TLR2-mediated ERK1/2/NF-kappaB pathway in RAW264.7 cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2014;34(7):526-36.
220. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 2008;180(9):5771-7.
221. Soerens AG, Da Costa A, Lund JM. Regulatory T cells are essential to promote proper CD4 T-cell priming upon mucosal infection. *Mucosal Immunol*. 2016;9(6):1395-406.
222. Moffitt KL, Malley R, Lu YJ. Identification of protective pneumococcal T(H)17 antigens from the soluble fraction of a killed whole cell vaccine. *PLoS One*. 2012;7(8):e43445.
223. Olliver M, Hiew J, Mellroth P, Henriques-Normark B, Bergman P. Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2011;79(10):4210-7.

224. Peres AG, Madrenas J. The broad landscape of immune interactions with *Staphylococcus aureus*: from commensalism to lethal infections. *Burns*. 2013;39(3):380-8.
225. Frodermann V, Chau TA, Sayedyahosseini S, Toth JM, Heinrichs DE, Madrenas J. A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2011;204(2):253-62.
226. Hemont C, Neel A, Heslan M, Braudeau C, Josien R. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol*. 2013;93(4):599-609.
227. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2006;107(6):2423-31.
228. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*. 2005;202(1):135-43.
229. Day SL, Ramshaw IA, Ramsay AJ, Ranasinghe C. Differential Effects of the Type I Interferons α , β , and γ on Antiviral Activity and Vaccine Efficacy. *The Journal of Immunology*. 2008;180(11):7158-66.
230. Zhang B, Chassaing B, Shi Z, Uchiyama R, Zhang Z, Denning TL, et al. Viral infection. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4-mediated production of IL-22 and IL-18. *Science*. 2014;346(6211):861-5.
231. Rabe H, Nordstrom I, Andersson K, Lundell AC, Rudin A. *Staphylococcus aureus* convert neonatal conventional CD4(+) T cells into FOXP3(+) CD25(+) CD127(low) T cells via the PD-1/PD-L1 axis. *Immunology*. 2014;141(3):467-81.
232. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MA, Ng DC, Slack E, Hapfelmeier S, et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*. 2011;34(5):794-806.
233. Pasquali C, Salami O, Taneja M, Gollwitzer ES, Trompette A, Pattaroni C, et al. Enhanced Mucosal Antibody Production and Protection against Respiratory Infections Following an Orally Administered Bacterial Extract. *Front Med* 2014;1(41):1-9.
234. Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol*. 2009;30(12):592-602.
235. Knosp CA, Johnston JA. Regulation of CD4+ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. *Immunology*. 2012;135(2):101-11.
236. von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarria-Smith J, Vance RE. Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:73-106.
237. Langlet C, Springael C, Johnson J, Thomas S, Flamand V, Leitges M, et al. PKC- α controls MYD88-dependent TLR/IL-1R signaling and cytokine production in mouse and human dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(2):505-15.
238. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-5.

239. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-Like Receptor 4, But Not Toll-Like Receptor 2, Is a Signaling Receptor for Escherichia and Salmonella Lipopolysaccharides. *The Journal of Immunology*. 2000;165(10):5780-7.
240. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting Edge: Recognition of Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune System Occurs Via Toll-Like Receptor 2. *The Journal of Immunology*. 1999;163(1):1-5.
241. Broad A, Kirby JA, Jones DE, Applied I, Transplantation Research G. Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production. *Immunology*. 2007;120(1):103-11.
242. Toshchakov VU, Basu S, Fenton MJ, Vogel SN. Differential Involvement of BB Loops of Toll-IL-1 Resistance (TIR) Domain-Containing Adapter Proteins in TLR4- versus TLR2-Mediated Signal Transduction. *The Journal of Immunology*. 2005;175(1):494-500.
243. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science*. 2003;301(5633):640-3.
244. Moreira LO, El Kasmi KC, Smith AM, Finkelstein D, Fillon S, Kim YG, et al. The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol*. 2008;10(10):2067-77.
245. Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I κ B α -independent NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(41):34538-47.
246. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(4):519-23.
247. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36426-32.
248. Stanic B, van de Veen W, Wirz OF, Ruckert B, Morita H, Sollner S, et al. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):771-80 e8.
249. Guo B. IL-10 Modulates Th17 Pathogenicity during Autoimmune Diseases. *J Clin Cell Immunol*. 2016;7(2):1-15.
250. Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, Yoshida R, Hashimoto M, Takimoto T, et al. Selective Expansion of Foxp3-Positive Regulatory T Cells and Immunosuppression by Suppressors of Cytokine Signaling 3-Deficient Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 2007;179(4):2170-9.
251. Yoshimura A, Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2012;3:20.
252. Arce-Sillas A, Alvarez-Luquin DD, Tamaya-Dominguez B, Gomez-Fuentes S, Trejo-Garcia A, Melo-Salas M, et al. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *J Immunol Res*. 2016;2016:1720827.

253. Kubo M, Hanada T, A. Y. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nature Immunology*. 2003;4(12):1169-76.
254. Boontanrart M, Hall SD, Spanier JA, Hayes CE, Olson JK. Vitamin D3 alters microglia immune activation by an IL-10 dependent SOCS3 mechanism. *J Neuroimmunol*. 2016;292:126-36.
255. Wang J, Roderiquez G, Norcross MA. Control of adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1, and TLR2. *Sci Rep*. 2012;2:606.
256. Belkaid Y, Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity*. 2008;29(3):362-71.
257. Christina Hesse, Bengt Andersson, Wold AE. Gram-Positive Bacteria Are Potent Inducers of Monocytic Interleukin-12 (IL-12) while Gram-Negative Bacteria Preferentially Stimulate IL-10 Production. *Infection and Immunity*. 2000;68(6):3581-6.
258. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol*. 2007;19(6):377-82.
259. Iijima N, Thompson JM, Iwasaki A. Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol*. 2008;1(6):451-9.
260. Rosadini CV, Kagan JC. Microbial strategies for antagonizing Toll-like-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:61-70.
261. Geahlen RL. Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(8):414-22.
262. Ashikawa K, Majumdar S, Banerjee S, Bharti AC, Shishodia S, Aggarwal BB. Piceatannol Inhibits TNF-Induced NF- κ B Activation and NF- κ B-Mediated Gene Expression Through Suppression of I κ B Kinase and p65 Phosphorylation. *The Journal of Immunology*. 2002;169(11):6490-7.
263. Masao T, Akemi U, Shigenobu A, Hitoshi M. Effect of Piceatannol in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells In Vitro. 2005;94(5):974-82.
264. Chaudhary A, Fresquez TM, Naranjo MJ. Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(3):249-56.
265. Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci*. 2006;42(1):1-11.
266. Krisenko MO, Geahlen RL. Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(1):254-63.
267. Ott PA, Adams S. Small-molecule protein kinase inhibitors and their effects on the immune system: implications for cancer treatment. *Immunotherapy*. 2011;3(2):213-27.
268. Takeshi Nakahara, Yoichi Moroi, Hiroshi Uchi, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *Journal of Dermatological Science*. 2006;42(1):1-11.

269. Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, Imanishi T, Xue L, Morris SW, et al. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2007;8(6):619-29.
270. Slack EC, Robinson MJ, Hernanz-Falcón P, Brown GD, Williams DL, Schweighoffer E, et al. Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol.* 2007;37(6):1600-12.
271. Lin YL, Liang YC, Lee SS, BL. C. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Leukoc Biol.* 2005;78(2):533-43.
272. Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Y. M. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol.* 2004;16(12):1701-9.
273. Martinez JL, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Ups J Med Sci.* 2014;119(2):68-77.
274. Zhang M, Luan H, Zhang Q, Wang L, Lv YM, He F, et al. Prevention of infection in immunosuppressive patients with autoimmune nephrosis by using an immunostimulating bacterial lysate Broncho-vaxom. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8(12):1802-7.
275. Garaude J, Acin-Perez R, Martinez-Cano S, Enamorado M, Ugolini M, Nistal-Villan E, et al. Mitochondrial respiratory-chain adaptations in macrophages contribute to antibacterial host defense. *Nat Immunol.* 2016;17(9):1037-45.
276. Wolfgang G, Besslera, Ulrich vor dem Eschea, Noel Masihib. The bacterial extract OM-85 BV protects mice against Influenza and Salmonella infection. *International Immunopharmacology.* 2010;10(9):1086-90.

ANEXOS

Research Article

Human dendritic cells activated with MV130, a polybacterial preparation to treat recurrent respiratory tract infections, induce Th1, Th17 and IL-10 responses via RIPK2 and MyD88

Cristina Cirauqui¹, Cristina Benito-Villalvilla¹, Silvia Sánchez-Ramón^{2, 3}, Sofía Sirvent¹, Carmen M. Díez-Rivero⁴, Lourdes Hernández-Cillero^{2,5}, Juliana Lucía Ochoa², Beatriz Pérez-Villami⁵, José Luis Subiza^{2,3,4}, Oscar Palomares¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Chemistry, Complutense University, Madrid, Spain

²Department of Immunology, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

³Dpt. of Microbiology I-Immunology, School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

⁴Inmunotek S.L., Madrid, Spain

⁵Genomics and Microarray Laboratory, Department of Medical Oncology, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

Recurrent respiratory tract infections (RRTIs) are the first leading cause of community- and nosocomial-acquired infections. Antibiotics remain the mainstay of treatment, enhancing the potential to develop antibiotic resistances. Therefore, the development of new alternative approaches to prevent and treat RRTIs is highly demanded. Daily sublingual administration of the whole heat-inactivated polybacterial preparation (PBP) MV130 significantly reduced the rate of respiratory infections in RRTIs patients, however, the immunological mechanisms of action remain unknown. Herein, we studied the capacity of MV130 to immunomodulate the function of human dendritic cells (DCs) as a potential mechanism that contribute to the clinical benefits. We demonstrated that dendritic cells from RRTIs patients and healthy controls display similar *ex vivo* immunological responses to MV130. By combining systems biology and functional immunological approaches we showed that MV130 promotes the generation of Th1/Th17 responses via receptor-interacting serine/threonine-protein kinase-2 (RIPK2)- and myeloid-differentiation primary-response gene-88 (MyD88)-mediated signalling pathways under the control of IL-10. *In vivo* BALB/c mice sublingually immunized with MV130 display potent systemic Th1/Th17 and IL-10 responses. We elucidated immunological mechanisms underlying the potential way of action of MV130, which might help to design alternative treatments in other clinical conditions with high risk of recurrent infections.

Keywords: Recurrent respiratory tract infections (RRTIs), whole heat-inactivated polybacterial vaccines, dendritic cells (DCs), Th1 cells, Th17 cells, IL-10-producing T cells, receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIPK2), Myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLRs), Toll-like receptor (TLR).

Introduction

Patients suffering from recurrent respiratory tract infections (RRTIs) pose a major health-care problem with significant morbidity and mortality affecting both children and adults, representing an important economic burden in Europe and USA [1-4]. RRTIs require repeated and prolonged antibiotic cycles, further increasing the

risk to develop antibiotic resistances [3, 5-7]. Humankind is entering into a “post-antibiotic era” with limited treatment options that are causing many deaths yearly due to life-threatening resistant pathogens [8, 9]. Negative factors associated to the overuse of antibiotics also include deleterious effects for the normal microbiome, which favour pathogen invasion and subsequent bacterial and fungal superinfections [10, 11]. There is an urgent need for new alternative approaches to antibiotics for the prevention and treatment of RRTIs. Different types of mucosal bacterial vaccines have received a lot of attention over the last years as they significantly reduce the rate of infections in RRTIs patients [3, 4, 12-14]. Bacterial vaccines containing soluble antigens (bacterial lysates) administered through the oral route were initially used to treat and prevent RRTIs [3, 12, 15, 16]. More recently, polybacterial preparations (PBP) based on

whole inactivated components and delivered through the sublingual route have been also studied as novel alternatives [3, 14]. The sublingual PBP MV130 (Bactek) is one of these vaccines. MV130 is composed of different proportions of whole heat-inactivated Gram-positive and –negative bacteria often present in the nasal mucosa and causing the majority of upper and lower respiratory infections in Europe (60% *Streptococcus pneumoniae*, 15% *Staphylococcus aureus*, 15% *Staphylococcus epidermidis*, 4% *Klebsiella pneumoniae*, 3% *Moraxella catarrhalis* and 3% *Haemophilus influenzae*) [14]. Clinical data showed that MV130 significantly reduced the rate of infections in RRTIs patients, however, the immunological ways of action remain elusive [3, 4, 14]. Both specific and nonspecific mechanisms might well be involved in the observed clinical benefits [3, 15-17]. In this study we exclusively focused on the capacity

Table 1. Epidemiological and clinical features of studied patients

Patient No.	Sex (F/M)	Age (yrs)	Main Diagnosis	Routine Therapy	Infectious history	Frequency (episodes/yr)
# 1	F	39	Lymphangioliomyomatosis MGUS	None.	URTIs since infancy. LRTIs Bilateral pneumonia in 2014. RUTIs since puberty. Bacteriemia in 2014	5 5 3
# 2	F	74	Recurrent respiratory tract infections. Asthma	Inhaled fluticasone-salmeterol.	URTIs LRTIs	10 10
# 3	F	49	Selective IgA deficiency. Deficit of antibody production Coeliac disease	None	URTIs since infancy. LRTIs since infancy	7
# 4	M	69	Recurrent respiratory tract infections MGUS	Tiotropium, lorazepam, caffeine citrate, nitroglycerin, low dose aspirin.	LRTIs	10
# 5	F	35	Rinoconjunctivitis-allergic asthma Pituitary microadenoma	Inhaled fluticasone-salmeterol	Meningitis at age 3 URTIs Three previous pneumoniae	5
# 6	F	64	Rheumatoid arthritis	Prednisone (10 mg/day)	URTIs LRTIs Pneumonia in 2009 y 2013	3 3
# 7	F	38	Androgen insensitivity syndrome. Low IgM	Oestradiol / norgestrel	URTIs LRTIs Two pneumoniae episodes in 2013 and 2014	5 3
# 8	F	34	Common variable immunodeficiency Bronchiectasis	IVIG (0,6g/kg/month)	URTIs LRTIs	3 3
# 9	F	57	Bronchoneumopathy chronic obstructive	None	URTIs	3

LRTI: Lower Respiratory Tract Infection (bronchitis and pneumonia); URTI: Upper Respiratory Tract Infection; RUTI: Recurrent Urinary Tract Infection. MGUS: monoclonal gammopathy of unknown significance. IVIG: intravenous immunoglobulin.

of MV130 to immunomodulate human dendritic cells (DCs) as potential antigen-independent mechanisms contributing to the clinical benefits. We report that DCs from RRTIs patients and healthy controls display similar *ex vivo* immunological responses to MV130. By combining systems biology and immunological functional experiments, we showed that MV130 imprints human DCs with the capacity to generate Th1, Th17 and IL-10-producing T cells via receptor-interacting serine/threonine-protein kinase-2 (RIPK2)- and myeloid-differentiation primary-response gene-88 (MyD88)-mediated signaling pathways under the control of IL-10. *In vivo* data revealed that sublingual immunization of BALB/c mice promotes potent systemic Th1/Th17 and IL-10 responses. Our results provide novel insights into the immunomodulatory capacity of MV130 on human DCs as a potential mechanism that in cooperation with antigen-specific responses might well contribute to the reported clinical benefits in patients suffering from RRTIs. This study also uncovered that the employed methodology constitute a suitable strategy to elucidate

immunological pathways activated by specific PBPs at the molecular level, which might well pave the way to develop more rational patient-tailored treatments for many other clinical conditions at high risk of recurrent infections.

Results

MV130-activated human DCs from RRTIs patients and healthy subjects produce pro-inflammatory cytokines with high levels of IL-10

Nine patients suffering from RRTIs (8 females and 1 male, mean age 52 ± 5 ; range 35-73) referred to the Clinical Immunology Unit, Hospital Clínico San Carlos of Madrid and nine healthy controls (8 females and 1 male, mean age 35 ± 4 ; range 22-51) were recruited. All the patients included in the study had suffered RRTIs defined as three or more episodes of upper or lower respiratory tract infections or one pneumonia episode per year for more than one year. None of the patients had previously received MV130 treatment. The detailed

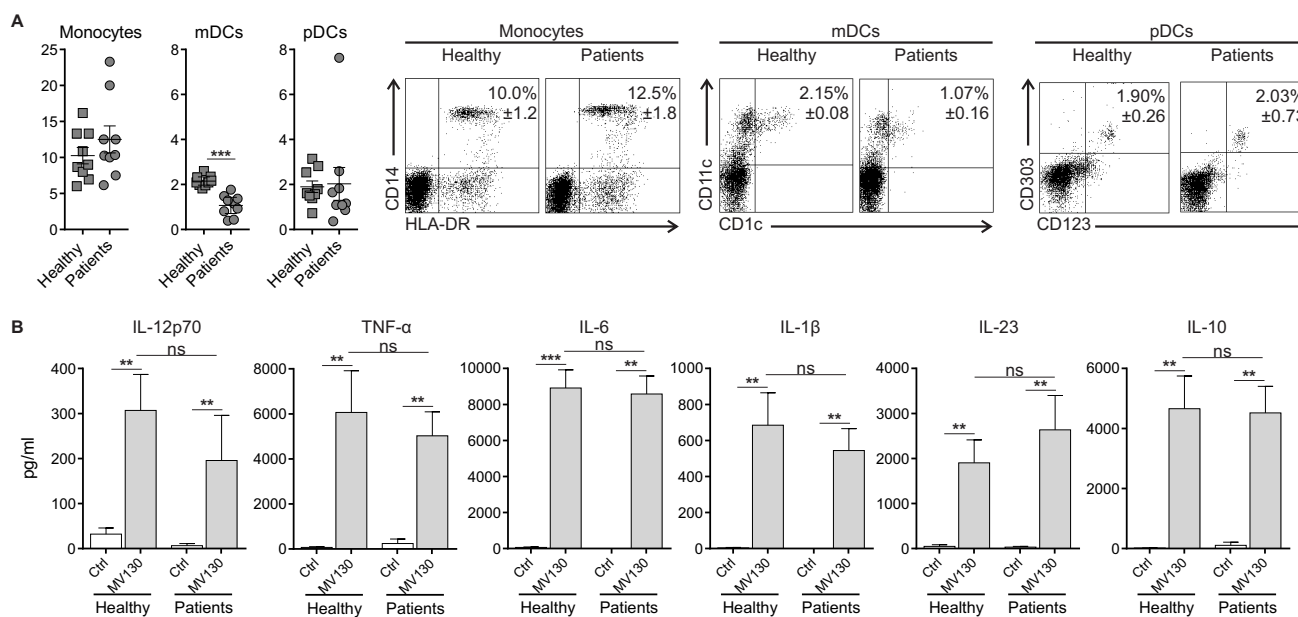


Figure 1. MV130-activated hmoDCs from healthy subjects and RRTIs patients produce pro-inflammatory cytokines with high levels of IL-10. (A) The graph displays the percentage of monocytes (HLA-DR⁺ CD14⁺), mDCs (HLA-DR⁺ CD19⁻ CD1c⁺ CD11c⁻) and pDCs (HLA-DR⁺ CD123⁺ CD303⁺) in freshly isolated PBMCs from healthy donors (n=9) and patients suffering from RRTIs (n=9). Representative dot plots showing the gated cells are displayed on the right side. (B) Cytokines levels in cell-free supernatants (IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL- β , IL-23, and IL-10) quantified by ELISA after stimulation of hmoDCs from healthy subjects (n=9) and patients (n=9) with Ctrl (control containing all excipients except the bacteria) or MV130 (10^7 bact./mL) for 24 hours. All data are represented as mean \pm s.e.m. Unpaired (for A) and paired (for B) t-test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

clinical features of the patients including main diagnosis and routine therapy are collected in Table I. First, we quantified and compared the frequency of monocytes and different DC subsets in peripheral blood from healthy subjects and RRTIs patients. The percentage of myeloid DCs (mDCs) in freshly isolated PBMCs was significantly lower in RRTIs patients than in healthy subjects without significant changes in monocytes or plasmacytoid DCs (pDCs) (Fig. 1A). Representative dot-plots showing the gated cells in each case are also displayed. To assess the capacity of MV130 to immunomodulate the function of human DCs, we generated human monocyte-derived DCs (hmoDCs) from healthy subjects and RRTIs patients and compared the cytokine signature imprinted by this PBP. MV130- but not control-treated hmoDCs produced significant increments of the pro-inflammatory Th1- (IL-12p70 and TNF- α) and Th17-driving (IL-6, IL-1 β , IL-

23) cytokines as well as high levels of IL-10 without significant differences between DCs from healthy subjects and RRTIs patients (Fig. 1B).

MV130-activated hmoDCs from RRTIs patients and healthy subjects generate Th1, Th17 and IL-10-producing T cells

To assess the capacity of MV130-activated hmoDCs to polarize T cell responses, we performed co-culture experiments. MV130-activated hmoDCs induced a significantly higher percentage of proliferating allogeneic naïve CD4⁺ T cells than control-treated hmoDCs without significant differences between healthy subjects and RRTIs patients (Fig. 2A). MV130-activated hmoDCs from both healthy controls and RRTIs patients generated T cells producing significantly higher levels of IFN- γ , IL-17A and IL-10 than control-treated hmoDCs without

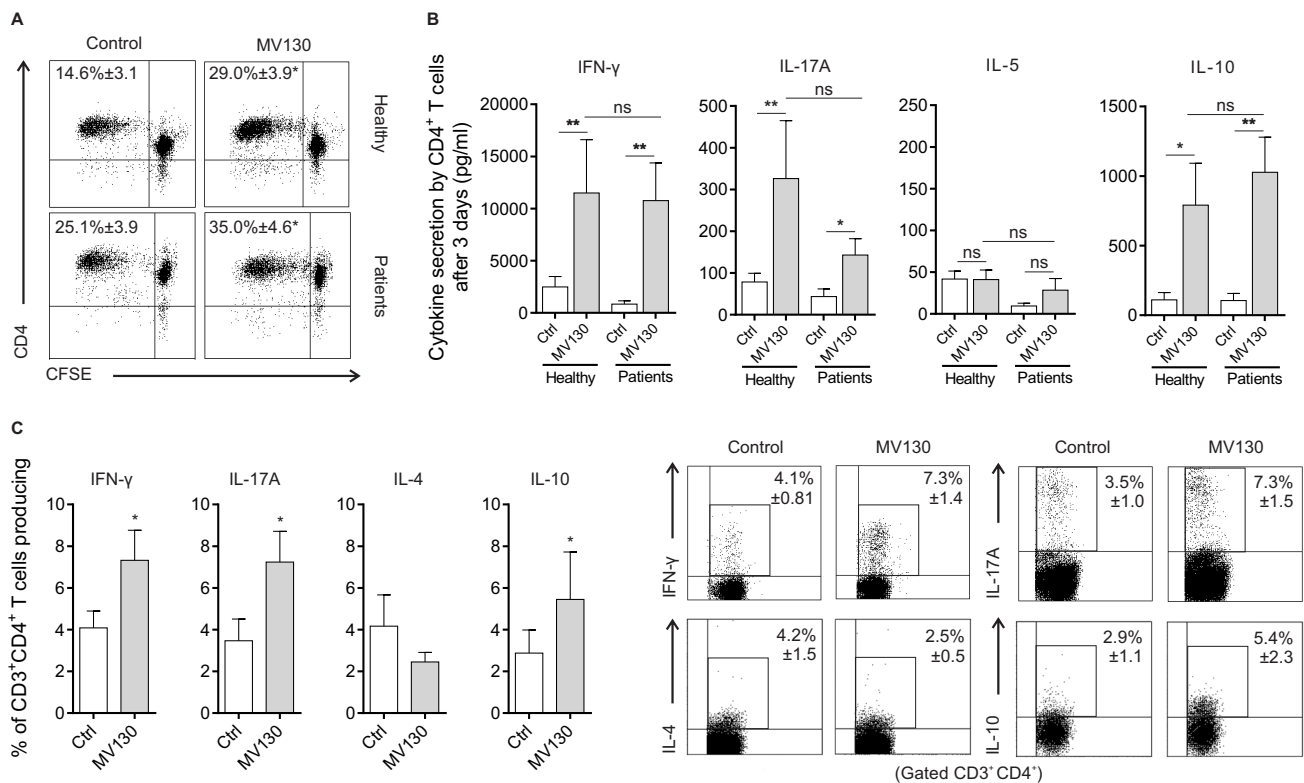


Figure 2. MV130-activated hmoDCs from healthy donors and RRTIs patients induce T cell proliferation and the generation of Th1, Th17 and IL-10-producing T cells. (A) Representative dot plots of proliferating CFSE-labeled allogeneic naïve CD4⁺ T cells after 3 days of coculture with hmoDCs from healthy subjects (n=5) and patients (n=5) in the presence of Ctrl or MV130. The frequency of proliferating cells is displayed inside the plot. (B) ELISA quantification of IFN- γ , IL-17A, IL-5 and IL-10 cytokines in cell free supernatants produced by allogeneic naïve CD4⁺ T cells primed by Ctrl- or MV130-activated hmoDCs from healthy subjects (n=9) and patients (n=9) after 3 days. (C) Percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells producing IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10 generated after 3 days of co-culture of Ctrl- or MV130-activated hmoDCs from healthy donors and allogeneic CD4⁺ T cells as determined by intracellular staining (n=4-7 independent experiments). Representative dot plots are shown for each cytokine. Results are mean \pm s.e.m. Wilcoxon-signed-rank test * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

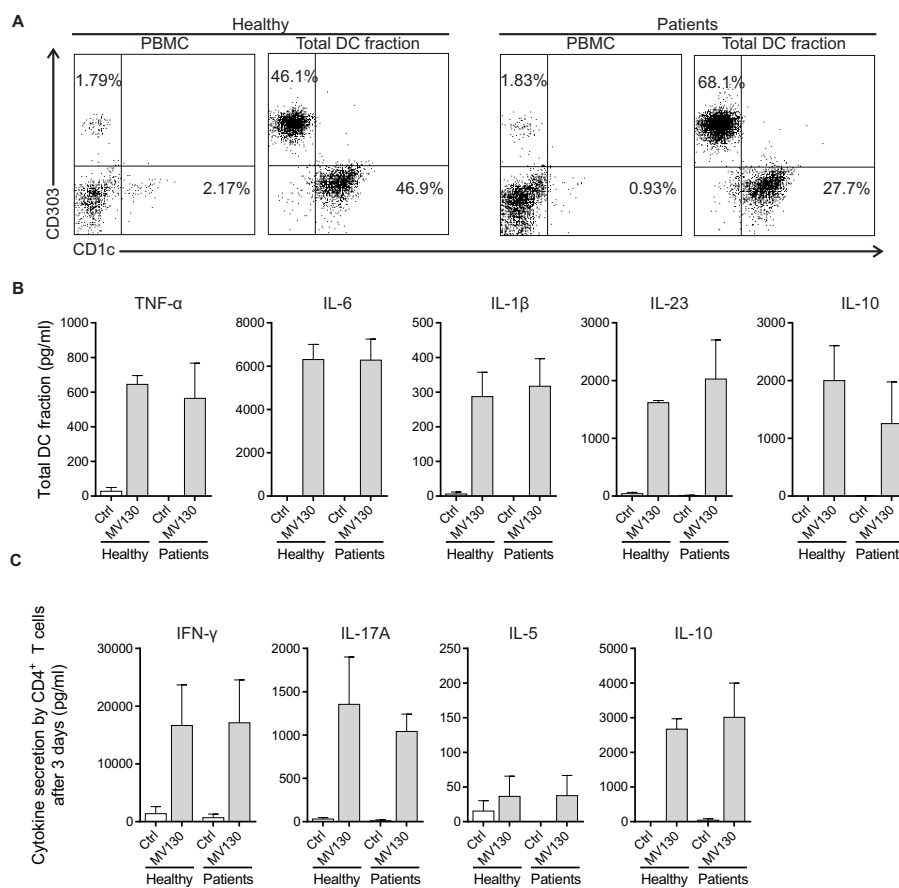


Figure 3. MV130-activated total blood DCs from healthy subjects and RRTIs patients produce pro- and anti-inflammatory cytokines and induce Th1, Th17 and IL-10-producing T cells. (A) Representative dot plots of proliferating CFSE-labeled allogeneic naive CD4⁺ T cells after 3 days of coculture with hmoDCs from healthy subjects (n=5) and patients (n=5) in the presence of Ctrl or MV130. The frequency of proliferating cells is displayed inside the plot. (B) ELISA quantification of IFN- γ , IL-17A, IL-5 and IL-10 cytokines in cell free supernatants produced by allogeneic naive CD4⁺ T cells primed by Ctrl- or MV130-activated hmoDCs from healthy subjects (n=9) and patients (n=9) after 3 days. (C) Percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells producing IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10 generated after 3 days of co-culture of Ctrl- or MV130-activated hmoDCs from healthy donors and allogeneic CD4⁺ T cells as determined by intracellular staining (n=4-7 independent experiments). Representative dot plots are shown for each cytokine. Results are mean \pm s.e.m. Wilcoxon-signed-rank test * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

IL-5 production and without significant differences between groups (Fig. 2B). Supporting these data, intracellular staining experiments at the single cell level (Fig. 2C) demonstrated that MV130-activated hmoDCs generate Th1/Th17 and IL-10-producing T cells without significant induction of Th2 responses.

MV130-activated total blood DCs from RRTIs patients and healthy subjects display similar cytokine signature and induce Th1, Th17 and IL-10-producing T cells

We obtained an enriched fraction of total blood DCs containing both mDCs and pDCs from PBMCs of healthy subjects and patients suffering from RRTIs (Fig. 3A). The total blood DC fraction activated with MV130 produced higher levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 and IL-10 than control-stimulated cells (Fig. 3B). Similar responses were observed in total blood DCs from healthy

subjects and RRTIs patients for the assayed cytokines. Co-culture experiments demonstrated that MV130- but not control-treated total blood DCs from both groups also generated T cells producing high levels of IFN- γ , IL-17A and IL-10 but not IL-5 (Fig. 3C).

Identification of signaling pathways activated by MV130 in human DCs by global comparative transcriptome analysis using DNA microarrays

To gain insight into the underlying molecular mechanisms involved in the effects imprinted by MV130 in human DCs, we performed microarray genome wide expression analysis between MV130- and control-treated hmoDCs. Considering that MV130 imprints the same responses in human DCs from healthy and RRTIs patients, we employed hmoDCs from healthy donors. 1,456 genes were differentially expressed ($FC > 2$; $p < 0.05$) in MV130-treated hmoDCs compared to control

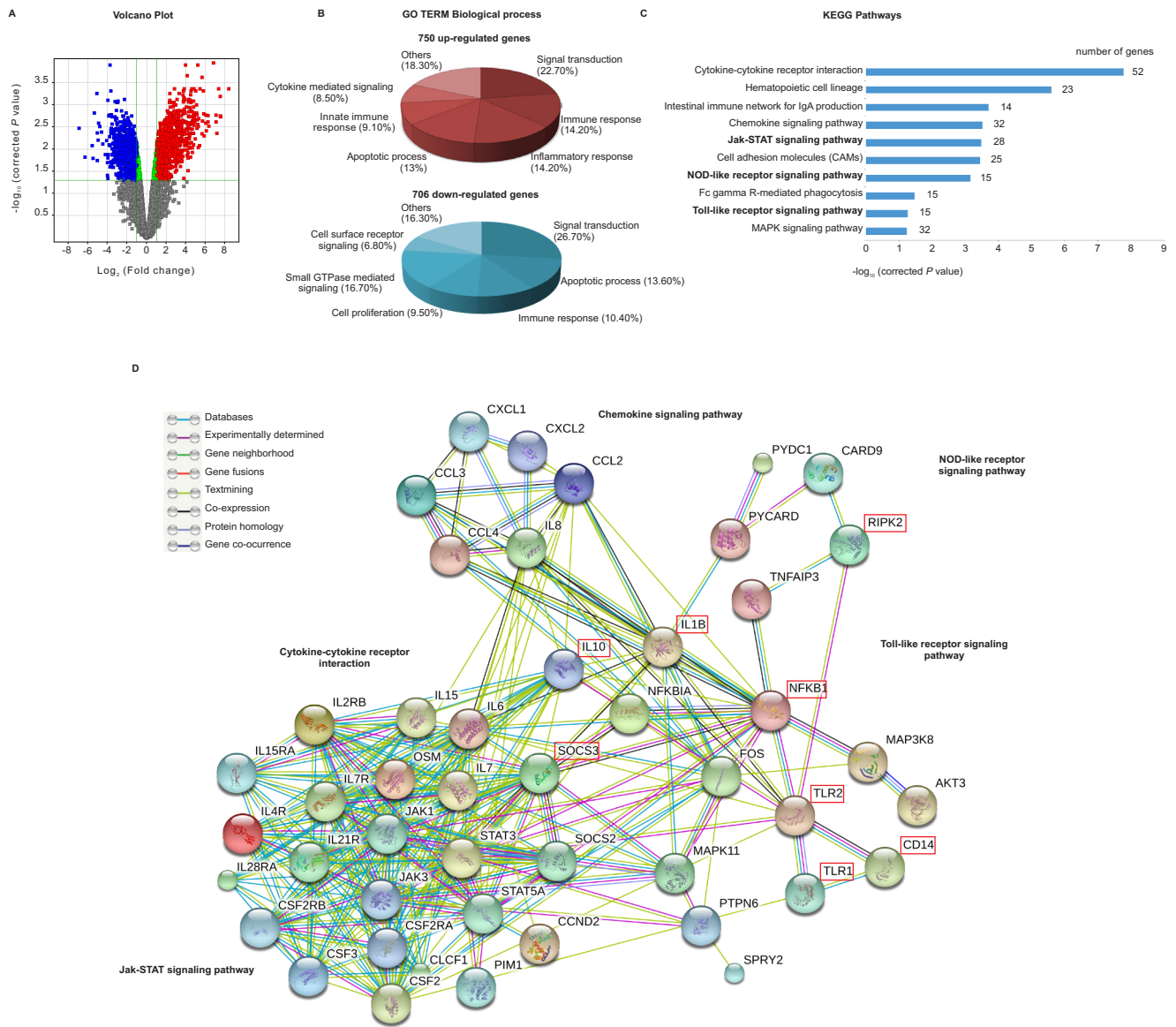


Figure 4. Global comparative transcriptome analysis by DNA microarrays of hmoDCs treated with control or MV130 for 24 hours. (A) The Volcano plot depicts $-\log_{10}$ of corrected P value versus \log_2 of fold-change (FC) for each gene. Moderate t-test analysis was used for $n=4$ independent experiments to find 1,456 genes differentially expressed ($FC>2$ and $p<0.05$) between control and treated samples. Up- and down-regulated genes are highlighted in red and blue, respectively. (B) GO term analysis using GeneCodis software was performed for the up- and down-regulated genes. Altered GO terms at $p<0.05$ and >10 genes are displayed in red and blue chart diagrams for up- and down-regulated genes, respectively. (C) KEGG analysis of the 10 altered ($p<0.06$ and >10 genes) immunoregulatory pathways analyzed with DAVID software according to the $-\log_{10}$ of corrected P value and the number of genes involved in each pathway. (D) Protein interaction network using as input the 49 non-redundant genes from JAK-STAT, NLR and TLR signaling pathways with the STRING program at confidence of ≥ 0.7 . The main clusters of associated genes identified by the predicted network are indicated. Key molecules for each cluster are highlighted. The connected lines represent the associations according to the color code indicated in the figure.

(Fig. 4A). Functional enrichment analysis for the 750 up- and 706 down-regulated genes by the gene ontology term biological processes showed around 50% of them clustered in signal transduction, immune responses and apoptotic biological processes (Fig. 4B). The rest of up-regulated genes were mainly gathered in biological processes related with immune system functions

whereas down-regulated genes in cell proliferation and signaling (Fig. 4B). Functional gene set enrichment analysis of the 1,456 genes by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) for pathways allowed the identification of 10 immunoregulatory signaling pathways differentially activated in MV130-treated hmoDCs (Fig. 4C). A predicted network of interactions using as

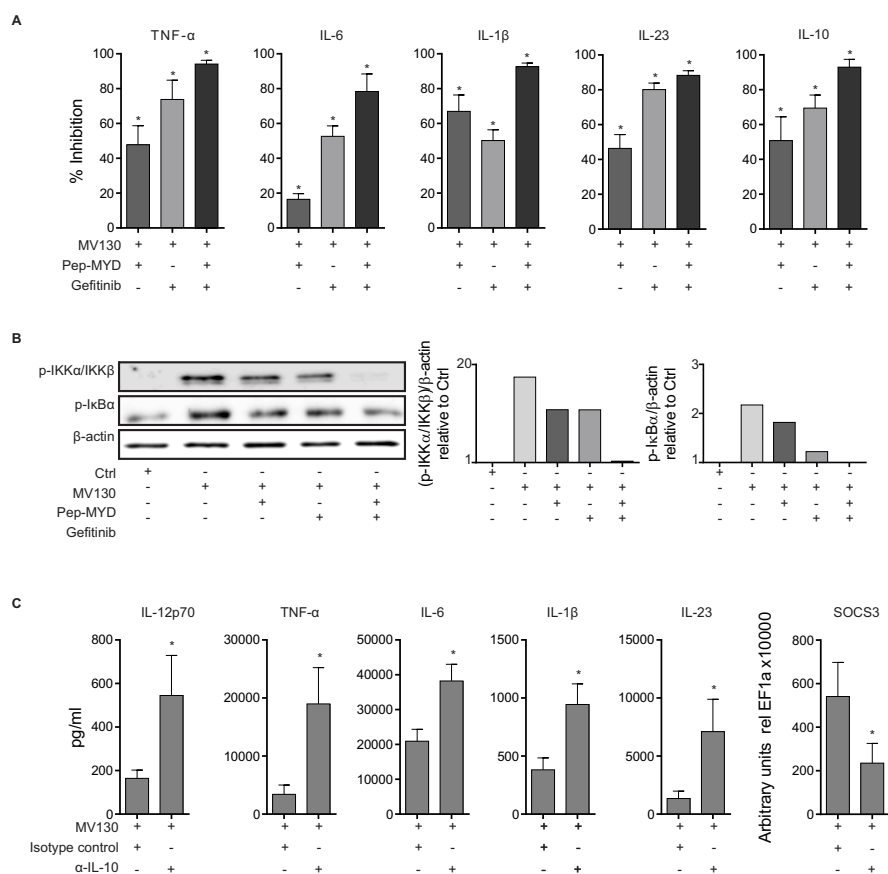


Figure 5. MV130 immunomodulates human DCs' function by mechanisms depending on NLR/RIPK2- and TLR/MyD88-mediated signaling pathways under the control of IL-10. (A) The graphs display the percentage of inhibition of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 and IL-10 production by MV130-treated hmoDCs from healthy donors by the indicated inhibitors (Pepinh-MYD and/or Gefitinib) related to vehicle controls (Pepinh-Control and/or DMSO). Results are the mean \pm s.e.m. of n=6-8 independent experiments. Wilcoxon-signed-rank test * $P < 0.05$. (B) Western blot analysis of protein extracts from hmoDCs stimulated for 30 min under the indicated conditions (Ctrl, MV130, Pepinh-MYD or Gefitinib) and quantification of the reactive phosphorylated bands by scanning densitometry. Graphs in the right side represent the quantification of the corresponding reactive bands (phospho-IKK α /IKK β (Ser176/Ser177) and phospho-I κ B α (Ser32/36)) with respect to the β -actin and relative to Ctrl-treated condition for each case. One representative example out of 3 is shown. (C) Increase of IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-23 cytokine production by MV130-activated hmoDCs in the presence of specific blocking antibodies against IL-10 (α -IL-10) with respect to the levels in the presence of isotype control. Results are the mean \pm s.e.m. of 6 independent experiments. Wilcoxon- signed-rank test * $P < 0.05$.

input the 49 non-redundant genes clustered in the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT), nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NLR) and Toll-like receptor (TLR) signaling pathways is shown (Fig. 4D). The predicted network suggested that MV130 triggers TLRs and NLRs in human DCs leading to the activation of NF- κ B and the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and IL-10. The interaction of cytokines and chemokines with cognate receptors integrates JAK-STAT downstream signaling pathways that also could contribute to finely tune immune responses in human DCs [18-20]. Interestingly, a central role for IL-10 in the control of potential excessive pro-inflammatory responses, for example, by inducing SOCS genes is also predicted (Fig. 4D).

RIPK2- and MyD88-mediated signaling pathways under the control of IL-10 are the main drivers of the

immune responses imprinted by MV130 in human DCs

To validate the pathways identified by global comparative transcriptomic analysis, we performed inhibition experiments using pepinh-MYD (an intracellular peptide blocking MyD88-mediated signaling pathways coupled to TLRs) and Gefitinib (a selective pharmacological inhibitor of RIPK2, the adaptor protein for NOD1/NOD2-mediated signaling pathways). The production of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 and IL-10 by MV130-activated hmoDCs was significantly impaired (inhibition up to 95%) by simultaneous preincubation with pepinh-MYD and Gefitinib (Fig. 5A). The individual contribution of TLRs and NLRs for each cytokine is also displayed. MV130 activated NF- κ B in human DCs as determined by the phosphorylation of IKK α /IKK β at Ser176/Ser177 and I κ B α at Ser32/36, which was totally abolished by simultaneous inhibition with pepinh-MYD and Gefitinib

(Fig. 5B). Anti-IL-10 blocking antibodies (α -IL-10) significantly increased the production of IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-23 in MV130-activated hmoDCs at the protein level (Fig. 5C).

Sublingual immunization of BALB/c mice with MV130 induces systemic Th1, Th17 and IL-10 immune responses in vivo

To study the *in vivo* relevance of our findings BALB/c mice were sublingually immunized with MV130 or control excipients as shown in Fig. 6A. Systemic responses were assessed after *in vitro* stimulation of splenocytes isolated from MV130 or control immunized mice as indicated in Fig. 6A. Spleen CD4⁺ T cells from both MV130- or control-immunized mice showed significantly higher proliferation rates when stimulated *in vitro* with MV130 than control (Fig. 6B). Interestingly, spleen CD4⁺ T cells from mice immunized with MV130 displayed significantly higher proliferation rates than those from control immunized mice after MV130 *in vitro* stimulation (Fig. 6B). Splenocytes from both groups stimulated *in*

vitro with MV130 produced significantly higher levels of IFN- γ , IL-17A and IL-10 than those stimulated with control excipients (Fig. 6B). Interestingly, the levels of IL-17A and IL-10 produced by splenocytes from mice sublingually immunized with MV130 were significantly higher than those produced by splenocytes from control mice after *in vitro* MV130 stimulation (Fig. 6C). The levels of IFN- γ were also significantly high but without differences between groups (Fig. 6C). We did not detect production of IL-5 in any of the assayed conditions (data not shown).

Discussion

In this preclinical study, we combined systems biology and functional immunological approaches to demonstrate that MV130, a sublingual PBP to treat and prevent RRTIs, imprints human DCs with the capacity to generate Th1, Th17 and IL-10-producing T cells via RIPK2- and MyD88-mediated signalling pathways under the control of IL-10. We also showed that sublingual immunization of BALB/c mice with MV130 induces systemic Th1,

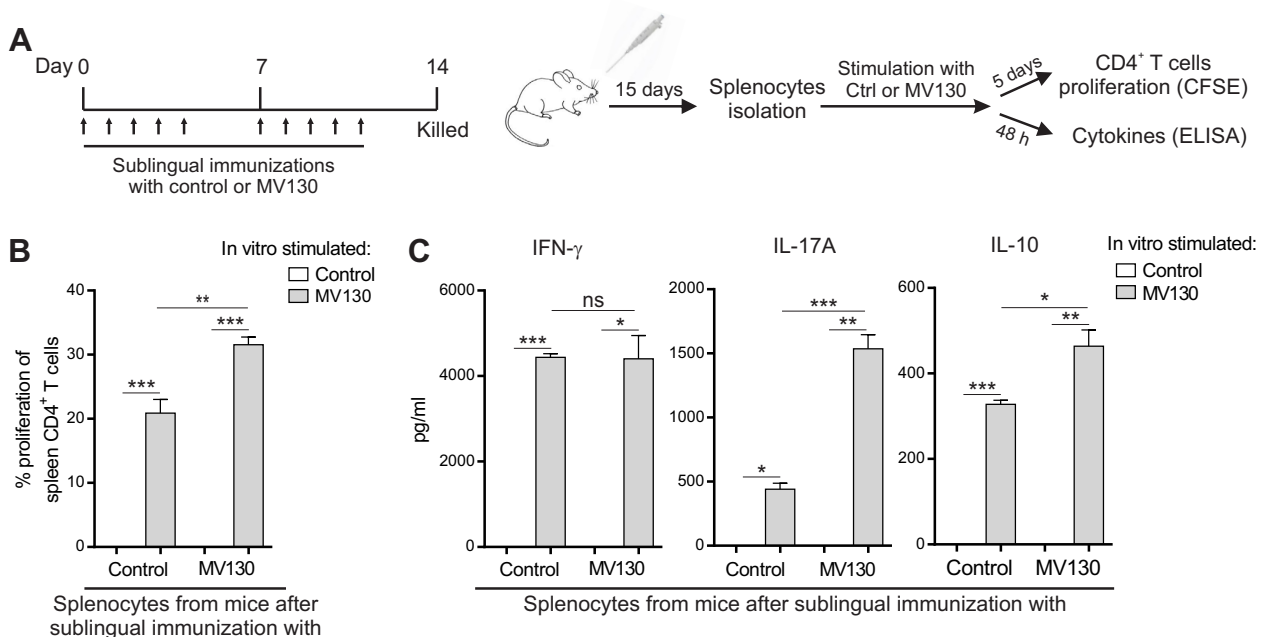


Figure 6. Induction of Th1, Th17 and IL-10 immune responses after *in vivo* MV130 sublingual immunization of BALB/c mice. Scheme of the sublingual immunization protocol and analysis of induced systemic responses. (B) Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺ T cells from splenocytes isolated from mice immunized sublingually with MV130 or control after *in vitro* stimulation with MV130 or control. (C) Cytokine production (IFN- γ , IL-17A and IL-10) by splenocytes isolated from mice immunized sublingually with MV130 or control and stimulated *in vitro* with MV130 or control. Results are mean \pm s.e.m. of 6 (B) or 3 (C) independent experiments. Ctrl, control containing all excipients except the bacteria; MV130, PBP Bactek. Unpaired or paired t test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Th17 and IL-10 responses *in vivo*. Our data uncover the immunological mechanisms by which this specific PBP immunomodulates the function of human DCs, which in cooperation with antigen-specific responses might well also contribute to the reported clinical benefits in patients suffering from RRTIs. The understanding of these immunological mechanisms might well help to the designing of rational patient-tailored novel bacterial vaccines in other clinical conditions at high risk of recurrent infections.

RRTIs are the first leading cause of community- and nosocomial-acquired infections. Antibiotics remain the mainstay of treatment for RRTIs, but repeated and prolonged antibiotic cycles in these patients enhance the potential to develop antibiotic resistances. That is why, new alternative approaches to prevent and treat RRTIs have brought a lot of attention over the last years. At this regard, bacterial lysates from different species administered through the oral route were initially employed and showed clinical efficacy in the reduction of respiratory infections [3, 12, 13]. Compelling experimental evidence demonstrated that whole inactivated bacteria induce more potent and durable responses than soluble bacterial antigens or lysates [21, 22]. Nowadays, it is well-recognized that sublingual immunization protects bacterial components from gastrointestinal degradation and promotes long-lasting immune responses locally and in distant target tissues [23-26]. MV130 (Bactek), is a novel sublingual polybacterial vaccine that encompasses both features. It is composed by whole heat-inactivated bacteria (90% Gram-positive and 10% Gram-negative) causing the majority of respiratory bacterial infections in Europe and it is delivered through the sublingual route [3, 4]. A pilot clinical study showed that daily sublingual administration of MV130 significantly reduced the rate of respiratory infections in RRTIs patients [14], however,

the immunological mechanisms of action remained unknown. We studied the molecular pathways underlying the potential capacity of MV130 to immunomodulate the function of human DCs as an alternative way of action of these preparations. The clinical benefits reported after administration of mucosal polyvalent bacterial vaccines via the sublingual route likely involve both antigen-specific and nonspecific immunological and immunomodulatory effects [16, 17]. A dense network of functional DCs playing a key role in the initiation and maintenance of proper immune responses is located beneath the human sublingual epithelium and tonsils [27-30]. Therefore, we focused on the capacity of MV130 to immunomodulate the function of DCs from patients suffering from RRTIs and healthy subjects by analysing the immunological mechanism imprinted by this PBP at the molecular level.

Our data revealed that MV130 promotes a potent pro-inflammatory response, inducing the secretion of cytokines to bias toward Th1 and Th17 responses, which might contribute to enhance immune responses against intracellular and extracellular pathogens, respectively [31-34]. On the other hand, MV130 also induces the production of high levels of IL-10 by DCs and the generation of IL-10-producing T cells, which is essential to avoid excessive deleterious responses, to enhance pathogen clearance and to keep tissue homeostasis [35-37]. Although the patients suffering from RRTIs included in this study display fewer numbers of mDCs than healthy subjects, MV130 was able to immunomodulate DCs from both groups in a similar manner. Our data demonstrating that BALB/c mice daily sublingually immunized with MV130 for two weeks display potent systemic Th1, Th17 and IL-10 responses support the *in vivo* relevance of our findings. Global comparative transcriptome analysis by using DNA microarrays combined with

Cirauqui et al.

functional immunological *in vitro* experiments allowed us to uncover that MV130 imprints human DCs with the capacity to generate Th1/Th17 and IL-10-producing T cells by mechanisms depending on RIPK2 and MyD88, key signaling and adaptor molecules for NLRs and TLRs, respectively [38, 39]. DCs are equipped with a large number of pattern recognition receptors (PRRs) that enable them to link innate and adaptive immune responses [28, 40-43]. Among them, NLRs and TLRs play essential roles in regulating human DC function including their capacity to polarize T cell responses [38, 39, 44-46]. Interestingly, our inhibition experiments using anti-IL-10 blocking antibodies established the important role played by IL-10 produced by MV130-activated DCs in the control of excessive immune responses. IL-10 drives key immune regulatory functions by regulating different suppressive mechanisms [34, 35, 47-49]. Collectively, we demonstrated that MV130, a sublingual whole inactivated PBP that prevents infections in patients suffering from RRTIs, directly acts on human DCs promoting the generation of Th1/Th17 responses by mechanisms depending on NLR- and TLR-mediated signaling pathways under the control of IL-10. We have recently shown that MV140, a sublingual PBP formulated with a different composition of whole-inactivated bacteria to treat recurrent urinary tract infections, also generates Th1, Th17 and IL-10 immune responses [50]. Interestingly, the mechanisms underlying the effects of MV140 (75% Gram-negative/25% Gram-positive) depend on spleen tyrosine kinase (Syk)-mediated signaling pathways in cooperation with MyD88 [50], which are different to those reported in this study for MV130 (90% Gram-positive/10% Gram-negative). Overall, our data uncover that although the clinical outcomes (significant reduction of recurrent infections in different clinical settings) seem to be similar for different PBPs,

Eur. J. Immunol. 2017 ID eji.201747024 (Major Revision)

Interestingly, the molecular mechanisms leading to the immunomodulation and phenotypes underpinning clinical benefits might completely differ depending on the specific bacterial components in each PBP. The translation of this concept to clinical practice might well pave the way to develop more rational patient-tailored novel vaccines for many other clinical conditions at high risk of recurrent infections, which might well also contribute to combat the spread of antibiotic resistance infections.

Materials and methods

Media and reagents

RPMI 1640 (Lonza) supplemented with 10% fetal-bovine-serum, 100 µg/mL normocin, 50 µg/mL penicillin-streptomycin, 1% non-essential aminoacids, 1% MEM-vitamins and 1 mM sodium pyruvate (cRPMI). PBP MV130 (Bactek) composed of heat-inactivated bacteria (60% *S. pneumoniae*, 15% *S. aureus*, 15% *S. epidermidis*, 4% *K. pneumoniae*, 3% *M. catarrhalis* and 3% *H. influenzae*) and control (all the excipients without bacteria) were from Immunotek S.L. Inhibitors for MyD88 (Pepinh-MYD), RIPK2 (Gefitinib) from InvivoGen and neutralizing anti-IL-10 (clone JES3-9D7, Biologend) were used.

Patients

The clinical features of the 9 patients suffering from RRTIs included in this study are summarized in Table I. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain (C.P.-C.I.16/191-E_TFG). Written informed consent was obtained from all the subjects included in the study.

PBMC, human-monocyte derived dendritic cells (hmoDCs), naïve CD4⁺ T cells, total DC fraction and cell cultures

PBMC from healthy donors and patients were isolated by Ficoll-Paque Plus (GE-Healthcare) density gradient centrifugation from heparinized blood as described [40, 43]. Monocytes were isolated from PBMC with anti-human CD14 microbeads in autoMACS (Miltenyi-Biotec) and cultured in RPMI medium with recombinant human GM-CSF and IL-4 (100 ng/mL each; PeproTech). After 6 days, immature hmoDCs were harvested and phenotypically characterized by flow cytometry. Naïve CD4⁺ T cells or total DC fraction were isolated with “Naïve CD4⁺ T Cell” or “Blood DCs II” Isolation Kits (Miltenyi-Biotec). Immature hmoDCs and total blood DC (10⁶ cells/mL) were stimulated with control or MV130 (10⁷ bact./mL) for 24 h. IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 and IL-10 were quantified by ELISA. For inhibition experiments, hmoDCs were preincubated for 6 h with Pepinh-MYD (50 μ M), 30 min with Gefitinb (5 μ M) or 1 h with anti-IL-10 (2.5 μ g/mL) (or their corresponding controls) prior to stimulation. HmoDCs or blood DC fraction were co-cultured with purified allogeneic naïve CD4⁺ T cells (1:5 DC:T cell ratio) for 3 days in the presence of the control or MV130 (10⁷ bact./mL) as described [27, 28]. IFN- γ , IL-17A, IL-5 and IL-10 were quantified by ELISA. For intracellular staining, the primed CD4⁺ T cells were washed and re-stimulated with 25 ng/mL PMA plus 1 μ g/mL ionomycin for 6 h and Brefeldin A (10 μ g/mL) for last 4 h. Cells were fixed, permeabilized and stained for IFN- γ , IL-17A, IL-4 and IL-10. Purified allogeneic naïve CD4⁺ T cells were labeled with CFSE (Molecular Probes) prior to co-cultures and proliferation assessed in CFSE dilution experiments by flow cytometry.

Flow cytometry

Flow cytometry was performed at the UCM Cytometry and Fluorescence Microscopy Unit. Cells were washed with PBS/EDTA 2 mM/0.5% BSA and stained for 15

min at room temperature with the fluorescence-labelled antibodies or corresponding isotype controls. The following anti-human monoclonal antibodies (mAbs) were used for flow cytometry: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD1c, anti-HLA-DR, anti-CD123; allophycocyanin (APC)-conjugated anti-HLA-DR; phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD11c and anti-CD303; peridinin-chlorophyll-protein (PerCP)-conjugated anti-CD14 and anti-CD4 (Miltenyi Biotec). APC-conjugated anti-CD3; Alexa Fluor 488-conjugated anti-IFN- γ and anti-IL-4 (BD Pharmigen). PE-conjugated anti-IL-10 and anti-IL17A; PE/Cy7-conjugated anti-CD19 (BioLegend). For each staining, the corresponding isotype controls (IgG2A-FITC, IgG1-PE, IgG2A-PerCP or IgG1-APC) were also assayed.

Cytokine quantification

IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-5, and IFN- γ in cell-free supernatants were quantified using specific ELISA cytokine kits (BD Biosciences); IL-23 using Human IL-23 ELISA Ready-SET-Go!® (e-Biosciences) and IL-17A using Quantikine Elisa Kit (RD Systems) following manufacturers' instructions. In all cases, manufacturer's instructions of the specific kits were followed with minor modifications. Briefly, the catching mAbs were coated onto microtiter plates that were blocked with assay diluent (PBS 1X with 5% FBS) and incubated with the standards or samples. After washing, biotinylated anti-human mAbs and streptavidin-labelled peroxidase were added to detect bound cytokines. After washing, chromogenic substrate (0.63 mg/mL OPD, 0.03% H₂O₂ in 1 M sodium citrate) was added. The colour reaction was stopped by adding 3N H₂SO₄ and the OD values were measured at 492 or 450 nm according to each kit.

DNA microarray analysis

Cirauqui et al.

RNA was extracted using TRIZOL (Invitrogen) from hmoDCs from healthy subjects stimulated with control or MV130 for 24 h. RNA quality was measured with Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent technologies) and only good quality samples, RIN (RNA Integrity Number) higher than 7.5, were selected for the analysis. Agilent G4851B (8x60K) microarrays were used to analyze gene expression in 4 control- and 4 MV130-treated hmoDCs from healthy donors. Agilent recommended protocol “Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (G4140-90040)” was followed. Briefly, 200 ng of total RNA together with the appropriate RNA spike-in (RNA Spike-In Kit, One-Color Agilent p/n 5188-5282) was subjected to reversed transcription in the presence of T7-primer, dNTPs, first strand buffer and enzymes for 2 h at 40°C. Afterwards cRNA was synthesized and Cy3-labeled in the presence of transcription buffer, NTPs and T7-RNA Polymerase. Labeled cRNA was purified using Qiagen columns (RNeasy Mini Kit). RNA concentration was measured using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and the yield and specific activity were determined. 600 ng of cRNA were hybridized to the microarray for 17 hours at 65°C. Fluorescence was measured using Agilent microarray scanner and Feature Extraction software. Quality Control Report and spikes-in were used to discard the microarrays that did not fulfill good quality criteria. Gene Spring GX software (Agilent) was employed for data normalization (75% percentile shift) and analysis. From the original 60 K features microarray, 19,893 spots without flags expressed in 90% of the samples were used for the following statistical analysis. Differential gene expression assessment was carried out using Moderate T test and Benjamini-Hochberg false discovery rate for multiple correction. Selected genes showed a $FC > 2$ and a $p < 0.05$. Transcript profiling: [ArrayExpress # E-MTAB-5259].

Eur. J. Immunol. 2017 ID eji.201747024 (Major Revision)

Gene set enrichment analysis was carried out by using Gene Codis software web-based tool (<http://genecodis.cnb.csic.es>) [51, 52] DAVID Bioinformatics Resources 6.8 software (<https://david.ncifcrf.gov/>) [53]. Protein interaction analysis was realized with the STRING 10.0 (known and predicted protein-protein interactions) free program (<http://string-db.org/>).

Western Blot

Freshly isolated hmoDCs were previously pre-incubated with Pepinh-MYD or Pepinh-control for 2 hours and with Gefitinib or DMSO for 30 min before the stimulation with control or MV130 for 30 min. Cell lysis was carried out with PBS/Triton 1% in the presence of 1 mM PMSF (Sigma), 1 µg/mL Leupeptin (Bachem) and Aprotinin (Roche) for 30 min at 4 °C with vortex every 10 min. Lysates were clarified by centrifugation at 10000 g for 15 min at 4 °C. Protein quantification was performed with Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions and samples with equal amounts of total protein were resolved in 10% SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes.

The membranes were incubated with the following antibodies: anti-human phospho-IkBa (Ser32/36) (1/1000, Cell signaling), anti-human phospho-IKKα/IKKβ (Ser176/Ser177) (1/1000, Cell signaling), and anti-human β-actin (1/5000, Sigma) as primary antibodies and Goat anti-mouse or anti-rabbit conjugated with horseradish peroxidase (1/2500, Pierce) as secondary antibodies. Reactive bands were visualized by using ECL chemiluminescence system (BioRad). Optical density of the reactive bands was quantified with Fujifilm multigauge software and values expressed relative to β-actin loading control.

Mice experiments

Animal experiments were approved by the Ethics Committee of Hospital Clínico San Carlos and performed in accordance with the Spanish national and international/EU legislation regulated by D.C.86/609/CEE; RD 1201/2005. BALB/c mice (6-weeks-old) were sublingually immunized for 5 consecutive days during two weeks with MV130 (10^9 bact./mL) or control and sacrificed 2 days after the last immunization. Splenocytes were isolated following conventional protocols, labelled with CFSE and stimulated *in vitro* with MV130 (10^7 bact./mL) or control. Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺ T cells was monitored by flow cytometry after 5 days and cytokine production by Multiplex Cytometric kits (eBioscience) after 48 h of stimulation.

Statistics

All data represent mean \pm s.e.m. Unpaired or paired t-test for differences between groups or Wilcoxon test when normality of data could not be inferred were performed with GraphPad Prism software, version 6.0. Significance was defined as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Acknowledgments: This work was supported by grant IPT-2012-0639-090000 from INNFACTO and MINECO, Spain to Immunotek S.L. The authors' laboratories are supported by grants SAF-2014-52706 to O.P. from MINECO, Spain. O.P. is a Ramon y Cajal Scholar funded by MINECO and the European Social Fund. We thank to Juan López-Relaño for excellent technical assistance with mice experiments.

Conflict of interests: J.L.S. is the founder and shareholder of Immunotek SL. The rest of authors declare no conflict of interests.

References

1. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin*

Immunol 2016; 138:16-27.

2. Florin TA, Plint AC, Zorc JJ. Viral bronchiolitis. *Lancet* 2017; 389:211-24.

3. Tejera-Alhambra M, Palomares O, de Diego RP, Diaz-Lezcano I, Sanchez-Ramon S. New Biological Insights in the Immunomodulatory Effects of Mucosal Polybacterial Vaccines in Clinical Practice. *Curr Pharm Des* 2016; 22:6283-93.

4. Sanchez-Ramon S, de Diego RP, Dieli-Crimi R, Subiza JL. Extending the clinical horizons of mucosal bacterial vaccines: current evidence and future prospects. *Curr Drug Targets* 2014; 15:1132-43.

5. Martinez JL, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Ups J Med Sci* 2014; 119:68-77.

6. Kuruvilla M, de la Morena MT. Antibiotic prophylaxis in primary immune deficiency disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013; 1:573-82.

7. Smith SS, Evans CT, Tan BK, Chandra RK, Smith SB, Kern RC. National burden of antibiotic use for adult rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:1230-2.

8. (WHO) WHO. At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/commitment-antimicrobial-resistance/en/> September 2016.

9. Reardon S. Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature* 2014; 509:141-2.

10. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science* 2016; 352:544-5.

11. Pamer EG. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science* 2016;

352:535-8.

12. Steurer-Stey C, Bachmann LM, Steurer J, Tramer MR. Oral purified bacterial extracts in chronic bronchitis and COPD: systematic review. *Chest* 2004; 126:1645-55.

13. Bitar MA, Saade R. The role of OM-85 BV (Broncho-Vaxom) in preventing recurrent acute tonsillitis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013; 77:670-3.

14. Alecsandru D, Valor L, Sanchez-Ramon S, et al. Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome. *Clin Exp Immunol* 2011; 164:100-7.

15. Parola C, Salogni L, Vaira X, et al. Selective activation of human dendritic cells by OM-85 through a NF- κ B and MAPK dependent pathway. *PLoS One* 2013; 8:e82867.

16. Pasquali C, Salami O, Taneja M, et al. Enhanced Mucosal Antibody Production and Protection against Respiratory Infections Following an Orally Administered Bacterial Extract. *Front Med (Lausanne)* 2014; 1:41.

17. Netea MG, Joosten LA, Latz E, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016; 352:aaf1098.

18. Alsina L, Israelsson E, Altman MC, et al. A narrow repertoire of transcriptional modules responsive to pyogenic bacteria is impaired in patients carrying loss-of-function mutations in MYD88 or IRAK4. *Nat Immunol* 2014; 15:1134-

42.

19. Banchereau R, Baldwin N, Cepika AM, et al. Transcriptional specialization of human dendritic cell subsets in response to microbial vaccines. *Nat Commun* 2014; 5:5283.

20. Bezbradica JS, Rosenstein RK, DeMarco RA, Brodsky I, Medzhitov R. A role for the ITAM signaling module in specifying cytokine-receptor functions. *Nat Immunol* 2014; 15:333-42.

21. Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:215-25.

22. Blackwell HE, Fuqua C. Introduction to bacterial signals and chemical communication. *Chem Rev* 2011; 111:1-3.

23. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005; 11:S45-53.

24. Negri DR, Riccomi A, Pinto D, et al. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. *Vaccine* 2010; 28:4175-80.

25. Bush RK. Advances in allergen immunotherapy in 2015. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138:1284-91.

26. Roux M, Devillier P, Yang WH, et al. Efficacy and safety of sublingual tablets of house dust mite allergen extracts: Results of a dose-ranging study in an environmental exposure chamber. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138:451-8 e5.

27. Kucuksezer UC, Palomares O, Ruckert B, et al. Triggering of specific Toll-like receptors

- and proinflammatory cytokines breaks allergen-specific T-cell tolerance in human tonsils and peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:875-85.
28. Palomares O, Ruckert B, Jartti T, et al. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3⁺ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:510-20, 20 e1-9.
29. Mascarell L, Lombardi V, Louise A, et al. Oral dendritic cells mediate antigen-specific tolerance by stimulating TH1 and regulatory CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:603-9 e5.
30. Moingeon P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: practical implications for the clinician. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013; 1:228-41.
31. Fedele G, Bianco M, Debie AS, Loch C, Ausiello CM. Attenuated Bordetella pertussis vaccine candidate BPZE1 promotes human dendritic cell CCL21-induced migration and drives a Th1/Th17 response. *J Immunol* 2011; 186:5388-96.
32. Becattini S, Latorre D, Mele F, et al. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4(+) T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science* 2015; 347:400-6.
33. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol* 2016; 34:317-34.
34. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138:984-1010.
35. Palomares O, Martin-Fontecha M, Lauener R, et al. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta. *Genes Immun* 2014; 15:511-20.
36. Soerens AG, Da Costa A, Lund JM. Regulatory T cells are essential to promote proper CD4 T-cell priming upon mucosal infection. *Mucosal Immunol* 2016; 9:1395-406.
37. Gagliani N, Amezcua Vesely MC, Iseppon A, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 2015; 523:221-5.
38. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:9-20.
39. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11:373-84.
40. Sirvent S, Soria I, Cirauqui C, et al. Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138:558-67 e11.
41. Durand M, Segura E. The known unknowns of the human dendritic cell network. *Front Immunol* 2015; 6:129.
42. Gueguen C, Bouley Changes in markers J, Moussu H, et al. associated with

Cirauqui et al.

dendritic cells driving the differentiation of either TH2 cells or regulatory T cells correlate with clinical benefit during allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137:545-58.

43. Angelina A, Sirvent S, Palladino C, et al. The lipid interaction capacity of Sin a 2 and Ara h 1, major mustard and peanut allergens of the cupin superfamily, endorses allergenicity. *Allergy* 2016; 71:1284-94.

44. Novak N, Koch S, Allam JP, Bieber T. Dendritic cells: bridging innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:50-9.

45. Feerick CL, McKernan DP. Understanding the regulation of pattern recognition receptors in inflammatory diseases - a 'Nod' in the right direction. *Immunology* 2017; 150:237-47.

46. Bauer RN, Diaz-Sanchez D, Jaspers I. Effects of air pollutants on innate immunity: the role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:14-24; quiz 5-6.

47. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 2003; 4:1169-76.

48. Stanic B, van de Veen W, Wirz OF, et al. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 135:771-80.

49. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:1204-12.

50. Benito-Villalvilla C, Cirauqui C, Diez-Rivero CM, Casnovas M, Subiza JL, Palomares O. MV140,

Eur. J. Immunol. 2017 ID eji.201747024 (Major Revision)

a sublingual polyvalent bacterial preparation to treat recurrent urinary tract infections, licenses human dendritic cells for generating Th1, Th17 and IL-10 responses via Syk and MyD88. *Mucosal Immunol* 2016; doi: 10.1038/mi.2016.112.

51. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 2012; 40:W478-83.

52. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol* 2007; 8:R3.

53. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4:44-57.

OPEN

MV140, a sublingual polyvalent bacterial preparation to treat recurrent urinary tract infections, licenses human dendritic cells for generating Th1, Th17, and IL-10 responses via Syk and MyD88

C Benito-Villalvilla¹, C Cirauqui¹, CM Diez-Rivero², M Casanovas², JL Subiza^{2,3} and O Palomares¹

Recurrent urinary tract infections (RUTIs) are one of the most common bacterial infectious diseases, especially in women. Antibiotics remain the mainstay of treatment, but their overuse is associated with antibiotic-resistant infections and deleterious effects in the microbiota. Therefore, alternative approaches are fully demanded. Sublingual immunization with MV140 (Uromune), a polyvalent bacterial preparation (PBP) of whole heat-inactivated bacteria, demonstrated clinical efficacy for the treatment of RUTIs, but the involved immunological mechanisms remain unknown. Herein, we demonstrated that MV140 endorses human dendritic cells (DCs) with the capacity to generate Th1/Th17 and IL-10-producing T cells by mechanisms depending on spleen tyrosine kinase (Syk)- and myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)-mediated pathways. MV140-induced activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) and p38 in human DCs is essential for the generated Th1/Th17 and IL-10 immune responses whereas c-Jun N-terminal Kinase (JNK) and extracellular-signal regulated kinase (ERK) contribute to Th1 and IL-10 responses, respectively. Sublingual immunization of BALB/c mice with MV140 also induces potent systemic Th1/Th17 and IL-10 responses *in vivo*. We uncover immunological mechanisms underlying the way of action of MV140, which might well also contribute to understand the rational use of specific PBPs in other clinical conditions with potential high risk of recurrent infections.

INTRODUCTION

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common bacterial infectious diseases, especially in women.^{1,2} Recurrent UTIs (RUTIs) are defined as three or more symptomatic UTIs during a year or two or more symptomatic UTIs within six months.³ The pathogen most frequently isolated from patients with UTIs is *Escherichia coli* (80% of infections), followed by *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp and *Enterococcus* spp.^{1,3,4} Antibiotics remain the mainstay of treatment for RUTIs,¹ but their overuse is associated with antibiotic-resistant infections and deleterious effects in the microbiota.⁵⁻⁷ Therefore, there is an urgent need for the

development of new alternative approaches to treat patients suffering from recurrent infections.¹

Different types of mucosal bacterial vaccines have gained a lot of attention for the treatment of RUTIs over the last years. Bacterial vaccines may contain soluble antigens (bacterial components or lysates)^{8,9} or inactivated whole bacteria from one or more species or strains.¹⁰⁻¹² Mucosal bacterial vaccines for RUTIs were initially administered orally, but more recently the sublingual delivery route has been also assayed.^{1,8,12}

The sublingual epithelium contains a dense network of dendritic cells (DCs) that play an essential role in linking innate and adaptive immune responses.^{13,14} DCs are equipped with a

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Chemistry, Complutense University, Madrid, Spain. ²Inmunotek, SL. Alcalá de Henares, Madrid, Spain and ³Department of Immunology, Hospital Clínico San Carlos and School of Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain. Correspondence: O Palomares (oscar.palomares@quim.ucm.es).

Received 10 May 2016; accepted 8 November 2016; advance online publication 14 December 2016. doi:10.1038/mi.2016.112

wide battery of pattern recognition receptors (PRRs) such as toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs), NOD-like receptors (NLRs) and RIG-I-like receptors (RLRs) as sensors of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).^{15,16} The role of TLRs and CLRs in shaping DCs innate immune responses and their capacity to polarize T cell responses has been intensely investigated.^{17–19}

MV140 (Uromune) is a polyvalent bacterial preparation (PBP) composed of equal proportions of whole heat-inactivated bacteria producing the majority of RUTIs in Europe (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*). Two retrospective observational studies have recently demonstrated that patients treated with sublingual MV140 showed a significant reduction in the number of UTIs compared to patients treated with conventional antibiotics.^{11,12} Despite relevant clinical benefits, the immunological ways of action of this PBP remain fully elusive.

In this study, we demonstrated for the first time that MV140 (Uromune) endorses human DCs with the capacity to generate Th1, Th17, and IL-10-producing T cells through mechanisms partially depending on spleen tyrosine kinase (Syk)- and myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)-mediated signaling pathways. Sublingual immunization of BALB/c mice with MV140 also promotes the generation of systemic Th1, Th17, and IL-10 immune responses *in vivo*. Our data not only shed light into the immunological mechanisms underlying the clinical benefits of MV140 for the treatment of RUTIs but also might well pave the way for the use of sublingual specific PBPs in other clinical conditions at high risk of recurrent infections.

RESULTS

MV140 induces maturation of human DCs and production of pro-inflammatory cytokines with high levels of IL-10

We assessed the capacity of the PBP MV140 (Uromune) to immunomodulate the phenotype and function of human DCs. MV140 significantly increased the expression of the co-stimulatory molecules CD83 and CD86 in human monocyte-derived DCs (hmoDCs) compared to control excipients, demonstrating that this PBP promotes the maturation of hmoDCs (**Figure 1a**). The individual gram-negative (*K. pneumoniae* V113, *E. coli* V121, and *P. vulgaris* V127) and the gram-positive (*E. faecalis* V125) bacteria also induced significantly higher levels of CD83 and CD86 than control without significant differences among them. The gram-positive V125 showed the highest induction of CD86 expression (**Figure 1a**). As expected for dendritic cells, almost all of them were HLA-DR positive and significant changes were not detected when comparing the different assayed treatments (**Supplementary Figure 1a** online). However, the analysis of MFI values revealed an increment in HLA-DR expression when hmoDCs were activated with MV140 or individual components compared to control treatment, reaching statistical significant only for V125 (**Supplementary Figure 1b**). HmoDCs activated with MV140 produced significantly higher levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-23, and TNF- α but not

IL-12 than control cells (**Figure 1b**). Interestingly, MV140-activated hmoDCs also produced significantly higher levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 than control. The individual bacterial components were also able to stimulate the production of pro-inflammatory cytokines but at a lower extent than MV140. The gram-positive component (V125) was the single bacterium able to induce significantly higher levels of IL-12 than control but without IL-10 production (**Figure 1b**). In contrast, IL-12 production was not observed in MV140-activated hmoDCs, which might be likely due to the high levels of IL-10 induced by MV140. V125 also induced significantly higher levels of TNF- α and IL-23 than control. The gram-negative *E. coli* (V121) induced significantly higher levels of IL-1 β and IL-10 than control. When comparing MV140 and individual components among them, we only detected significant differences for IL-23 (MV140 vs V127 and V125 vs V127) and for IL-10 (MV140 vs V125). Additive effects were not observed in any case when individual bacteria were combined in MV140.

MV140-activated hmoDCs generate Th1, Th17 and IL-10-producing T cells

To determine the capacity of MV140 to condition the ability of human DCs to polarize T cell responses, we cultured hmoDCs with allogeneic naive CD4⁺ T cells in the presence of MV140 or control excipients for 3 days. MV140-activated hmoDCs induced a significantly higher percentage of proliferating allogeneic CFSE-labeled CD4⁺ T cells than control-treated hmoDCs (**Figure 2a**). HmoDCs activated with MV140 generated T cells producing significantly higher levels of IL-17A, IFN- γ , and IL-10 and lower IL-5 than control-activated hmoDCs (**Figure 2b**). Naive CD4⁺ T cells stimulated alone with MV140 did not proliferate and did not produce detectable levels of any assayed cytokine (data not shown). To confirm these results, primed CD4⁺ T cells were washed and restimulated with anti-CD3 and -CD28 mAbs for 24 h. After this polyclonal re-expansion, CD4⁺ T cells generated by MV140-activated hmoDCs also produced significantly higher levels of IL-17A, IFN- γ , and IL-10 and lower IL-5 than those primed by control-treated hmoDCs (**Figure 2c**). To further verify these data at the single cell level, we performed intracellular staining experiments. Primed CD4⁺ T cells were restimulated with PMA/ionomycin in the presence of Brefeldin A. The percentages of IL-17A-, IFN- γ - and IL-10-producing CD4⁺ T cells generated by MV140-activated hmoDCs were significantly higher than those induced by control-treated hmoDCs (**Figure 2d**). We did not detect significant differences in IL-4-producing CD4⁺ T cells. Representative dot plots are displayed in **Figure 2e**. Double intracellular staining experiments showed that a significantly higher population of CD4⁺ T cells simultaneously producing IL-17A and IFN- γ was generated by MV140-activated hmoDCs than control (**Figure 2f**). Interestingly, the induced CD3⁺CD4⁺ IL-10-producing T cells did not simultaneously produce IL-17A or IFN- γ and they did not express FOXP3 or GATA3 (**Figure 2g**). MV140-treated hmoDCs induced a significant increase in

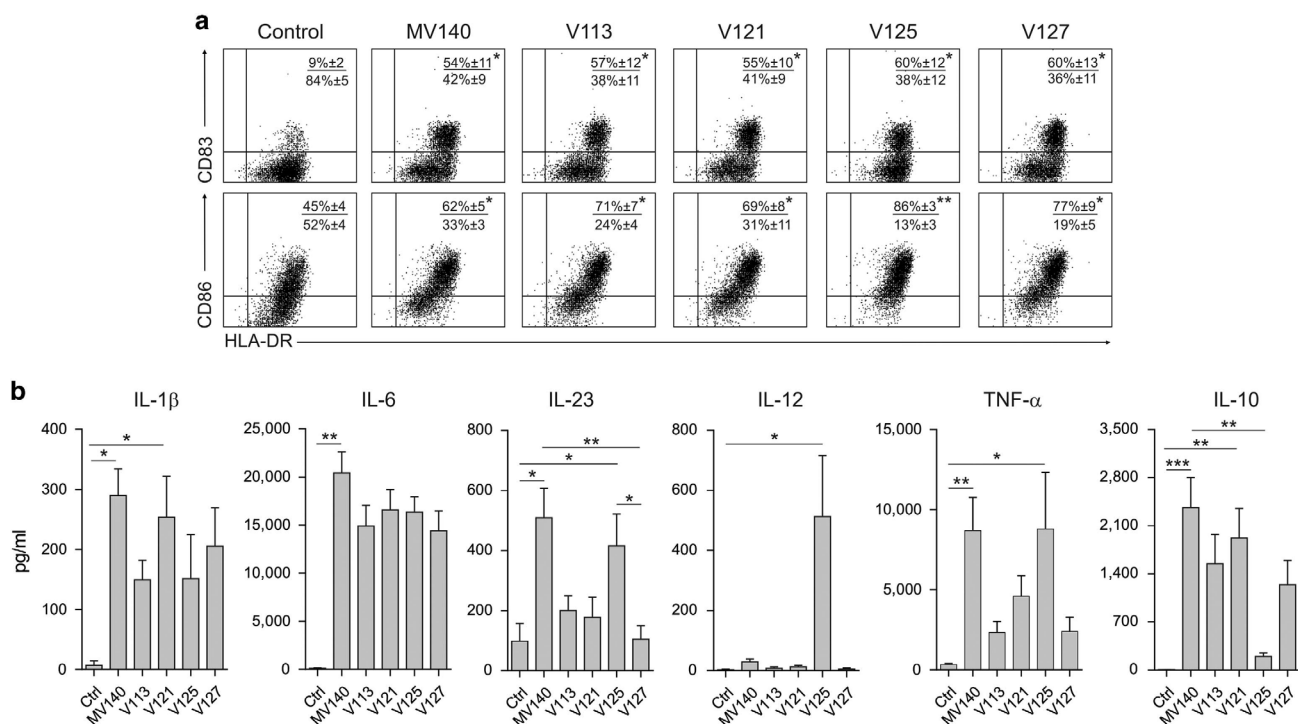


Figure 1 MV140 (Uromune) induces hmoDCs maturation and production of pro-inflammatory cytokines with high levels of IL-10. **(a)** Flow cytometry representative dot plots for the expression of the activation surface markers CD83, CD86, and HLA-DR on hmoDCs stimulated with MV140 (10^7 bact. per mL), the individual bacteria (2.5×10^6 bact. per mL) or the control for 18 h. The percentages of positive cells for the indicated markers are displayed inside the plot. **(b)** Cytokine production after stimulation of hmoDCs with the indicated stimulus for 18 h quantified in cell-free supernatants by ELISA. Ctrl, control containing all excipients except the bacteria; MV140, PBP Uromune; V113, *K. pneumoniae*; V121, *E. coli*; V125, *E. faecalis*; V127, *P. vulgaris*. Results are mean \pm s.e.m. of 4 **(a)** or 5–8 **(b)** independent experiments. Friedman test for multiple comparisons, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

FOXP3⁺ IL-10⁻ T cells but not GATA3⁺ IL-10⁻ T cells compared to control-treated hmoDCs (**Supplementary Figure 2**).

We performed the same type of coculture experiments with the individual bacteria. HmoDCs activated with gram-negative or -positive components alone also induced significantly higher percentages of proliferating allogeneic CD4⁺ T cells than control-treated hmoDCs without significant differences among them or with respect to MV140 (**Figure 3a**). The gram-negative bacteria alone (V113, V121 or V127) also generated T cells producing IL-17A, IFN- γ , and IL-10 but the levels were lower than those produced by T cells primed with MV140-activated hmoDCs and additive effects were not observed (**Figure 3b**). For IL-10 production, significant differences were detected when hmoDCs were activated with the individual gram-negative V113 and V121 components alone or MV140 compared to control and to V125. T cells primed with V125-activated hmoDCs produced significantly higher levels of IFN- γ than control cells without IL-10 production (**Figure 3b**).

MV140-activated total blood DCs containing mDCs and pDCs produce pro- and anti-inflammatory cytokines and induce Th1, Th17, and IL-10-producing T cells

We isolated an enriched fraction of human total DCs containing both mDCs and pDCs from peripheral blood (**Figure 4a**). MV140-activated total DCs produced high levels

of the pro-inflammatory and Th17-polarizing cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-23, as well as the Th1-polarizing cytokine TNF- α but not IL-12 (**Figure 4b**). As shown in this figure, MV140-activated total DCs also produced high levels of IL-10. Interestingly, coculture experiments with allogeneic naive CD4⁺ T cells demonstrated that MV140- but not control-activated total blood DCs also generated T cells producing high levels of IL-17A, IFN- γ , and IL-10 (**Figure 4c**). Differences in IL-5 production were not observed. After restimulation with anti-CD3 and -CD28 mAbs for 24 h, CD4⁺ T cells primed by MV140-activated total blood DCs also produced higher levels of IL-17A, IFN- γ , and IL-10 than those primed by total DCs stimulated with control excipients (**Figure 4d**).

Syk-coupled CLRs in cooperation with MyD88-coupled TLRs are the main drivers of the immune responses imprinted by MV140 in human DCs

Syk and MyD88 are key molecules in the initiation of downstream signaling pathways after engagement of CLRs and TLRs, respectively.^{18,19} To assess the contribution of these PRRs to the cytokine signature imprinted by MV140 in hmoDCs, we performed inhibition experiments using piceatannol (a selective pharmacological inhibitor of Syk) and/or pepinh-MYD (an intracellular peptide blocking MyD88-mediated signaling pathways). The production of the Th17-driven cytokines IL-1 β and IL-23 by MV140-activated

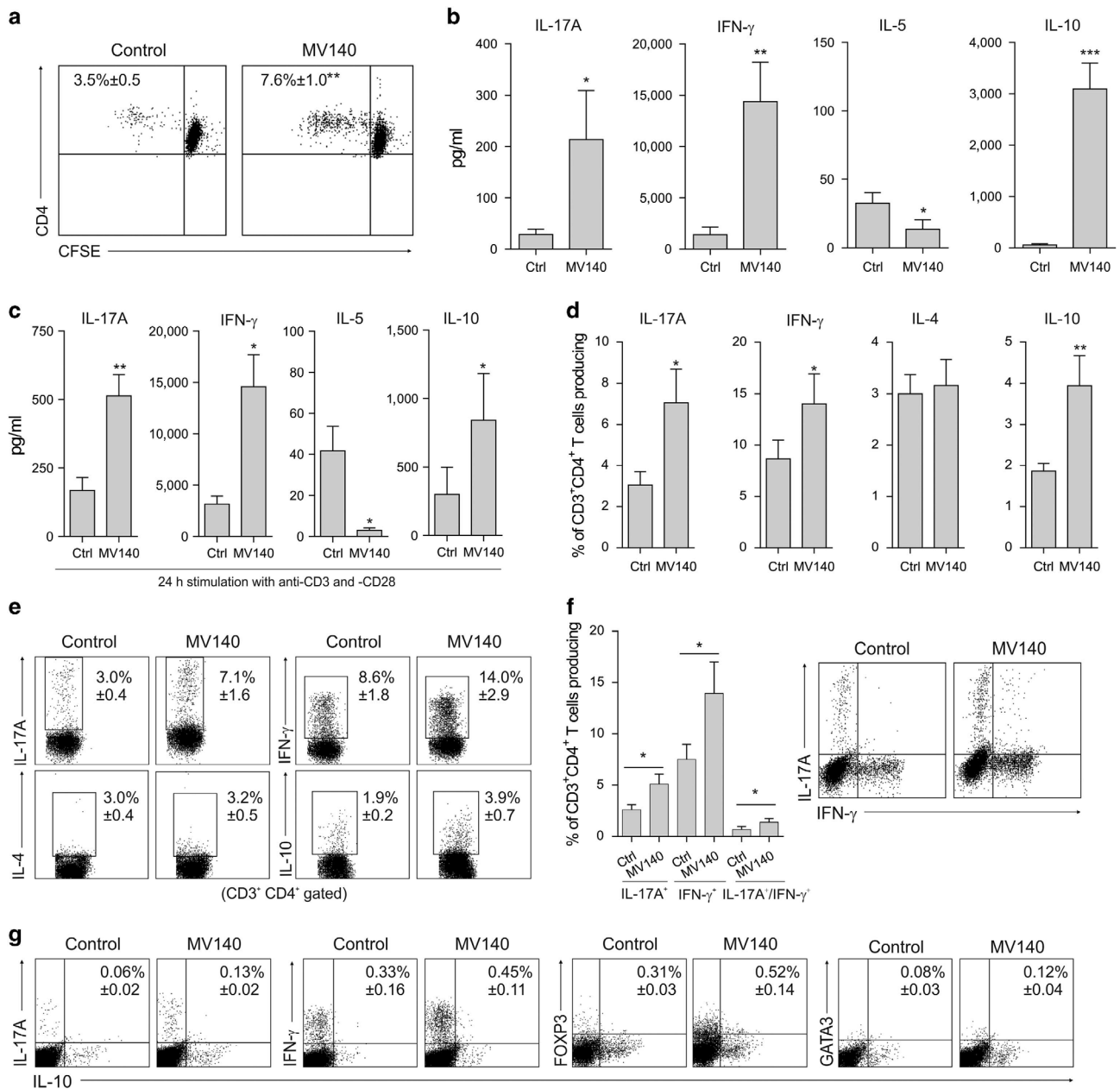


Figure 2 MV140-activated hmoDCs induce T cell proliferation and the generation of Th1, Th17 and IL-10-producing T cells. **(a)** Representative dot plot of proliferating CFSE-labeled naive CD4⁺ T cells after 3 days of coculture with control- or MV140-activated allogeneic hmoDCs. The frequency of proliferating cells is displayed inside the plot. **(b)** Cytokines produced by allogeneic naive CD4⁺ T cells primed by control- or MV140-activated hmoDCs after 3 days quantified in cell-free supernatants by ELISA. **(c)** Cytokines produced after polyclonal stimulation with anti-CD3 and -CD28 mAbs for 24 h were quantified in cell-free supernatants by ELISA. **(d)** After 3 days of coculture, primed T cells were washed and stimulated for 6 h with PMA/ionomycin in the presence of Brefeldin A. Percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells producing the indicated cytokines after intracellular staining and flow cytometry analysis are shown. **(e)** Representative dot plots for the intracellular staining and flow cytometry analysis. **(f)** Percentage of CD3⁺CD4⁺ T cells producing IL-17A, IFN- γ or IL-17A and IFN- γ simultaneously after intracellular staining and flow cytometry analysis. A representative dot plot is shown. **(g)** Representative dot plots for the intracellular staining and flow cytometry analysis of the indicated markers. Results are mean \pm s.e.m. of 8 **(a)**, 11–17 **(b)**, 4–6 **(c)**, 7–11 **(d)**, 5 **(f)** or 3 **(g)** independent experiments. Ctrl, control; MV140, PBP Uromune. Paired *t*-test, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

hmoDCs was significantly impaired (around 75% of inhibition) when cells were simultaneously preincubated with piceatannol and pepinh-MYD (**Figure 5a**). This effect was mainly driven by piceatannol for both cytokines (around 55% inhibition) with similar additive effects observed in the presence of pepinh-

MYD. For IL-6, the same tendencies were observed but with lower percentages of inhibition (around 45%) than for IL-1 β and IL-23. These results point out Syk-coupled CLR as the main drivers of the Th17 responses induced by MV140-activated human DCs with cooperation of MyD88-coupled

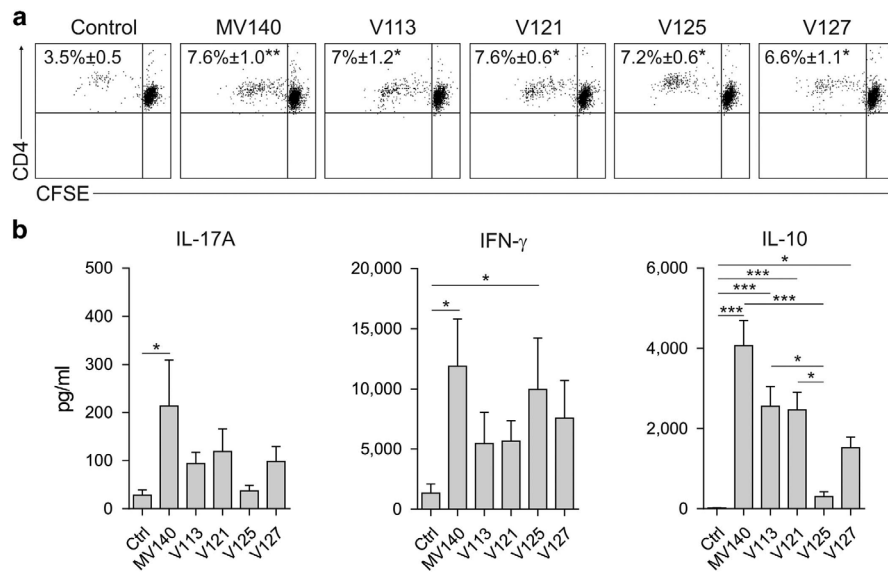


Figure 3 Contribution of the individual bacterial components of MV140 to polarize T cell responses. **(a)** Representative dot plots of proliferating CFSE-labeled naive CD4⁺ T cells after 3 days of coculture with allogeneic hmoDCs in the presence of MV140, the individual bacterial components alone or the control. The frequency of proliferating cells is displayed inside the plot. **(b)** Cytokines produced by allogeneic naive CD4⁺ T cells primed by hmoDCs activated by the indicated stimulus after 3 days quantified in cell-free supernatants by ELISA. Results are mean ± s.e.m. of 5–6 **(a)** or 5–10 **(b)** independent experiments. Ctrl, control; MV140, PBP Uromune; V113, *K. pneumoniae*; V121, *E. coli*; V125, *E. faecalis*; V127, *P. vulgaris*. Kruskal–Wallis for multiple comparison, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.

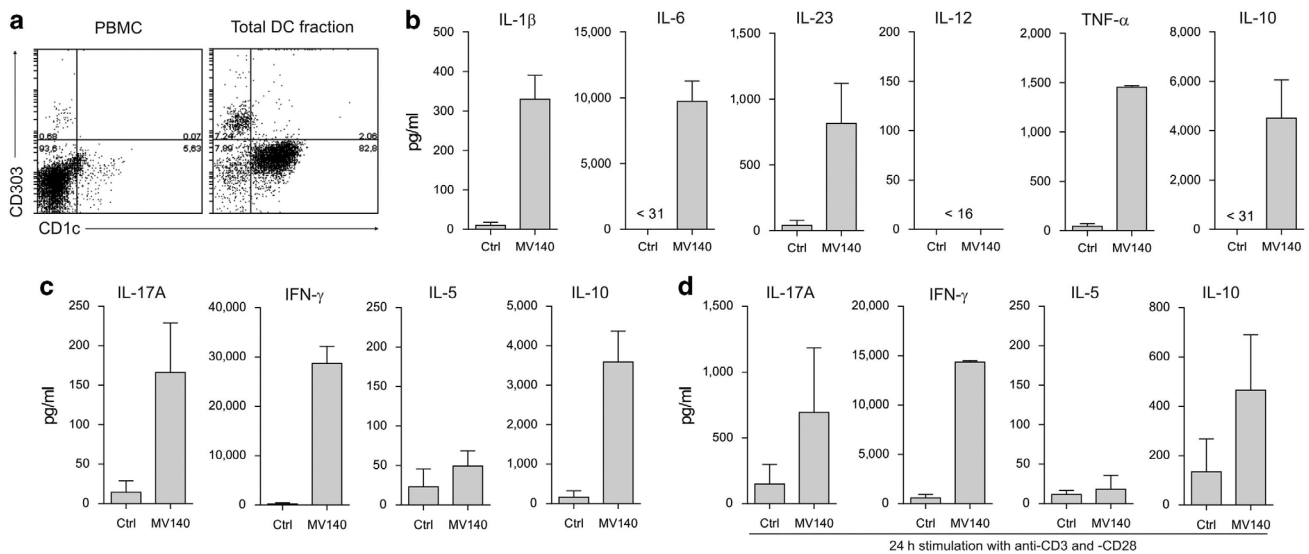


Figure 4 MV140 immunomodulates the function of human total blood DCs to generate Th1, Th17, and IL-10-producing T cells. **(a)** Representative dot plots of the different DC subsets contained in PBMCs and the enriched total DC fraction gating on HLA-DR⁺ CD19⁻ cells. HLA-DR⁺ CD303⁺ pDCs and HLA-DR⁺ CD1c⁺ mDCs are shown. **(b)** Cytokine production by the enriched total DC fraction after 18 h stimulation with MV140 or control quantified by ELISA. **(c)** Cytokines produced by allogeneic naive CD4⁺ T cells primed by control- or MV140-activated total DCs after 3 days quantified by ELISA. **(d)** After 3 days of coculture in the indicated conditions, primed T cells were washed and stimulated with anti-CD3 and -CD28 mAbs for 24 h. Cytokines produced after this polyclonal stimulation were quantified by ELISA. Results are mean ± s.e.m. of two independent experiments. Ctrl, control; MV140, PBP Uromune.

TLRs. Interestingly, piceatannol significantly blocked also the production of IL-10 (around 76% inhibition). Pepinh-MYD induced significant inhibition of IL-10 production (around 30%) but additive effects were not observed (**Figure 5a**), indicating that Syk-coupled CLR are the main contributors to

IL-10 production. Around 25% inhibition of TNF-α production was observed when cells were incubated with piceatannol or pepinh-MYD (**Figure 5a**). Incubation with both inhibitors resulted in around 40% inhibition, suggesting that additional pathways might also contribute to the

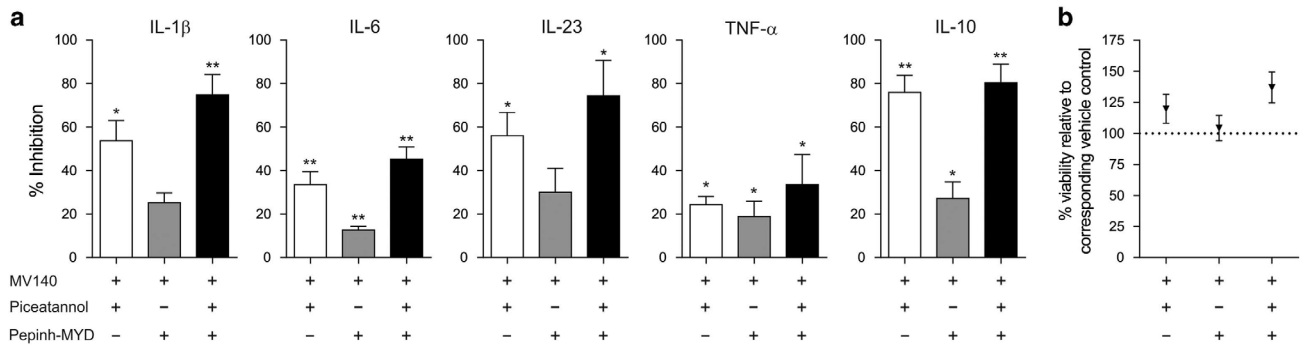


Figure 5 Involvement of Syk- and MyD88-mediated signalling pathways in the immune responses induced by MV140 in human DCs. (a) Inhibition of cytokine production by MV140-activated hmoDCs by the indicated inhibitors related to vehicle controls. (b) Percentage of viability for each assayed condition respect to each vehicle control by using trypan blue exclusion. Results are mean ± s.e.m. of 5–10 (a) or 5 (b) independent experiments. Paired *t*-test **P*<0.05, and ***P*<0.01.

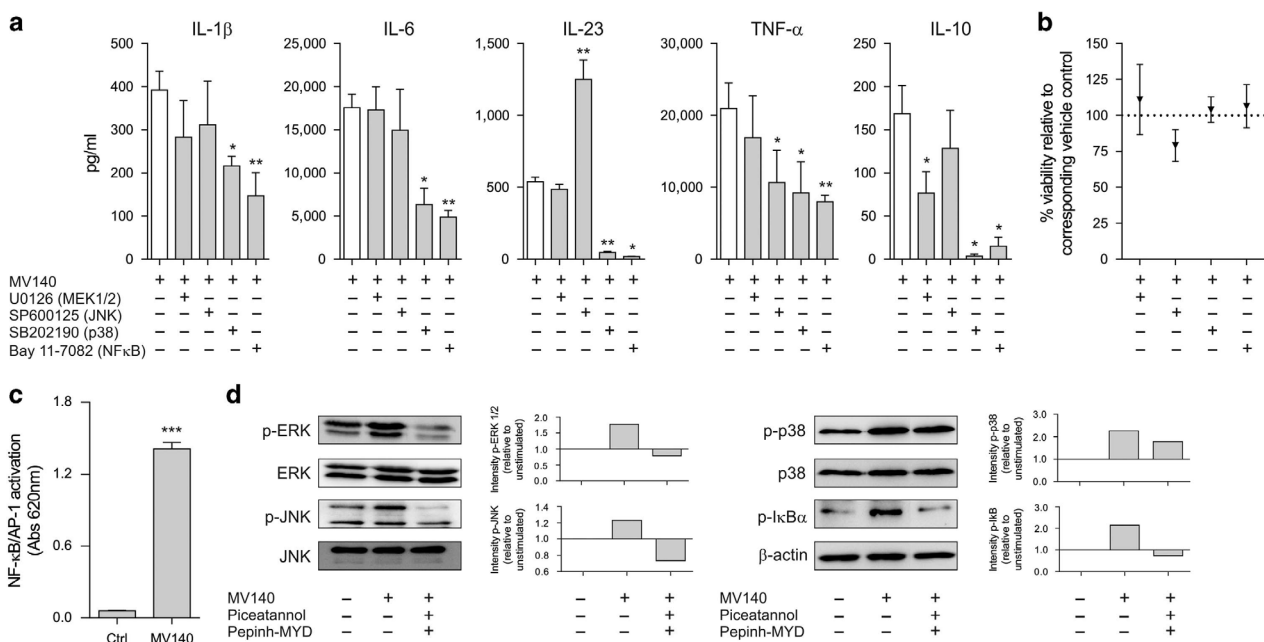


Figure 6 MAPKs and NF-κB differentially contribute to the mechanisms of action of MV140. (a) Cytokine production by MV140-activated hmoDCs in the presence of the indicated inhibitors. (b) Percentage of viability for each assayed condition respect to each vehicle control by using trypan blue exclusion. (c) Control- or MV140-induced NF-κB/AP-1 activation in THP1-XBlue cells after 18 h of incubation. (d) Western blot analysis of protein extracts from THP1 cells stimulated for 15 min in the indicated conditions and quantification of the reactive phosphorylated bands by scanning densitometry. One representative example out of 3 is shown. β-actin was used as a loading control. Results are mean ± s.e.m. of 4–6 (a and b) or 6 (c) independent experiments. Ctrl, control; MV140, PBP Uromune. Paired *t*-test, **P*<0.05, ***P*<0.01, and ****P*<0.001.

production of TNF-α. Cell viability was not significantly affected in any of the assayed conditions (Figure 5b). A slight cell viability increase was observed in the presence of piceatannol both when incubated alone or together with pepinh-MYD.

CLRs- and TLRs-mediated activation of MAPKs and NF-κB differentially contribute to the mechanisms of action of MV140 in human DCs

To gain further insights into the molecular mechanisms involved in the mode of action of MV140, we assayed the cytokine signature of MV140-activated hmoDCs in the

presence of specific pharmacological inhibitors for mitogen-activated protein kinases (MAPK) (extracellular-signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal Kinase (JNK) and p38) and nuclear factor κB (NF-κB). U0126, a specific pharmacological inhibitor of MEK 1/2 (upstream of ERK 1/2), significantly inhibited the production of IL-10 without affecting the production of any other Th17- or Th1-polarizing cytokines (Figure 6a). The JNK inhibitor SP600125 significantly impaired the production of TNF-α without modifying the levels of IL-10, IL-1β or IL-6. Remarkable, the inhibition of JNK resulted in the significant increment of IL-23 production by MV140-activated hmoDCs, suggesting a potential blocking

effect of this pathway in Th17 cell generation. The inhibition of p38 significantly reduced the production of Th17- and Th1-polarizing cytokines as well as IL-10 by MV140-activated hmoDCs. Interestingly, the production of IL-23 and IL-10 was nearly abolished by SB202190 p38 inhibitor (**Figure 6a**). Bay 11-7082, a pharmacological inhibitor of NF- κ B, significantly impaired the production of all the assayed cytokines and nearly abolished the induction of IL-23 and IL-10 (**Figure 6a**). Cell viability was not significantly affected in any case and only a slight decrease (around 20%) in cell viability was observed for JNK inhibitor SP600125 (**Figure 6b**).

Next, we studied the capacity of MV140 to induce the activation of MAPKs and NF- κ B at the protein level in THP1 cells and the contribution of CLRs and TLRs. MV140-induced significant activation of the transcription factors NF- κ B/AP-1 in the THP1-XBlue reported cell line (**Figure 6c**). MV140 rapidly induced activation of the MAPKs ERK1/2 (phosphorylation of Thr202/Tyr204), JNK (phosphorylation of Thr183/Tyr185), and p38 (phosphorylation of Thr180/Tyr182), as well as NF- κ B as determined by the phosphorylation of the inhibitor I κ B α at Ser32/36 in THP1 cells (**Figure 6d**). The activation of ERK, JNK, and NF- κ B was completely abolished by simultaneous inhibition with piceatannol and pepinh-MYD. In contrast, the activation of p38 was only partially impaired by these inhibitors (**Figure 6d**).

Sublingual immunization of BALB/c mice with MV140 induces the generation of systemic Th1, Th17, and IL-10 immune responses *in vivo*

To assess the *in vivo* relevance of our findings we subjected BALB/c mice to sublingual immunization with MV140 or control excipients following the protocol showed in **Figure 7a**. The responses induced systemically were analyzed after *in vitro* stimulation of splenocytes isolated from each group (**Figure 7a**). Spleen CD4⁺ T cells from mice immunized sublingually with MV140 or control excipients showed significantly higher proliferation rates after *in vitro* stimulation with MV140 than control (**Figure 7b**). Splenocytes from mice immunized with MV140 or control excipients produced significantly higher levels of IFN- γ and IL-10 after *in vitro* stimulation with MV140 than control (**Figure 7c**). IL-17A production was only observed after MV140 *in vitro* stimulation of splenocytes from MV140 immunized mice (**Figure 7c**). Interestingly, the proliferation rates and the levels of IL-17A, IFN- γ and IL-10 produced by splenocytes from mice sublingually immunized with MV140 were significantly higher than those produced by splenocytes from control mice after *in vitro* stimulation with MV140 (**Figure 7b,c**). IL-5 production was not detected in any assayed condition (data not shown). When analyzing cells isolated from inguinal lymph nodes we observed similar responses to those reported for spleen (**Figure 7d,e**). Although we did not detect significant proliferation or IL-17, IFN- γ and IL-10 production in isolated bladder cells (**Supplementary Figure 3**), a significant production of TNF- α was detected in bladder cells from

MV140 immunized mice compared to control group after MV140 stimulation (**Supplementary Figure 3b**).

DISCUSSION

In this study, we shed light into the immunological mechanisms by which MV140 (Uromune) might exert beneficial clinical effects for the treatment of RUTIs. We demonstrated that MV140 primes human DCs to generate Th1, Th17 and IL-10-producing T cells. None of the individual bacterial components included in this PBP fully mimicked the final outcomes imparted by MV140, suggesting that all the components are required to drive the observed immune responses. MV140 initiates Syk- and MyD88-mediated downstream signaling pathways that culminate in the activation of MAPKs and NF- κ B in human DCs. Syk-coupled CLRs seem to be the main drivers of Th17 and IL-10 immune responses in cooperation with MyD88-coupled TLRs. Both CLRs and TLRs contribute to the production of Th1-driving cytokines by human DCs but other PRRs might well also play a role. MV140-induced activation of NF- κ B and p38 is essential for the generation of Th1/Th17 and IL-10 immune responses by human DCs whereas JNK and ERK significantly contribute to Th1 and IL-10 responses, respectively. We also showed that sublingual immunization of BALB/c mice with MV140 promotes the generation of systemic Th1, Th17 and IL-10 immune responses *in vivo*.

RUTIs are among the most prevalent bacterial infections and represent the second leading cause of community-acquired and nosocomial infections. Currently, antibiotics are still the main therapeutic option used for the treatment of RUTIs.^{1,2} However, the overuse of antibiotics in humans has been associated with the increase in antibiotic-resistant infections, which represents a major public health concern worldwide that menaces the effective prevention and treatment of a wide range of infections caused by bacteria, parasites, viruses and fungi.^{20,21} Other negative factors associated to the overuse of antibiotics include horizontal gene transfer, limitation in terms of diversity of action spectra and deleterious effects in microbiota, which enhance pathogen invasion and subsequent fungal superinfections.^{6,7} Therefore, alternative approaches for the treatment of recurrent infections in general, and RUTIs in particular are fully demanded. Among these alternatives, the development of mucosal bacterial vaccines has received a lot of attention over the last years.¹ Different studies suggest that formulations based on PBPs of inactivated whole cells represent suitable vaccines able to induce more potent and effective immune responses than bacterial lysates.^{22,23} In contrast to oral administration, sublingual immunization protects the PBPs from gastrointestinal degradation and induces strong and durable immune responses not only locally but also in peripheral lymphoid organs and distant mucosal tissues, such as the urinary tract.^{24,25} Sublingual MV140 is a PBP composed of whole heat-inactivated bacteria showing clinical efficacy for the treatment and prevention of RUTIs.^{11,12} Despite these relevant clinical benefits, the immunological ways of action and the molecular mechanism by which MV140 could modulate the

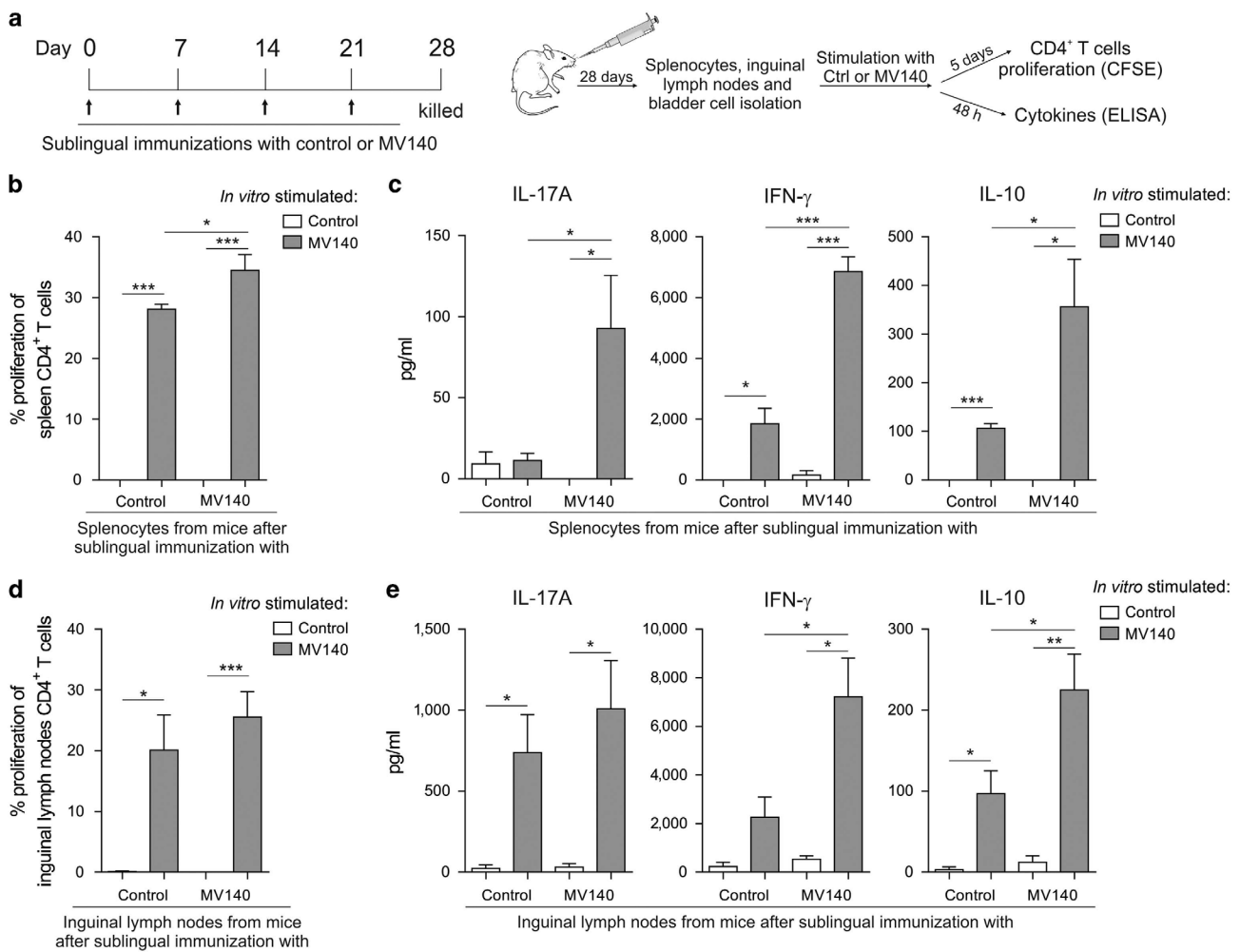


Figure 7 Induction of Th1, Th17 and IL-10 immune responses after *in vivo* MV140 sublingual immunization of BALB/c mice. **(a)** Scheme of the sublingual immunization protocol and analysis of induced systemic responses. **(b)** Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺ T cells from splenocytes or **(d)** inguinal lymph nodes isolated from mice immunized sublingually with MV140 or control after *in vitro* stimulation with MV140 or control. **(c)** Cytokine production (IL-17A, IFN- γ and IL-10) by splenocytes or **(e)** inguinal lymph node cells isolated from mice immunized sublingually with MV140 or control and stimulated *in vitro* with MV140 or control. Results are mean \pm s.e.m. of 7–8 **(b)** or 4 **(c, d, and e)**. Ctrl, control containing all excipients except the bacteria; MV140, PBP Uromune. Unpaired *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

function of DCs and their capacity to polarize T cell responses remained fully unknown prior to this study.

Herein, we showed that MV140 directly acts on human DCs to induce maturation and production of pro-inflammatory cytokines and high levels of IL-10. Among pro-inflammatory cytokines, Th17- (IL-1 β , IL-6, and IL-23) or Th1-driving (TNF- α) cytokines were produced, which could justify the capacity of MV140-activated human DCs to generate mixed Th1, Th17, and IL-10-producing T cell responses. Depending on the encountered antigens and surrounding environment, DCs can integrate different signaling pathways and polarize distinct effector Th or regulatory T (Treg) cells using a wide battery of soluble and membrane-bound factors.^{26–30} This function is of paramount importance to protect the organism against potentially dangerous pathogens while keeping homeostasis and tolerance to innocuous and self-antigens.^{29,31–33} MV140-induced Th1 and Th17 cells could contribute to clear

intracellular and extracellular pathogens whereas the IL-10-producing T cells could control excessive immune responses, avoid deleterious consequences for the tissues and contribute to pathogen clearance by keeping homeostasis.^{34–36} Our data suggest that the generated IL-10-producing T cells could phenotypically correspond to induced type 1 regulatory T cells (Treg1). Our experiments with the individual bacterial components of MV140 uncovered that none of them fully mirror the tuned immune responses imprinted by this PBP. There were no additive effects in any case, suggesting that the final outcomes arise from the integration of the signals that all the bacterial components of MV140 simultaneously trigger in human DCs. At this regard, compelling experimental evidence showed cross-talk and pathways interactions among different pattern recognition receptors, including TLRs and CLR. In addition, for the particular case of CLR (a main contributors of the reported effects for MV140) it is described that the strength

and duration of signaling and induced functional responses not only depend on the type of targeted CLR but also on the specific features of the ligand, such as low or high affinity, soluble or particulate and particle size.^{18,38} For example, the gram-positive bacterium (*E. faecalis* V125) was the only individual component inducing the production of significant levels of the Th1-polarizing cytokines IL-12 and TNF- α without IL-10 production in hmoDCs. In contrast, MV140-activated hmoDCs only produced TNF- α but not IL-12, which could be justified by the high levels of IL-10 induced by MV140. Supporting these data, it has been previously reported that IL-10 is able to inhibit IL-12 production by different mechanisms.³⁹ Significant high levels of IFN- γ -producing T cells were only induced by MV140- or V125-activated hmoDCs but not by individual gram-negative bacteria, supporting a relevant role of V125 for Th1 polarization.

CLRs and TLRs are PRRs that play very important roles in shaping proper immune responses in human DCs.^{18,19} Syk-coupled CLRs signaling induces PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B and inflammasome activation.^{37,40,41} After engagement of TLRs, MyD88-dependent downstream signaling pathways activate MAPK and NF- κ B.^{17,19} Our Syk and MyD88 inhibition experiments in MV140-activated human DCs pointed out CLRs as the main drivers of Th17 and IL-10 immune responses in cooperation with TLRs. In addition, other PRRs might be involved in the generation of Th1 immune responses. ERK, JNK and p38 MAPKs differentially regulate phenotypic and functional maturation, cytokine production and T cell polarization capacity of human DCs.^{42,43} Similarly, NF- κ B is also a crucial transcription factor in the control of immune responses in DCs.^{44,45} We showed that in MV140-activated human DCs NF- κ B and p38 are essential for Th1/Th17 and IL-10 immune responses, whereas ERK and JNK significantly contribute to IL-10 and Th1 responses, respectively. These data are in accordance with previous studies showing that p38 and to a lesser extent JNK signaling pathways positively regulate functional maturation and cytokine production in human DCs, whereas ERK might favor IL-10 production.^{42,46–48} Our data also showed that MV140-mediated ERK/JNK and NF- κ B activation should be fully induced by CLRs and TLRs. Although additional signaling pathways might also contribute to p38 activation, our data on IL-10 and IL-23 inhibition by piceatannol suggest that Syk-mediated pathways might be indispensable for the functional activation of this MAPK.

In humans, circulating blood mDCs and pDCs represent specialized subsets of DCs that display a different repertoire of receptors and cytokine signature after antigen stimulation.⁴⁹ mDCs and pDCs play distinct but complementary roles in the initiation and maintenance of proper immune responses.³¹ We showed that an enriched fraction of human total blood DCs containing both mDCs and pDCs activated with MV140 also generates Th1, Th17, and IL-10 immune responses, suggesting the potential *in vivo* relevance of these findings. Supporting these data, *in vivo* sublingual immunization of mice with MV140 also promotes the generation of potent systemic Th1, Th17, and IL-10 immune responses, indicating that these

immunological mechanisms might well play a very important role in the reported beneficial therapeutic effects of this PBP to treat RUTIs in humans.^{11,12} Although responses were not observed in bladder after *in vitro* stimulation, sublingual immunization with MV140-induced potent local immune responses in pelvic lymph nodes, suggesting that proper local responses might well be mounted upon bladder reinfection. Moreover, the fact that a significant production of TNF- α was detected in bladder cells from MV140 immunized mice compared to control group after MV140 stimulation raises the possibility of mucosal trained immunity mechanisms after MV140 immunization.⁵⁰

In conclusion, our data shed light into the immunological mechanisms underlying the clinical benefits reported for MV140 for the treatment of RUTIs. This study uncovers the potential way of action of MV140, which might well also contribute to understand the rational use of specific PBPs in other clinical conditions with potential high risk of recurrent infections.

METHODS

Media and reagents. RPMI 1640 (Lonza) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g ml⁻¹ normocin, 50 μ g ml⁻¹ penicillin-streptomycin, 1% non-essential aminoacids, 1% MEM-vitamins and 1 mM sodium pyruvate (cRPMI). For experiments with THP1 cells, also glucose up to 4.5 g l⁻¹ was added. In addition, 200 μ g ml⁻¹ zeocin (InvivoGen) was added when using THP1-XBlue. PBP MV140 (Uromune) composed of heat-inactivated bacteria (25% *E. coli*, 25% *P. vulgaris*, 25% *K. pneumoniae*, and 25% *E. faecalis*), negative control (containing all excipients without bacteria) and each individual bacterium were provided by Immunotek S.L. Inhibitors for Syk (piceatannol) (Enzo), MyD88 (Pepinh-MYD), p38 (SB202190), JNK (SP600125), and MEK 1/2 (U0126) (InvivoGen) were used for the inhibition experiments.

Generation of hmoDCs, purification of naive CD4⁺ T cells and isolation of total DC fraction. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from buffy coats of healthy donors by Ficoll density gradient centrifugation (800g, 20 min). Immature hmoDCs were generated from blood monocytes obtained from total PBMCs using anti-CD14 microbeads and cultured for 6 days with cRPMI medium containing 100 ng ml⁻¹ of IL-4 and GM-CSF (PeproTeck, Rocky Hill, NJ). The purity and phenotype of monocytes and generated immature hmoDCs were analyzed by flow cytometry with lineage-specific markers. Peripheral blood naive CD4⁺ T cells were isolated using the “Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit” (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and total dendritic cell fraction was obtained from BMC with “Blood Dendritic Cell Isolation Kit II” (Miltenyi Biotec), according to manufacturer’s protocol.

Cell cultures. Immature hmoDCs or human total blood DC enriched fraction (10⁶ cells per mL) were stimulated with control, MV140 (10⁷ bact. per mL), or the individual bacterial components (2.5 · 10⁶ bact. per mL) for 18 h. Subsequently, cells were collected and centrifuged. Cell pellets were used to analyze their phenotype by flow cytometry and cell-free supernatants were used to quantify IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-12, TNF- α and IL-10 by ELISA. For inhibition experiments, hmoDCs were preincubated for 2 h with Pepinh-MYD (25 μ M) or for 30 min with piceatannol (25 μ M), U0126 (1 μ M), SB202190 (1 μ M) or SP600125 (10 μ M) (or their vehicle controls, Pepinh-Control or DMSO) prior to activation. Then, the cells were stimulated with MV140 (10⁷ bact. per mL) for 4 h in the presence of the corresponding inhibitors to quantify IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α , and IL-10 in cell-free supernatants by

ELISA. Cell viability was analyzed in all the cases by trypan blue exclusion with a light microscope.

Flow cytometry. The following anti-human monoclonal antibodies (mAbs) were used for flow cytometry: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-HLA-DR and anti-CD1c; allophycocyanin (APC)-conjugated anti-HLA-DR and anti-CD83; phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD86 and anti-CD303; peridinin-chlorophyll-protein (PerCP)-conjugated anti-CD14 and anti-CD4 (Myltenyi Biotec). APC-conjugated anti-CD3; Alexa Fluor 488-conjugated anti-IFN γ and anti-IL-4 (BD Pharmingen, San Jose, CA). PE-conjugated anti-IL-10 and anti-IL-17A; PE/Cy7-conjugated anti-CD19; Alexa Fluor 488-conjugated anti-IL-17A, anti-FOXP3 and anti-GATA3 (Biolegend, San Diego, CA). Cells were washed with PBS/EDTA 2 mM/0.5% BSA and stained for 15 min at room temperature in the darkness. The corresponding isotype controls were included in each staining (IgG2A-FITC, IgG1-PE, IgG2A-PerCP, or IgG1-APC). Flow cytometry analysis was performed in a FACSCalibur in the Cytometry and Fluorescence Microscopy Unit at Complutense University of Madrid.

Cytokine quantification. Concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-12p70, TNF- α , IL-10, IFN- γ , and IL-5 in cell-free supernatants were quantified by sandwich ELISA using specific ELISA cytokine kits for each one (BD Biosciences, San Jose, CA). IL-23 and IL-17A levels were quantified by Human IL-23 ELISA Ready-SET-Go! (e-Biosciences) and quantikine Elisa Kit (RD Systems), respectively. In all cases, manufacturer's instructions were followed with minor modifications.

Coculture experiments. Immature hmoDCs or human total blood DC enriched fraction were cocultured with purified allogeneic naive CD4⁺ T cells (DC/T cell ratio of 1:5) for 3 days in the presence of the control, MV140 (10⁷ bact. per mL) or the individual bacterial components (2.5 \times 10⁶ bact. per mL). IL-17A, IFN- γ , IL-5 and IL-10 were quantified in cell-free supernatants by ELISA. For polyclonal restimulation, T cells were washed and incubated with 1 μ g ml⁻¹ of plate-bound anti-CD3 and 1 μ g ml⁻¹ of soluble anti-CD28 mAb at a concentration of 10⁶ cells per mL for 24 h. For intracellular cytokine production, the primed CD4⁺ T cells were washed and restimulated with 25 ng ml⁻¹ PMA plus 1 μ g ml⁻¹ ionomycin for 6 h. 10 μ g ml⁻¹ brefeldin A was added during the last 4 h. Cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The cells were stained with the combination of fluorochrome-labeled mAbs to IL-17A, IFN- γ , IL-4, and IL-10. For analysis of FOXP3 and GATA3 expression in human T cells primed with DCs, a double permeabilization was performed and cells were stained with anti-human FOXP3-Alexa Fluor 488 or GATA3-Alexa Fluor 488 (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. For proliferation assays, purified allogeneic naive CD4⁺ T cells were labeled with CFSE (Molecular Probes, Europe) according to standard protocols prior to coculture with immature hmoDCs. Proliferation was assessed by measuring CFSE dilution on labeled CD4⁺ T cells by flow cytometry.

THP1 and THP1-XBlue. Human monocytic THP1 and THP1-XBlue cell lines (InvivoGen) were maintained in supplemented RPMI medium. THP1-XBlue cells were cultured (10⁶ cells per mL) with control or MV140 (10⁷ bact. per mL) for 18 h. To determine NF- κ B/AP-1 activation, 20 μ L of the supernatant were added to 180 μ L of QUANTI-Blue. The mixture was incubated at 37 °C and the optical density was read with an ELISA EZ Read 400 Microplate Reader (Biochrom).

Western blot analysis. THP1 cells were used for western blotting analysis. THP1 cells (10⁶ cells per mL) were incubated with control or MV140 (10⁷ bact. per mL) for 15 min prior to cell lysis and protein extraction. Cell lysis was carried out with PBS/Triton 1% in the presence of 1 mM PMSF (Sigma), 1 μ g ml⁻¹ Leupeptin (Bachem) and Aprotinin (Roche) for 30 min at 4 °C with vortex every 10 min. Lysates were clarified by centrifugation at 10,000g for 15 min at 4 °C. Protein

quantification was performed with Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions and samples with equal amounts of total protein were resolved in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes. For western blotting, after 1 h of incubation in blocking buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5 (TBS-T) with 5% BSA), membranes were incubated overnight at 4 °C with the corresponding primary antibodies. Then, membranes were washed with TBS-T and incubated with the corresponding secondary antibody for 1 h at room temperature. After washing, the signal was developed with Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA) and detected in a Fujifilm LAS-3000 developer (Tokyo, Japan). The following primary anti-human antibodies were from Cell Signaling (Danvers, MA) and used at a 1:1,000 dilution: mouse anti-phospho- κ B α (Ser32/36), rabbit anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), rabbit anti-ERK1/2, rabbit anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), rabbit anti-p38 MAPK, mouse anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), rabbit anti-SAPK/JNK. Mouse anti-human anti- β -actin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was used at a 1:15,000 dilution. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (1:2,500, Pierce) or goat anti-rabbit (1:3000, BIORAD) were used as secondary antibodies.

Sublingual immunization of mice with MV140 or control, quantification of CD4⁺ T cells proliferation and cytokine signature of *in vitro* stimulated splenocytes, bladder and lymph nodes cells with MV140 or control. BALB/c mice (6-weeks-old) were immunized four times with 10 μ L of MV140 (10⁹ bact./mL) or control (all excipients without bacteria) by sublingual administration every 7 days and killed 7 days after the last immunization. Sublingual administration was performed under anesthesia (ketamine, 100 mg kg⁻¹ and xylazine, 5 mg kg⁻¹) to ensure proper delivery. Spleens were used to prepare single cell suspensions following conventional protocols. Pelvic lymph nodes (inguinal) and bladder were treated apart in RPMI containing penicillin/streptomycin and HEPES buffer and digested with 67 μ g ml⁻¹ Liberase (Roche, Mannheim, Germany) and 20 μ g ml⁻¹ DNase I (Sigma) for 20 min while rotating. The digestion was then stopped with 10% fetal bovine serum (FBS) and 5 μ M EDTA. Finally, lymph nodes were disaggregated by mashing through 100 μ m nylon cell strainer. Cells were labeled with CFSE and stimulated *in vitro* with MV140 (10⁸ bact. per mL) or control for 5 days. Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺ T cells was monitored by flow cytometry. Cells were *in vitro* stimulated for 48 h with MV140 (10⁷ bact. per mL) or control and cytokine production (IL-17A, IFN- γ , IL-5, and IL-10) measured by flow cytometry in cell-free culture supernatants using a commercial kit (CBA: cytometric bead array) from BD Biosciences following manufacturer's recommendations. Animals were maintained in Biolab S.L. under the conditions stabilized by the R.D. 53/2013 and in accordance with the international GLP normative, RD 223/83 and ISO 10993-2:2007. The tests are performed in accordance with official methods, European Pharmacopoeia, USP Pharmacopoeia, OECD Guideline, UNE EN-ISO, and specific methodologies developed for R&D.

Statistics. All the data are expressed as mean \pm s.e.m. of the indicated parameters. Statistical differences were determined with the paired or unpaired Student's *t*-test as indicated in each figure using GraphPad Prism software, version 6.0. Friedman test or Kruskal-Wallis test were used for multiple comparison. Significance was defined as **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

SUPPLEMENTARY MATERIAL is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/mi>

ACKNOWLEDGMENTS

O.P. is a Ramon y Cajal Scholar funded by MINECO and the European Social Fund. Our laboratories are supported by grants SAF-2014-52706 to O.P. from MINECO, Spain and Inmunotek S.L. We thank to Irene Soria and Juan López-Relaño for excellent technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the study: O.P. Performed all the human experiments: C.B.-V. and C.C. Designed and performed the animal experiments: J.L.S. and C.M.D.-R. Analyzed and discussed the data: C.B.-V., C.M.D.-R., J.L.S., and O.P. Contributed reagents/materials/analysis tools: M.C., J.L.S. and O.P. Wrote the paper: O.P. and C.B.-V. All the authors read and approved the final manuscript.

DISCLOSURE

J.L.S. is the founder of Immunotek SL and shareholder together with M.C. The rest of authors declare no conflict of interests.

Society for Mucosal Immunology

REFERENCES

- Sanchez-Ramon, S., de Diego, R.P., Dieli-Crimi, R. & Subiza, J.L. Extending the clinical horizons of mucosal bacterial vaccines: current evidence and future prospects. *Curr. Drug Targets* **15**, 1132–1143 (2014).
- Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* **113**, 5S–13S (2002).
- Johansen, T.E. *et al.* Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**, 64–70 (2011).
- Nicolle, L.E. Managing recurrent urinary tract infections in women. *Womens Health* **1**, 39–50 (2005).
- Howard, S.J., Hopwood, S. & Davies, S.C. Antimicrobial resistance: a global challenge. *Sci. Transl. Med.* **6**, 236ed210 (2014).
- Cannon, B. Microbiology: resistance fighters. *Nature* **509**, S6–S8 (2014).
- Reardon, S. Antibiotic resistance sweeping developing world. *Nature* **509**, 141–142 (2014).
- Bauer, H.W. *et al.* A long-term, multicenter, double-blind study of an *Escherichia coli* extract (OM-89) in female patients with recurrent urinary tract infections. *Eur. Urol.* **47**, 542–548 (2005).
- Naber, K.G., Cho, Y.H., Matsumoto, T. & Schaeffer, A.J. Immunoactive prophylaxis of recurrent urinary tract infections: a meta-analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**, 111–119 (2009).
- Medina, E. & Guzman, C.A. Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 305–311 (2000).
- Lorenzo-Gomez, M.F. *et al.* Evaluation of a therapeutic vaccine for the prevention of recurrent urinary tract infections versus prophylactic treatment with antibiotics. *Int. Urogynecol. J.* **24**, 127–134 (2013).
- Lorenzo-Gomez, M.F. *et al.* Comparison of sublingual therapeutic vaccine with antibiotics for the prophylaxis of recurrent urinary tract infections. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **5**, 50 (2015).
- Czerkinsky, C., Cuburu, N., Kweon, M.N., Anjuere, F. & Holmgren, J. Sublingual vaccination. *Hum. Vaccin.* **7**, 110–114 (2011).
- Moingeon, P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: practical implications for the clinician. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **1**, 228–241 (2013).
- Iijima, N., Thompson, J.M. & Iwasaki, A. Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol.* **1**, 451–459 (2008).
- Durand, M. & Segura, E. The known unknowns of the human dendritic cell network. *Front. Immunol.* **6**, 129 (2015).
- Rosadini, C.V. & Kagan, J.C. Microbial strategies for antagonizing Toll-like-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 61–70 (2015).
- Iborra, S. & Sancho, D. Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors. *Immunobiology* **220**, 175–184 (2015).
- Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
- WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance (2014). Available from <http://www.who.int>.
- World-Economic-Forum. Global Risks 2014, Ninth Edn. (2014). Available from www.weforum.org/risks.
- Blackwell, H.E. & Fuqua, C. Introduction to bacterial signals and chemical communication. *Chem. Rev.* **111**, 1–3 (2011).
- Blander, J.M. & Sander, L.E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 215–225 (2012).
- Holmgren, J. & Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* **11**, S45–S53 (2005).
- Negri, D.R. *et al.* Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. *Vaccine* **28**, 4175–4180 (2010).
- Zielinski, C.E. *et al.* Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* **484**, 514–518 (2012).
- Palomares, O., O'Mahony, L. & Akdis, C.A. The many routes of dendritic cells to ensure immune regulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1541–1542 (2011).
- Palomares, O. *et al.* Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 510–520, 520 e511–e519 (2012).
- Palomares, O. *et al.* Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta. *Genes Immun.* **15**, 511–520 (2014).
- Wang, Z. *et al.* Regulatory T cells promote a protective Th17-associated immune response to intestinal bacterial infection with *C. rodentium*. *Mucosal Immunol.* **7**, 1290–1301 (2014).
- Geginat, J. *et al.* Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. *Front. Immunol.* **6**, 527 (2015).
- Bakdash, G., Vogelpoel, L.T., van Capel, T.M., Kapsenberg, M.L. & de Jong, E.C. Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal Immunol.* **8**, 265–278 (2015).
- Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221–225 (2015).
- Akdis, M., Palomares, O., van de Veen, W., van Splunter, M. & Akdis, C.A. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1438–1449, quiz 1450–1431 (2012).
- Soerens, A.G., Da Costa, A. & Lund, J.M. Regulatory T cells are essential to promote proper CD4 T-cell priming upon mucosal infection. *Mucosal Immunol.* **9**, 1395–1406 (2016).
- Warfel, J.M. & Merkel, T.J. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* **6**, 787–796 (2013).
- Sancho, D. & Reis e Sousa, C. Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 46–52 (2013).
- Sivrent, S. *et al.* Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 558–567 (2016).
- Ruffel, B. *et al.* Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* **26**, 623–637 (2014).
- Krisenko, M.O. & Geahlen, R.L. Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 254–263 (2015).
- Kerrigan, A.M. & Brown, G.D. Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol.* **32**, 151–156 (2011).
- Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H. & Furue, M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci.* **42**, 1–11 (2006).
- Ott, P.A. & Adams, S. Small-molecule protein kinase inhibitors and their effects on the immune system: implications for cancer treatment. *Immunotherapy* **3**, 213–227 (2011).
- Kaisho, T. & Tanaka, T. Turning NF-kappaB and IRFs on and off in DC. *Trends Immunol.* **29**, 329–336 (2008).
- Kingeter, L.M. & Lin, X. C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol. Immunol.* **9**, 105–112 (2012).
- Slack, E.C. *et al.* Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1600–1612 (2007).
- Lin, Y.L., Liang, Y.C., Lee, S.S. & Chiang, B.L. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human

monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 533–543 (2005).

48. Nakahara, T. *et al.* Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* **16**, 1701–1709 (2004).
49. Cohn, L. & Delamarre, L. Dendritic cell-targeted vaccines. *Front. Immunol.* **5**, 255 (2014).
50. Netea, M.G. *et al.* Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* **352**, aaf1098_1-9 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>