



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCION NEUROCIENCIA**

**Acoplamiento Funcional entre el canal Hv1 y el complejo  
enzimático NADPH oxidasa 2 en Células Supresoras de origen  
mieloide de *Mus musculus***

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MENCIÓN  
NEUROCIENCIA**

**JUAN JOSÉ ALVEAR ARIAS**

**DIRECTORES**

**Dr. Carlos González León  
Dr. Ramón Latorre de la Cruz**

**Valparaíso, Chile  
2020**

## Resumen

Las células supresoras de origen mieloide (MDSC) constituyen una población heterogénea de células la cual tiene la capacidad de inhibir la actividad de los linfocitos T en contextos de inflamación, infección y microambiente tumoral. Uno de los mecanismos por el cual las MDSC ejercen su actividad inmunosupresora es a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por el complejo enzimático NADPH oxidasa 2. Se ha demostrado que, para que este complejo pueda producir especies reactivas de manera sostenida, debe existir una retroalimentación positiva entre la actividad de la enzima y la del canal  $H_v1$ . La relación entre la enzima NOX2 y  $H_v1$  ha sido demostrada para células del sistema inmune con actividad proinflamatoria, la cual sustenta la formación de radical superóxido ( $O_2^-$ ) durante la fagocitosis, pero no para células con actividad antiinflamatoria como MSDC.

El canal  $H_v1$  es una proteína de membrana que posee propiedades biofísicas únicas. Las corrientes de este canal son sensibles tanto al voltaje como al gradiente de pH que se establece a través de la membrana.  $H_v1$  conduce  $H^+$  de manera selectiva y su conductancia unitaria se ha estimado dentro del orden de los fS. Además, las corrientes del canal  $H_v1$  son fuertemente inhibidas por  $Zn^{+2}$  y derivados de GBI. Estas propiedades biofísicas lo convierten en la entidad molecular clave para mantener de manera sostenida la función del complejo NOX2.

A través de este trabajo, se reporta la expresión funcional del canal  $H_v1$ , mediante técnicas de inmunodetección y su caracterización biofísica de las corrientes usando de la técnica de *patch-clamp*. Además, con la técnica de citometría de flujo, se demostró que el canal  $H_v1$  se expresa en MDSC de ratón, se encuentra acoplado funcionalmente a la actividad del complejo enzimático NOX2 y que dicha interacción se encuentra involucrada en la actividad inmunosupresora de estas células. Este estudio, ofrece evidencias para considerar al canal  $H_v1$  como nuevo e interesante blanco de estudio en terapias contra el cáncer.

## Introducción

El sistema inmunológico protege al organismo de elementos extraños, los cuales son potencialmente peligrosos, pudiendo estos ser sustancias químicas, bacterias, virus o parásitos. El reconocimiento de estructuras moleculares o péptidos derivados de estos elementos, por parte de las células del sistema inmunológico es clave para gatillar la respuesta de defensa (Baniyash, 2004).

Los linfocitos T o células T, juegan un papel fundamental en los procesos inflamatorios involucrados en la eliminación de patógenos. Estas células son activadas tras la presentación de péptidos derivados de antígenos por parte de las APCs, llamadas así por sus siglas en inglés "*Antigen-Presenting Cells*" (Guermónprez et al., 2002). A pesar de su importante papel durante la eliminación de patógenos por parte del sistema inmune, la actividad sin control de los linfocitos durante los procesos inflamatorios resulta ser perjudicial para los tejidos afectados, por lo cual, el sistema inmunológico precisa de varios sistemas de control para evitar los daños derivados de una respuesta inflamatoria de grandes proporciones (Sakaguchi et al., 2008).

Uno de los mecanismos que posee el sistema inmunológico para controlar la respuesta de las células T, es la producción de células supresoras de origen mieloide, abreviadas MDSC por su sigla en inglés "*Mieloid-Derived Suppressor Cells*", y estas constituyen un grupo heterogéneo de células caracterizadas por tener una alta capacidad inmunosupresora (Cuenca et al., 2011; Gabilovich et al., 2012). En el ratón, las células MDSC son identificadas través de la co-expresión de los marcadores CD11b y Gr-1 en la superficie de la membrana celular (Peranzoni et al., 2010). Estas células tienen su participación durante las respuestas inflamatorias regulando la actividad de los linfocitos T, evitando el daño a los tejidos afectados durante la inflamación producto de una sobre actividad de los linfocitos T frente a antígenos (Cuenca et al., 2011).

A pesar de esto, el rol fisiológico de las MDSC se ha descrito principalmente en contextos de cáncer, ya que las células tumorales, han desarrollado estrategias para defenderse del sistema inmunológico del hospedero a través del reclutamiento de células inmunosupresoras gracias a la liberación de "factores derivados de tumor", como VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), GM-CSF (*Granulocyte*

*Macrophage Colony-Stimulating factor*), IL-10 (*Interleukin-10*), IL-6 (*Interleukin-6*) (Rabinovich et al., 2007; Montero et al., 2012), entre otros. Dicho de otro modo, las células tumorales reclutan un batallón de células supresoras para protegerse del ataque de las células T y así, poder crecer y proliferar de manera óptima.

Las MDSC poseen varios mecanismos para inhibir la respuesta de los linfocitos T, los cuales pueden operar ya sea de manera individual o en conjunto (Serafini, 2013). Estas estrategias inmunosupresoras recurren a cuatro mecanismos diferentes: 1) la depleción de aminoácidos esenciales para la activación de linfocitos T, tales como la arginina y la cisteína; 2) la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; 3) el daño en la viabilidad y tráfico de los linfocitos T; y 4) proliferación de células T reguladoras (Gabrilovich et al., 2012a). Se ha reportado que el principal mecanismo de inmunosupresión asociado a microambiente tumoral mediado por MDSC corresponde a la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Lu & Gabrilovich, 2012).

El mecanismo detrás de la inmunosupresión mediada por estos radicales libres, consiste en la modificación directa del receptor de célula T o TCR (del inglés, "*T Cell Receptor*"). Para que la célula T pueda ser activada, es necesaria la presentación de un péptido derivado de antígeno por parte de una APC. El TCR, es un receptor transmembrana capaz de unirse al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés "*Major Histocompatibility Complex*") expresado en las membranas de las APC, el cual porta un péptido antigénico. La interacción directa entre ambas estructuras desencadena la activación y maduración del linfocito T (Smith-garvin et al., 2009). La modificación del TCR como resultado de la inmunosupresión, impide dicha interacción y el reconocimiento del péptido derivado de antígeno lo que tiene como consecuencia, la inhibición de la activación del linfocito T (ver Figura 1) (Nagaraj et al., 2007).

El TCR está constituido por múltiples subunidades. Este posee subunidades variantes ( $\alpha$  y  $\beta$ ) e invariantes (CD3 $\gamma$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\delta$  y la cadena  $\zeta$ ). Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  son las responsables del reconocimiento de péptidos derivados de antígenos los cuales se presentan en la superficie de las APC a través del MHC (Baniyash, 2004). Las subunidades invariantes CD3 $\gamma$ -CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$ -CD3 $\epsilon$ , forman un complejo denominado CD3, el cual constituye un heterodímero. La cadena invariante  $\zeta$  (zeta) que constituye

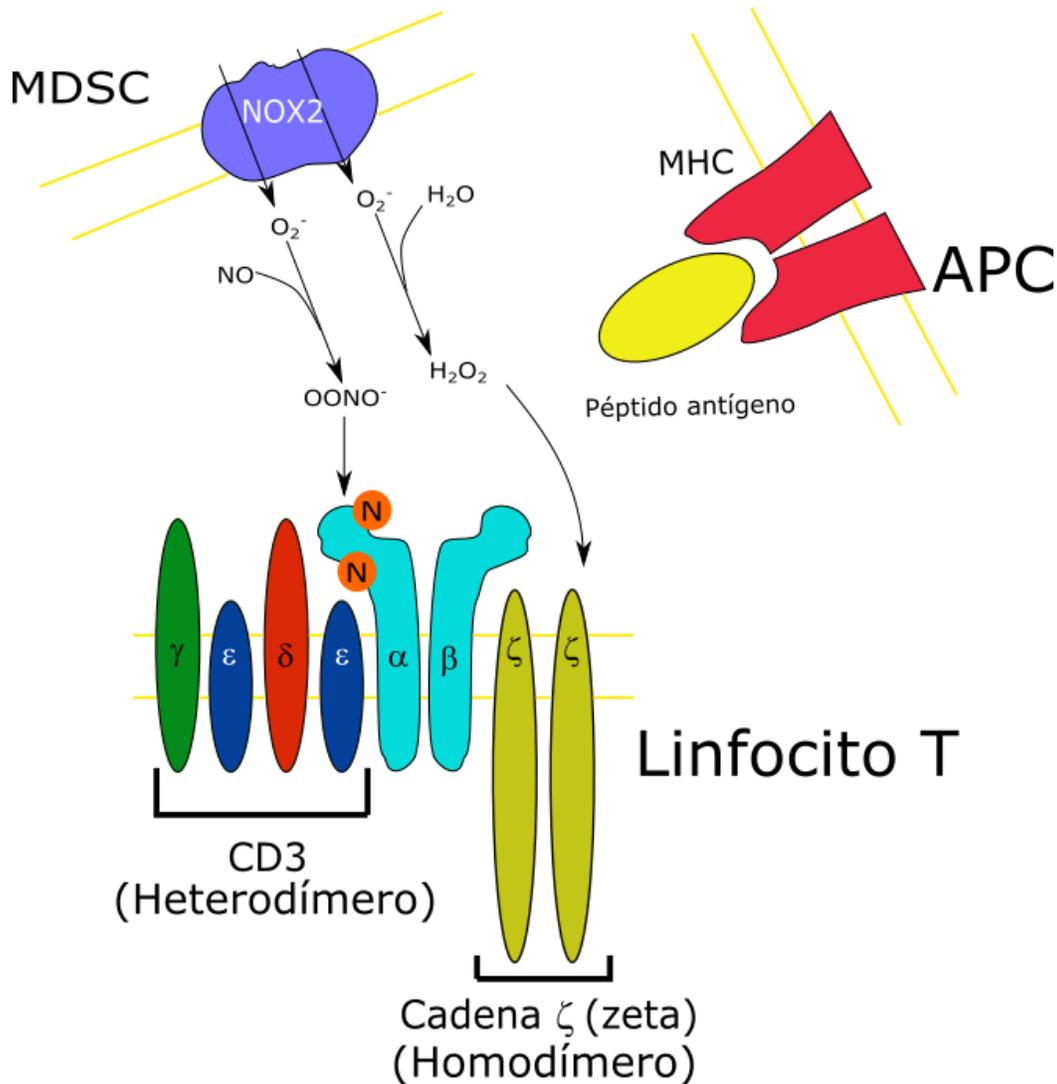
un homodímero, en conjunto con el complejo CD3 y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se acoplan para formar un receptor de célula T funcional (Figura 1), capaz de reconocer antígenos y en consecuencia desencadenar la señalización intracelular para la activación de los linfocitos T (Baniyash, 2004).

Las especies reactivas empleadas por las MDSC para la modificación del TCR son el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El  $\text{ONOO}^-$  tiene la capacidad de modificar las proteínas a través de la nitración de diferentes aminoácidos como cisteína, metionina y triptófano, sin embargo, su principal efecto ocurre sobre la tirosina (Alvarez & Radi, 2003). El producto de la nitración de la tirosina por el peroxinitrito es la nitrotirosina (NT), la cual altera diferentes interacciones moleculares como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y redes electrostáticas que son determinantes para la estabilidad estructural y función de las proteínas (Quint et al., 2006; Alvarez & Radi, 2003; Nagaraj et al., 2007). El receptor de célula T, posee en su estructura varios residuos de tirosina los cuales al ser nitrados se altera drásticamente la capacidad del receptor para acoplarse al MHC (Nagaraj et al., 2007). Por otro lado, se ha reportado que la acción inmunosupresora asociada al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produce una disminución en la expresión de la cadena  $\zeta$  (zeta) del complejo CD3, el cual tiene un rol fundamental en la estabilización del TCR a la membrana de los linfocitos T, ya que la interacción entre TCR y el complejo CD3 es imperativa para una expresión funcional de este receptor (Figura 1) (Schmielau & Finn, 2001).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés "*Reactive Oxygen Species*") y nitrógeno (RNS, del inglés "*Reactive nitrogen species*") por parte de las MDSC está dirigida principalmente por el complejo enzimático NADPH oxidasa 2 (NOX2) (Corzo et al., 2009; Kusmartsev & Gabrilovich, 2006; Nagaraj et al., 2007). Este complejo es capaz de producir radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Figura 1), el cual es el precursor principal para la formación de ROS y RNS (Gabrilovich & Nagaraj, 2009; Nagaraj et al., 2007).

Uno de los componentes de este complejo enzimático, la subunidad gp91, tiene la capacidad de transportar electrones a través de la membrana para reducir el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y convertirlo en  $\text{O}_2^-$ . El radical superóxido producido reacciona de manera espontánea con moléculas como el óxido nítrico (NO) o el agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ),

produciendo las especies reactivas  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivamente (Serafini, 2013).



**Figura 1. Mecanismo de inmunosupresión mediado por radicales libres.** En el esquema se representa la producción de radicales libres por las MDSC, la presentación de antígenos por parte de una APC y el complejo TCR en la membrana del linfocito T en un escenario de inmunosupresión. El TCR es un complejo con múltiples subunidades algunas variables ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y otras invariables (complejo CD3 y cadena  $\zeta$ ). Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  son responsables del reconocimiento de antígenos que son presentados por el MHC de las APC. El complejo CD3 forma un heterodímero entre  $\text{CD3}\gamma\text{-CD3}\epsilon$  y  $\text{CD3}\delta\text{-CD3}\epsilon$ . La cadena  $\zeta$  por otro lado forma un homodímero. El acoplamiento entre las subunidades del TCR es estrictamente necesaria para formar un receptor funcional, el cual es requerido para la activación del linfocito T. En el esquema representativo se muestra la inmunosupresión ejercida por MDSC mediante ROS Y RNS. Por un lado, el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) modifica a través de nitración de tirosinas el complejo TCR, mientras que el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) disminuye la expresión de la cadena  $\zeta$  del complejo TCR. Al modificar la estructura del receptor, pierde su capacidad para reconocer los péptidos derivados de antígenos lo que impide la activación de la célula T.

La formación de radicales libres por parte del complejo NOX, es una estrategia ampliamente utilizada por las células del sistema inmunológico, no solo para mediar la inmunosupresión de linfocitos T, sino que también para la eliminación de patógenos, principalmente durante la fagocitosis, en donde se aprovecha la alta capacidad bactericida que poseen estos oxidantes (Savina et al., 2006).

El proceso de producción de radical superóxido dirigido por la enzima NADPH oxidasa comienza con su ensamblaje funcional en la membrana de la célula (Morgan et al., 2005). Luego de su ensamblaje, el complejo enzimático reduce extracelularmente el  $O_2$  y se genera  $O_2^-$ , gracias al transporte de  $e^-$  a través de la membrana mediante la subunidad transmembrana gp91, los cuales son tomados a partir de la reacción de oxidación de la coenzima NADPH (Kusmartsev & Gabrilovich, 2006).

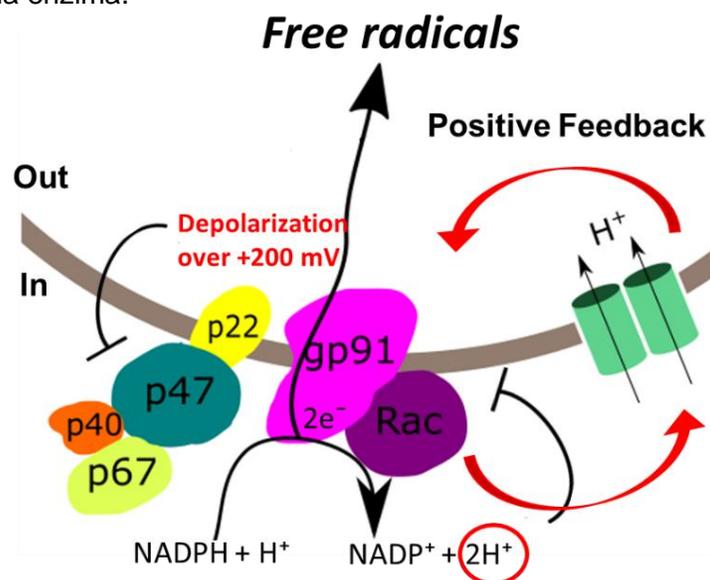
La oxidación del NADPH, produce  $NADP^+ + H^+ + 2O_2^-$ , por lo que cada ciclo de la actividad enzimática provoca la acidificación del citosol (Henderson et al., 1988). Se ha reportado que la actividad óptima de este complejo enzimático es cercano a  $pH_i$  7 (Babior et al., 1973; Henderson et al., 1988), y a  $pH_i$  5.5, la actividad enzimática de la NOX2 es inhibida de manera irreversible (Morgan et al., 2005). Por otro lado, la acumulación de  $H^+$  en conjunto con el movimiento de electrones de un lado a otro de la membrana, produce una diferencia de potencial eléctrico local alrededor de la enzima. La actividad de esta enzima es independiente de potencial eléctrico entre intervalos de -100 mV hasta 0 mV, sin embargo, si este rango de potencial es superado, la actividad del complejo enzimático comienza a disminuir hasta desaparecer a voltajes cercanos a +190 mV (DeCoursey et al., 2003). Consideraciones teóricas sugieren la actividad enzimática sin un mecanismo compensatorio de potencial de membrana, generarían una despolarización cercana a los +200 mV (DeCoursey et al., 2003). Esto causaría un cese absoluto de la actividad formadora de  $O_2^-$  de la NOX2.

Para que este sistema sea funcional y pueda operar de manera sostenida, se vuelve necesaria la presencia de una entidad molecular capaz de mantener tanto el potencial de membrana ( $E_m$ ) como del pH citosólico a niveles que permitan el adecuado funcionamiento de la enzima.

Está ampliamente reportado que, en las células del sistema inmunológico con actividad proinflamatoria, tales como eosinófilos, macrófagos y células dendríticas

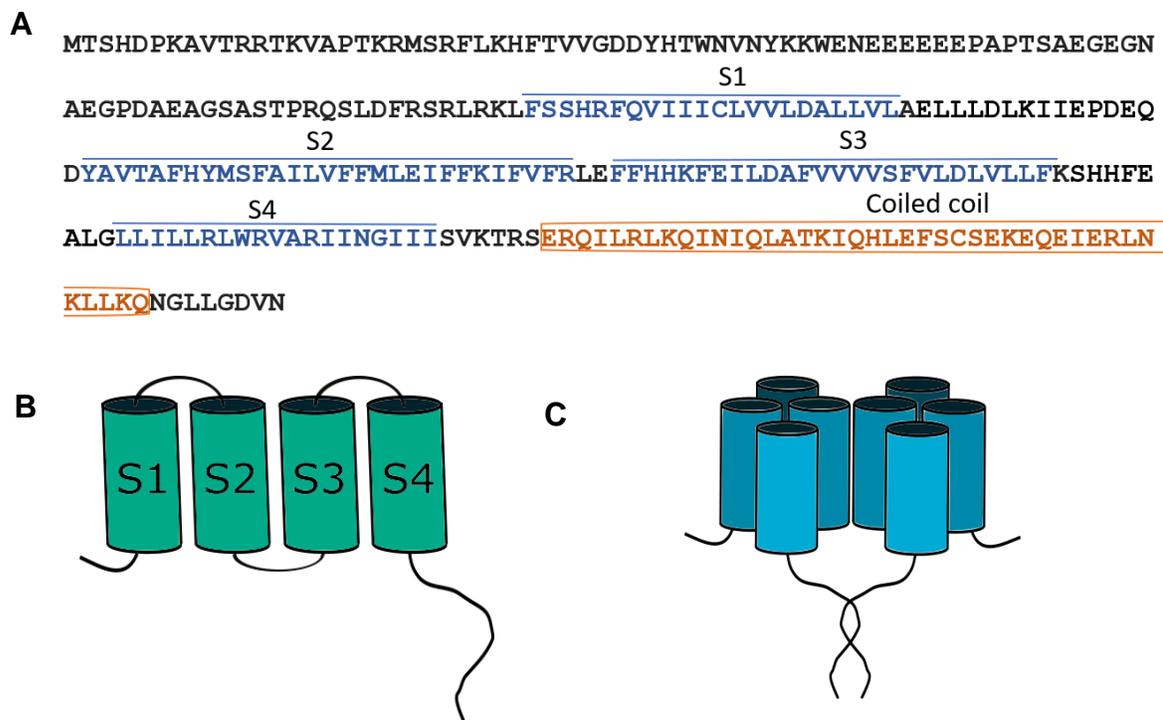
que existe un acoplamiento funcional entre la actividad del complejo NOX2 y del canal de protones sensible a voltaje,  $H_v1$  (Figura 2). Se establece una retroalimentación positiva entre ambas estructuras en la cual la disminución del pH interno de la célula activa el canal  $H_v1$  (DeCoursey et al., 2003; Henderson et al., 1988; Ramsey et al., 2009; Szteyn et al., 2012). Esto ha sido comprobado en ratones  $H_v1^{-/-}$ , en donde se observó que la producción de  $O_2^-$  inducida por PMA en granulocitos disminuye en un 75% (Ramsey et al., 2009). Por otro lado, en estos tipos celulares se ha reportado a través de estudios realizados con la técnica de parche perforado un efecto llamado “*enhanced gating mode*”, el cual es un fenómeno que ocurre tras la estimulación con forbol 12-miristato-13-acetato (PMA). La adicción de PMA al lado extracelular de las células promueve un desplazamiento de las curvas de activación de las corrientes del canal  $H_v1$  hacia voltajes negativos y las cinéticas de activación ( $\tau_{\text{activación}}$ ) se vuelven más rápidas (Bánfi et al., 1999; DeCoursey et al., 2000; DeCoursey et al., 2001)

Como se explicará a continuación, el canal  $H_v1$  posee características que permiten esta relación de retroalimentación positiva, donde su actividad mantiene el pH citoplasmático y el potencial de membrana en niveles óptimos para el funcionamiento prolongado de la enzima.



**Figura 2. Acoplamiento funcional entre NOX2 y  $H_v1$  durante la producción de especies reactivas en células del sistema inmunológico con actividad proinflamatoria.** En el esquema se representa el acoplamiento funcional entre la actividad de la enzima NADPH oxidasa 2 y el canal de protones sensible a voltaje,  $H_v1$ . La producción de radical superóxido es sustrato para la posterior formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS). El complejo enzimático a partir de la reacción de oxidación de la coenzima NADPH obtiene dos electrones. Uno de los productos de esta reacción son dos protones, los cuales con cada ciclo enzimático durante la producción sostenida de ROS generan una rápida acidificación del citosol.

El canal H<sub>v</sub>1 es una proteína integral de membrana compuesta por 5 segmentos, cuatro de los cuales son transmembrana (S1-S4) y uno de ellos intracelular (S0) (Okamura et al., 2015; Ramsey et al., 2006; Sasaki et al., 2006). Posee N- y C-terminales intracelulares (Figura 3). El estado oligomérico nativo de esta proteína corresponde a un homodímero, permitido por una asociación de tipo *coiled-coil* entre los C-terminales de cada monómero (Koch et al., 2008; Tombola et al., 2008).



**Figura 3. Estructura del canal H<sub>v</sub>1.** (A) Secuencia de aminoácidos del canal H<sub>v</sub>1 de ratón *Mus musculus* (mH<sub>v</sub>1). Los segmentos transmembrana del canal (S1-S4) se muestran en azul. La región coiled-coil se muestra en marrón (Okamura et al., 2015). (B) Estructura del monómero de H<sub>v</sub>1 conformado por cuatro segmentos transmembrana (S1-S4), con N- y C-terminales intracelulares. (C) Arquitectura del canal H<sub>v</sub>1 en su conformación dimérica, permitida por una interacción coiled-coil entre los C-terminales de cada subunidad.

Dentro de esta estructura, el sensor de voltaje está constituido por 3 residuos de arginina (R, aminoácido de carga positiva a pH fisiológico), las cuales se encuentran ubicado en la alfa hélice S4 (Gonzalez, et al., 2010; Gonzalez, et al., 2013). Esta particular arquitectura le confiere propiedades biofísicas únicas que lo diferencian de otros canales de iones sensibles a voltaje las cuales pueden ser identificadas electrofisiológicamente.

Las corrientes que conduce esta proteína se caracterizan por ser altamente selectivas

a protones ( $P_{H^+}/P_{Na^+} > 10^6$ ) (DeCoursey, 2013). Se ha sugerido que el filtro de selectividad del canal corresponde a un residuo de aspartato (D, aminoácido con carga negativa a pH fisiológico) localizado en el segmento S1 (Boris Musset et al., 2012). Una de las propiedades biofísicas más peculiares de este canal, es que las corrientes de protones ( $I_{H^+}$ ) que permean por el canal son moduladas fuertemente por el gradiente de pH ( $\Delta pH = pH_o - pH_i$ ) que se establece a través de la membrana (T. E. DeCoursey, 2013). Se ha reportado en varios sistemas celulares empleados para el estudio de este canal, que las curvas de activación por voltaje se desplazan hacia voltajes más positivos lo que indica que la energía necesaria para abrir el canal aumenta, conforme aumenta el  $\Delta pH$  (DeCoursey & Cherny, 1996).

La conductancia unitaria de  $H_v1$  ha sido estudiada a diferentes  $\Delta pH$  a través de mediciones de ruido estacionario, siendo estimada dentro del orden de los femtosiemens (fS) (Cherny et al., 2003).

Otra de las características de este canal es su farmacología. A la fecha, el ion Zinc ( $Zn^{+2}$ ), 2-guanidiniobenzoimidazol (2-GBI) y 5-cloro-2-guanidiniobenzoimidazol (ClGBI) (ambas moléculas derivadas de guanidinio) son los inhibidores más potentes conocidos del canal  $H_v1$  (Hong et al., 2014; Hong et al., 2013; Musset et al., 2010; Qiu et al., 2016). Por un lado, el metal divalente es un modulador alostérico que, cuando es agregado de manera extracelular a concentraciones micromolares ( $\mu M$ ), disminuye la rapidez de apertura del canal y desplaza la curva de activación hacia voltajes más positivos, indicando que su unión a la proteína estabiliza un estado no conductor (DeCoursey & Cherny, 2007; Qiu et al., 2016; Thomas & Meech, 1982). Se ha observado que a su vez, la inhibición por  $Zn^{+2}$  es dependiente del  $\Delta pH$ , ya que la disminución de la corriente en presencia del divalente se vuelve más drástica a medida que se aumenta la diferencia de pH extracelular con respecto al intracelular (Cherny & DeCoursey, 1999).

A diferencia del  $Zn^{+2}$ , los derivados de guanidinio inhiben de manera intracelular a concentraciones  $\mu M$  y se ha propuesto que en la configuración abierta del canal su sitio de unión se ubica entre la vía de permeación y el citoplasma (Hong et al., 2013). Estos compuestos inhiben las corrientes de  $H_v1$  sin desplazar las curvas de activación por voltaje (Tombola et al., 2008) y su efecto disminuye cuando el pH extracelular se

vuelve más ácido (Hong et al., 2013). A pesar de que tanto el 2-GBI como el CIGBI inhiben el canal desde el lado intracelular, sólo el segundo derivado de guanidinio es capaz de cruzar la membrana lipídica de las células, por lo que esta molécula es la única que permite estudios en la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell* (Hong et al., 2014, 2013).

Con respecto a los estudios relacionados al acoplamiento funcional entre H<sub>v</sub>1 y NOX2 en células del sistema inmunológico, PMA es el fármaco más utilizado para estimular la catálisis de radical superóxido con la subsecuente producción de ROS a través de este complejo enzimático (DeCoursey & Ligeti, 2005). El éster de forbol al agregarse extracelularmente, cruza sin problemas la membrana celular y se une fuertemente a la proteína quinasa C (PKC) (Castagnag & Yoshimi, 1982; Niedel et al., 1983), lo que induce su activación y lo que deriva a la fosforilación tanto de proteínas citoplasmáticas como de membrana (dentro de las cuales se encuentran las subunidades del complejo NOX2), favoreciendo su ensamblaje y, como resultado, aumenta la producción de radicales libres. Consistente con esto se ha observado que, en basófilos y neutrófilos de pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica, caracterizada por células del sistema inmunológico carentes de la subunidad gp91, una disminución en el fenómeno de “*enhanced gating mode*” sobre las corrientes de H<sub>v</sub>1 (Musset et al., 2009). Más aún, las corrientes de protones en sistemas heterólogos de expresión transfectadas con el gen *Hvcn1*, que no expresan NOX2, presentan una respuesta menor tras la estimulación con PMA comparada con aquellas células de cultivo primario del sistema inmunológico (Musset et al., 2008). Si bien, esto sugiere que la interacción funcional pueda ser reforzada por una fosforilación tanto del complejo enzimático como del canal H<sub>v</sub>1 (Boris Musset, Capasso, et al., 2010), pero esto no basta para poder explicar el fenómeno del “*enhanced gating mode*”, reforzando la idea de su acoplamiento funcional a través de una retroalimentación positiva entre ambas.

Los antecedentes experimentales publicados demuestran la existencia de una relación funcional en células del sistema inmunológico con actividad proinflamatoria. Sin embargo, no hay evidencia sobre la expresión funcional del canal de protones H<sub>v</sub>1 en las MDSC, las cuales poseen actividad antiinflamatoria. Evaluar la expresión y el rol fisiológico de esta proteína podría ser clave para entender y modular el proceso

de inmunosupresión inducida por tumores en pacientes con cáncer, ampliando las perspectivas terapéuticas ante dicha enfermedad.

En este trabajo, se realizó una serie de experimentos que demuestran la expresión funcional del canal de protones H<sub>v</sub>1 en MDSC de ratón (*Mus musculus*), en donde además se evaluó su interacción funcional con el complejo enzimático NADPH oxidasa 2, y las implicancias que dicha interacción tienen sobre la actividad inmunosupresora de las MDSC.

## **Hipótesis**

“Las Células Supresoras de Origen Mieloide de ratón expresan un canal de protones sensible a voltaje,  $H_v1$ , que se encuentra acoplado funcionalmente a la actividad enzimática de la NADPH oxidasa 2”

## **Objetivo General**

Determinar la presencia del canal de protones H<sub>v</sub>1 y evaluar su acoplamiento funcional con la enzima NADPH oxidasa 2 en MDSC.

## **Objetivos Específicos**

1. Evaluar la expresión de H<sub>v</sub>1 en MDSC a través de SDS-PAGE Western blot y citometría de flujo.
2. Caracterizar las propiedades biofísicas del canal de protones que se expresa en MDSC a través de la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell*.
3. Determinar el acoplamiento funcional entre NOX2 y H<sub>v</sub>1 tras la estimulación con PMA en presencia y ausencia del inhibidor específico de H<sub>v</sub>1, CIGBI.

## Materiales y métodos

### 1. Cultivo primario de MDSC a partir de precursores de médula ósea de ratón

Como fuente de médula ósea de fémures y tibias, para aislar Células Supresoras de Origen Mieloide, se utilizó ratones C57BL/6 sanos de ~60 días de edad, del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (Valparaíso, Chile) (Fernández et al., 2014). Los animales fueron sacrificados siguiendo los protocolos de uso ético de animales de la Universidad de Valparaíso, por dislocación cervical, posteriormente se sometieron a un abundante baño de etanol 70% y luego, se le realizó a una disección de fémur y tibia. La cirugía se llevó a cabo en una campana de flujo laminar Thermo Forma® Clase II tipo A/B3 (GMI), a temperatura ambiente (21°C), la cual se irradió con luz ultravioleta durante 20 minutos para luego proceder con el protocolo de obtención de las células. Se utilizó tijeras y pinzas autoclavadas para la extracción de las piernas del ratón. Los huesos fémur y tibia, se limpiaron con etanol al 70% y se colocaron en medio RPMI GlutaMAX + Antibióticos 100X (Estreptomocina y penicilina) y  $\beta$ -mercaptoetanol 55 mM. Los huesos se cortaron cuidadosamente a cada extremo con la tijera estéril. Se perfundió la médula con medio RPMI GlutaMAX empleando una jeringa estéril. Las células de la médula ósea se pasaron a un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos. Luego, se eliminó el sobrenadante y se agregó 3 mL de buffer de lisis ACK (Gibco), el cual se dejó actuar durante 3 minutos. Luego, se neutralizó la reacción agregando 7 mL de medio RPMI GlutaMAX y se centrifugó a 400 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de medio RPMI, se filtró la suspensión celular con un *cell strainer* de 40  $\mu$ m (Falcon®) estéril y se contaron en una cámara Newbauer. Las células se sembraron a una concentración de 250.000 células/mL en placas de cultivo de 100 mm. La siembra se realizó en RPMI GlutaMAX + Antibióticos 100X (Estreptomocina y penicilina) y  $\beta$ -mercaptoetanol 55 mM suplementado con suero fetal de bovino 10% en presencia de 40 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Se incubaron las células a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 96 horas (4 días). Al cuarto día, se cambió el medio de cultivo por RPMI GlutaMAX con Antibióticos 100X (Estreptomocina y penicilina) y  $\beta$ -mercaptoetanol 55 mM, suplementado con suero

fetal de bovino 10% sin factor. A partir de estas preparaciones se realizaron experimentos de SDS-Page Western blot, electrofisiología y citometría de flujo.

## **2. Obtención proteínas totales a partir de precursores mieloides y MDSC de ratón para SDS-Page Western blot**

El SDS-PAGE Western blot es una técnica que permite identificar y cuantificar a través de anticuerpos específicos una proteína en particular en condiciones denaturantes (Blancher & Jones, 2001.; Mahmood & Yang, 2012). A partir de una preparación de células o tejido, se realiza una obtención de proteínas totales las cuales son separadas por una electroforesis en gel de poliacrilamida (Mahmood & Yang, 2012).

### **A. Protocolo de lisis y obtención de proteínas totales**

A partir de los cultivos primarios de precursores mieloides aislados de médula ósea de ratón, se realizó una obtención de proteínas totales para evaluar la expresión del canal H<sub>v</sub>1 en células supresoras de origen mieloides con la técnica SDS-Page Western blot. Para esto, se realizó una obtención de muestras a las 96 horas de diferenciación (Fernández et al., 2014). Para evitar la degradación de las proteínas durante el protocolo de obtención, las placas Petri con las células cultivadas, fueron colocadas en hielo (~4°C) inmediatamente después de ser retiradas de la incubadora. Se recolectaron las células y se procedió con el protocolo de lisis con una solución en una proporción de concentraciones 1:1:100, de 0.5 M EDTA (Thermo Fisher Scientific®) + Halt™ Protease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific®) + Pierce™ RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific®), respectivamente. La cantidad de buffer de lisis usado dependió de la cantidad de muestras que se prepararon para hacer obtención (ver anexos, tabla 1).

Las muestras se incubaron durante 5 minutos con la solución de lisis y posteriormente las células de la placa fueron despegadas con un Cell Scraper. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14.000 g durante 15 minutos, a 4°C. Al finalizar el tiempo de centrifugación, se recolectó el sobrenadante el cual posee las proteínas totales de las células. Las muestras se diluyeron en buffer de carga (LB, *Loading buffer*). Además, se les agregó ditiotreitól (DTT) como agente reductor.

El volumen de buffer de carga que se agregó a la muestra se calculó de la siguiente forma:

$$Volumen_{LB} = \frac{Volumen_{muestra} \times 0.9}{3}$$

El volumen de DTT que se agregó a la muestra se calculó de la siguiente forma:

$$Volumen_{DTT} = \frac{Volumen_{muestra} \times 0.1}{3}$$

Las muestras luego de la adición de LB y DTT fueron almacenadas a -20°C, para luego ser cuantificadas por el método del ácido bicinconínico.

### **B) Cuantificación de proteínas totales de MDSC por el método de ácido bicinconínico**

El método del ácido bicinconínico (BCA), es un método ampliamente usado para detectar y cuantificar las proteínas totales de una muestra a partir de la reacción de Biuret (ver Anexos) la cual genera un producto de color púrpura y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm. La cantidad de este producto es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra (Smith et al., 1985). La concentración de las proteínas se determina construyendo una curva de calibración con una proteína de concentración conocida, comúnmente albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine serum albumin*).

Para cuantificar muestras de proteínas totales obtenidas a partir de los cultivos de precursores mieloides y MDSC, se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific®) cuya formulación está basada en el método del ácido bicinconínico.

Para la cuantificación de las muestras se usó un lector de microplaca Appliskan (Thermo Fisher Scientific®) con el cual se midió la absorbancia de las muestras a 562 nm y se determinó la concentración de proteínas totales de cada muestra con base en la curva de calibración que se preparará con BSA.

Luego de obtener el valor de absorbancia de las muestras, se usó la ecuación de la curva de calibración con BSA para obtener los  $\mu\text{g}$  de proteína.

El límite de detección se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \times \text{desviación estándar de la absorbancia a } 0 \mu\text{g BSA}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

El límite de cuantificación se calculó como se detalla a continuación:

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \times \text{desviación estándar de la absorbancia a } 0 \mu\text{g BSA}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

Los valores bajo el límite de detección corresponden a ruido instrumental y se asumió una nula presencia de proteína. Todos aquellos valores entre el límite de detección y el límite de cuantificación se consideraron como poca presencia de proteína y no son cuantificables. Aquellos valores sobre el límite de cuantificación se consideraron para la cuantificación.

### **C) Procedimiento de electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida**

Se realizó la separación de las proteínas totales a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. La razón para usar este porcentaje es que, el canal de protones H<sub>v</sub>1 murino tiene un peso molecular de ~60kDa en su forma dimérica, sin embargo, al ser este un Western blot en condiciones denaturantes, se espera encontrar la proteína en estado monomérico, donde cada monómero pesa ~30 kDa. Este porcentaje de poliacrilamida permite la visualización de proteínas que se encuentren en un rango de pesos moleculares entre 10 a 200 kDa.

El gel separador (running gel) se preparó de acuerdo con la Tabla 2 (ver Anexos). Luego se adicionó tetrametiletilendiamina (TEMED), se cargó el sándwich\* inmediatamente evitando la formación de burbujas.

---

\***Sandwich:** Cátodo (+) – papel filtro – gel – membrana – papel filtro – ánodo (-).

Se adicionó una delgada capa de isopropanol sobre el gel para favorecer la polimerización del gel. Una vez que polimerizó, se quitó cuidadosamente la película de isopropanol usando una jeringa. Se preparó el gel concentrador (*stacking gel*) de acuerdo con la Tabla 3 (ver Anexos) y se cargó al sándwich inmediatamente evitando la formación de burbujas. Una vez listo, se introdujo cuidadosamente la peineta evitando la formación de burbujas y se esperó a que la polimerización del gel se completó.

Se retiró la peineta y se lavó los pocillos con buffer de corrida. Se ensambló la unidad de electroforesis. Se adicionó buffer de corrida tanto en la cámara inferior, para evitar la formación de burbujas en el fondo del gel, como en la cámara superior. Una vez preparada la unidad de electroforesis se hirvieron las muestras por 5 minutos. Las muestras se agitaron en vórtex y se cargaron en los pocillos del gel con una jeringa Hamilton, sin sobrepasar el límite del pocillo. Los pocillos sin muestra se cargaron con buffer de carga 1X, para evitar que las proteínas migraran de forma dispareja a lo largo del gel.

Una vez cargadas las muestras, estas se separaron en el gel a un voltaje constante de +70 mV hasta que alcanzaron el gel separador. Luego se incrementó el voltaje a +120 mV.

Una vez que las muestras migraron se procedió a realizar la transferencia a las membranas de difluoruro de polivinilideno.

#### **D) Procedimiento de Western blot y transferencia**

Se retiró y separó los vidrios de la unidad de electroforesis, se eliminó el gel concentrador. Luego de esto, se sumergió el gel separador con buffer de transferencia durante 15 minutos. Se activaron las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) en metanol durante 2 minutos y luego en buffer de transferencia durante 5 minutos. Una vez listos, el sándwich se montó según las indicaciones del fabricante. El sándwich se introdujo en el tanque de transferencia y se llenó de buffer de transferencia hasta cubrirlo por completo. La transferencia de muestras se realizó durante ~2 horas a 350 mA. Una vez terminada la transferencia, el sándwich se desmontó y la membrana se colocó inmediatamente en H<sub>2</sub>O destilada. La membrana

se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O destilada y se tiñó con Rojo Ponceau durante 5 minutos para verificar la transferencia. Para continuar con el protocolo de inmunodetección, se removió por completo el Rojo Ponceau lavando la membrana con H<sub>2</sub>O destilada.

### **E) Protocolo de Inmunodetección**

Con el objetivo de reducir los lugares de unión no específica del anticuerpo a la membrana, se bloqueó la membrana usando una solución constituida por Tampón tris salino+Tween 20 (TBS-T) + 5% Leche descremada durante 1 hora. Luego, se lavó 5 veces con H<sub>2</sub>O para eliminar los restos de solución de bloqueo. Se procedió a incubar el anticuerpo primario para el canal H<sub>v</sub>1 (HVCN1 (K-11): sc-136712, Santa Cruz Biotechnology®) en una dilución 1:50 en TBS-T/3% BSA durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se procedió a realizar 5 lavados con H<sub>2</sub>O. Luego, se lavó 5 veces con TBS-T durante 10 minutos agitando vigorosamente. Finalmente, se lavó la membrana 2 veces con H<sub>2</sub>O.

Se procedió a incubar el anticuerpo secundario, donkey anti-rabbit IgG (H+L) /HRP (sc-2359, Santa Cruz Biotechnology®), en TBS-T 3% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Terminada la incubación del anticuerpo, se realizó 5 lavados con H<sub>2</sub>O, luego 5 lavados con TBS-T de 10 minutos de duración y finalmente 2 lavados con TBS (sin Tween 20) y se procedió a revelar usando la técnica de *enhanced chemiluminescence*.

### **F) Análisis de datos**

Para averiguar cuál es el peso molecular que corresponde a la banda proteica observada la membrana de PVDF, se construyó una curva de calibración que relaciona el logaritmo del peso molecular (MW) y el factor  $R_f$ ,  $\log(MW)$  vs  $R_f$ . El  $R_f$  es la relación entre la distancia ( $d$ ) de migración de la banda proteica y la longitud de la corrida total ( $l$ ), o sea la distancia desde el borde superior del gel hasta el frente de la corrida.

En otras palabras:

$$R_f = \frac{d}{l}$$

Con estos valores se obtuvo la ecuación lineal:

$$\log(MW) = mR_f + b$$

Donde  $m$  es la pendiente de la recta y  $b$  es el intercepto en el eje  $y$ .

Luego se calculó el  $R_f$  de la proteína incógnita y se extrapola en la curva el  $\log(MW)$  y aplicando el antilogaritmo se obtuvo el PM de la proteína incógnita ( $H_v1$ ).

## 2) Electrofisiología

### A. Técnica de patch-clamp.

Se utilizó la técnica de *patch-clamp* (Neher & Sakmann, 1992) para registrar las corrientes macroscópicas producidas por el canal de protones en MDSC, en las configuraciones de *whole-cell*, (traducido como célula completa) y *perforated-patch* (traducido como parche-perforado) (DeCoursey et. al., 2000). El electrodo de referencia de Ag/AgCl se conectó a la solución de baño a través de un puente de 1% Agar hecho en una solución 3 M de KCl y este se llevó a tierra. El contacto eléctrico con la solución de la pipeta se realizó a través de un electrodo de Ag/AgCl. Antes de formar los sellos, se compensó la diferencia de potencial entre los dos electrodos mediante el amplificador operacional AxoPatch 200B (Axon Instruments) usando el comando *pipette offset*. Una vez que se logró la configuración *cell-attached* se compensó las capacitivas. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (22°C) controlada con un equipo de aire acondicionado. Las micropipetas de registro se fabricaron con un estirador programable, modelo P-97 (Sutter Instruments, Co.) usando capilares de borosilicato (World Precision Instruments, Inc.) y pulidas en una microforja (Microforge MF-830, Narishige, Co.) obteniendo pipetas de ~3  $\mu\text{m}$  con resistencias en el rango de 1 a 5  $\text{M}\Omega$ .

### B. Adquisición de Registros

La cámara de registros fabricada con una plancha de acrílico transparente, se montó sobre una mesa anti-vibratoria, en un microscopio óptico invertido CK40 (Olympus). El movimiento de la pipeta se controló con un micromanipulador eléctrico PSC-6000 (Burleigh). Para la fijación de voltaje se utilizó el amplificador AxoPatch 200B (Axon Instruments) y las señales análogas se digitalizaron con una Digidata 1440 y adquiridas mediante el programa de generación de pulsos de voltaje Clampex 10.7.

La señal se filtró a  $\frac{1}{2}$  de la frecuencia de muestreo, de acuerdo con la teoría del muestreo de Nyquist.

### **C. Técnica de *patch-clamp* en la configuración *célula completa (whole-cell)* para caracterizar las propiedades biofísicas de las corrientes del canal de protones de MDSC.**

La conductancia unitaria del canal de protones es extremadamente baja, la cual fue estimada dentro del orden de los fS (Cherny et al., 2003). Esto ha impedido en gran medida a los electrofisiólogos para realizar registros de corrientes de  $H_v1$  con la técnica de *patch-clamp* en las configuraciones de *cell-attached* o *inside-out* cuando se trata de sistemas celulares (DeCoursey, 2013). La solución es realizar registros empleando la configuración de *whole-cell*, la cual permite registrar la corriente que pasa a través de todos los canales de iones contenidos en la membrana de la célula (Neher & Sakmann, 1992). Esta nos provee de varias ventajas experimentales con respecto a otras configuraciones del *patch-clamp* debido a que, luego de conseguir el sello eléctrico ( $\geq 1 \text{ G } \Omega$ ) entre la pipeta de registro y la membrana células, se aplica una succión suficiente para romper el área de la membrana abarcada por la punta de la pipeta y de esta manera, se consigue el acceso eléctrico al interior de la célula (Lippiat, 2009). Esta modalidad permite modificar la composición intracelular del sistema de estudio (Linley, 2013). Mediante esta estrategia experimental se evaluó algunas de las propiedades biofísicas características de las corrientes de protones como: la dependencia tanto al potencial eléctrico como al  $\Delta\text{pH}$  que se establece a través de las membranas, la selectividad a protones y su farmacología.

#### **I. Soluciones de registro**

Las soluciones utilizadas fueron optimizadas para el registro de las corrientes de  $H^+$ , evitando la presencia de especies iónicas que causaran artefactos en los resultados. La composición de las soluciones ajustadas a pH 5.5 y pH 6.5 fue la siguiente: 100 mM del tampón ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES), 30 mM hidróxido de tetraetilamonio (TEAOH), 2 mM cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), 1 mM ácido etilenglicol-bis (b-aminoetilico)- N, N, N', N''- tetraacético (EGTA) y 160 mM N-metil-D-glucamina (NMDG) – ácido metanosulfónico ( $MeSO_3$ ). Para la soluciones ajustadas a pH 7.5 la

composición fue: 100 mM del tampón ácido 4 - (2 - hidroxietil)- 1 - piperazinetanosulfónico (HEPES), 30 mM hidróxido de tetraetilamonio (TEAOH), 2 mM cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), 1 mM ácido etilenglicol-bis (b-aminoetilico)- N, N, N', N''- tetraacético (EGTA) y 160 mM N-metil-D-glucamina (NMDG) – ácido metanosulfónico ( $MeSO_3$ ). La osmolaridad de todas las soluciones se ajustó a 300 mOsm con glucosa.

## II. Análisis de las corrientes macroscópicas: Relación $G/G_{m\acute{a}x}$ vs Voltaje.

Se utilizó un protocolo de pulsos escalado de tiempo variado, desde -90 mV hasta +130 mV en incrementos de 20 mV, con una duración adecuada para que cada registro alcance el estado estacionario. Los valores  $G/G_{m\acute{a}x}$  se graficaron en función del potencial. Esta relación se ajustó a una función de Boltzmann de la forma:

$$\frac{G}{G_{m\acute{a}x}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{z\delta F(V_m - V_{0.5})}{RT}}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde  $z\delta$  es la fracción de cargas aparentes que se mueven en el campo, F es la constante de Faraday,  $V_m$  es el potencial de membrana,  $V_{0.5}$  es el voltaje al cual el canal tiene una probabilidad de apertura igual a 0.5, R es la constante de los gases y T es la temperatura.  $G_{m\acute{a}x}$ ,  $z\delta$  y  $V_{0.5}$  son parámetros libres que se usan para ajustar la función.

## III. Análisis de las corrientes macroscópicas: Selectividad iónica del canal $H_v1$ usando rampas de potencial al término de los pulsos de prueba.

Se obtuvo registros para el análisis de potencial de reversión a partir de un protocolo de pulsos de voltaje de duración variable en un intervalo, desde -90 mV hasta +130 mV en incrementos de 10 mV, con una duración adecuada para evitar la depleción de protones (De-la-Rosa et. al., 2016). Al término de los pulsos de prueba el potencial se lleva a +130 mV desde donde se aplica una rampa de potencial hasta los -140 mV. La duración de la rampa de potencial depende de las condiciones experimentales y fundamentalmente se modifica para que la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) no sea cero. El voltaje al cual se cruzan los trazos de corriente inducidos por las diferentes rampas corresponde al potencial de reversión experimental,  $E_r$ .

La demostración de este fenómeno se explica a partir de la Ley de Ohm, la cual dice que la corriente (I) es igual al producto de la conductancia (G) y la diferencia de potencial (V-E<sub>r</sub>) que hay a través de la membrana:

$$I = g (V - E_r) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Para una corriente macroscópica de un canal (en este caso en particular, un canal selectivo a H<sup>+</sup>), I es igual a la suma del producto de las conductancias y de las diferencias de voltaje más la corriente capacitiva (I<sub>c</sub>):

$$I = g_{H^+}(V - E_{H^+}) + g_{leak}(V - E_{leak}) + C \frac{dV}{dt} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Para todos los trazos de corriente, los términos  $g_{leak}(V - E_{leak})$  y  $C \frac{dV}{dt}$  son iguales. Por lo tanto, el único término que varía corresponde a  $g_{H^+}(V - E_{H^+})$ . Cuando el potencial aplicado V (voltaje de la rampa) toma el mismo valor que E<sub>H<sup>+</sup></sub>, el valor del término  $g_{H^+}(V - E_{H^+})$  se hace cero. Esto resulta en:

$$I = g_{leak}(V - E_{leak}) + C \frac{dV}{dt} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Por lo tanto, todas las corrientes inducidas por las rampas pasarán por el mismo punto cuando  $V=E_{H^+}$  aunque con diferentes pendientes. González y colaboradores en 2010 observaron este fenómeno utilizando un protocolo de pulsos que denominaron *protocolo de pulsos de rampa rápida* (Gonzalez et al., 2010).

Para obtener de manera certera el punto al cual se entrecruzaron los trazos de corrientes, se calculó la varianza de los trazos de corrientes producidos por la rampa de voltaje para cada uno de los prepulsos dados. El punto de menor varianza correspondió al potencial al cual se entrecruzaron los trazos de corrientes. Los resultados se compararon con los valores predichos por la ecuación de Nernst:

$$E_{Nernst} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde R es la constante de los gases, T es la temperatura, z corresponde a las cargas elementales del ion, F es la constante de Faraday, [H<sup>+</sup>]<sub>o</sub> es la concentración extracelular de protones y [H<sup>+</sup>]<sub>i</sub> es la concentración intracelular de protones.

La concentración de protones se calculó a partir de la definición de pH:

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (\text{Ecuación 6})$$

#### **D. Técnica de *patch-clamp* en la configuración *perforated-patch* para registrar actividad del canal de protones de MDSC.**

La estrategia experimental consistió en registrar corrientes de protones del canal H<sub>v</sub>1 (*I<sub>H+</sub>*) en MDSC, utilizando PMA como activador complejo enzimático NOX2. Así, evaluar si el aumento en la actividad de la enzima provoca cambios en las *I<sub>H+</sub>* que pasan a través de H<sub>v</sub>1. Para esto se utilizó la técnica de *patch-clamp* (Neher & Sakmann, 1992), en la configuración de parche perforado (DeCoursey et al., 2000; Lippiat, 2009). Para estos experimentos no se utilizó la configuración de célula completa, debido a que como se mencionó anteriormente, durante el procedimiento se debe romper un área de membrana. Esta ruptura provoca la entrada de la solución de pipeta al citoplasma de la célula y en consecuencia, se diluye el contenido intracelular (Lippiat, 2009). Esto es problemático para los estudios que involucran la actividad de NOX2, debido a que el complejo enzimático requiere la presencia de elementos como coenzima NADPH, ATP, entre otras para su funcionamiento. La configuración de parche perforado tiene la ventaja por sobre la técnica de célula completa, ya que permite acceso eléctrico al interior de la célula usando antibióticos formadores de poro en la solución de la pipeta como, por ejemplo, Anfotericina B (Linley, 2013). Estos poros poseen un radio de ~0.8 nm, los cuales tienen un tamaño adecuado para que solo pasen iones o sustancias con un peso molecular >200 g/mol (De Kruijff et al., 1974; Linley, 2013). De esta manera, se evita la dilución de los componentes intracelulares.

Para los experimentos de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado se agregó 0.75 mg/mL de Anfotericina B reconstituida en DMSO a la solución de registro de la pipeta.

#### **I. Soluciones de Registro**

La solución de registros que se usada en la pipeta fue: 0.75 mg/mL de Anfotericina B, 25 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 30 mM TEAOH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA y 128

mM MeSO<sub>3</sub>, ajustada a pH 7.5. La solución de registro empleada para el baño fue: 25 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 30 mM TEAOH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA y 128 mM NMDG-MeSO<sub>3</sub>, ajustadas a pH 7.5 (Decoursey et al., 2000).

Las células fueron incubadas durante 10 minutos con 100 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), como activador del complejo NADPH oxidasa.

La osmolaridad de todas las soluciones se ajustó a 300 mOsm con glucosa.

Para evaluar las  $I_{H^+}$  sensibles a voltaje en presencia de PMA, se aplicó un protocolo de pulsos escalado de duración variable, en el intervalo desde -90 mV hasta +130 mV en incrementos de 20 mV. La duración del pulso de voltaje se fijó de acuerdo al curso temporal de la corriente para que este alcance un estado estacionario.

Así, se evaluó si la curva de activación para los registros de corriente obtenidos en presencia del activador de NOX2 sufre un desplazamiento en el eje de las abscisas con respecto a la curva de activación control.

### **3) Caracterización de fenotipo de células MDSC por citometría de flujo**

Se recolectaron las células cultivadas desde una placa Petri de 100 mm, usando una solución 2 mM PBS/EDTA y se pasaron a un tubo de 15 mL. Se realizó 3 lavados en 1 mL de PBS 1X. Para los lavados, las células se centrifugaron a 400g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron y se procedió a realizar un bloqueo durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución de 500 µL de PBS 1X + 3 µL de Fc Blocking Reagent (BD Biosciences®). Luego se agregaron los anticuerpos primarios diluidos en PBS 1X (ver Anexos, Tabla 4) y se incubaron durante 30 minutos a 4°C protegido de la luz. Una vez terminada la incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1 X seguidos de centrifugaciones a 400 g durante 5 minutos. Luego, se agregó 5 µL de anticuerpo anti-rabbit (Ver anexos, Tabla 4) y se incubó durante 30 minutos a 4°C protegido de la luz. Al finalizar la incubación, se lavó 2 veces con PBS 1X.

### **4) Lecturas por citometría de flujo de producción de ROS en MDSC**

Las MDSC producen altos niveles de ROS, donde la principal especie corresponde al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, compuesto involucrado en la inmunosupresión (ver Introducción). La sonda H2DCFDA es un precursor permeable y no fluorescente de DCF el cual se usa para medir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Walker & Armstrong, 2010). Las esterasas intracelulares cortan la

molécula H<sub>2</sub>DCFDA de manera específica en los enlaces éster, dando como resultado un producto relativamente polar e impermeable, HDCFDA. Esta molécula se acumula intracelularmente y es oxidada por la actividad de peroxidasas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La sonda puede ser oxidada por peroxinitrito pero en menor medida (Walker & Armstrong, 2010). Su oxidación genera un producto altamente fluorescente, el DCFDA, el cual emite en longitudes de onda cercana a los 530 nm cuando es estimulado con luz laser de ~490 nm. Esta intensidad de fluorescencia puede ser registrada a través de citometría de flujo. El principio de esta estrategia experimental es que la intensidad de la fluorescencia registrada es proporcional a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en la muestra (Bass et al., 1983).

Se ha reportado previamente en la literatura que la actividad de la enzima para realizar su función productora de especies reactivas de manera sostenida debe estar funcionalmente acoplada a la actividad de un canal H<sub>v</sub>1. Por esta razón, se utilizó una sonda DCFDA para medir la producción de especies reactivas por las MDSC tras la estimulación con forbol 12-miristato-13 acetato (PMA), el cual es un conocido activador del complejo NOX (Brandes et al., 2014). En este experimento se evaluó MDSC estimuladas con PMA en presencia y ausencia del inhibidor del canal H<sub>v</sub>1, CIGBI.

Para esto, se recolectó las células cultivadas desde la placa Petri de 100 mm, usando una solución 2 mM PBS/EDTA y se pasaron a un tubo de 15 mL. Se realizó 3 lavados en 1 mL de PBS 1X. Para los lavados, las células se centrifugaron a 400g durante 5 minutos.

Luego, se realizó una incubación de la sonda 2.5 μM H<sub>2</sub>DCFDA durante 10 minutos a 4°C, posterior a la incubación de los anticuerpos (sección 3, Materiales y métodos). Para la estimulación de la producción de ROS, las MDSC se estimularon durante 20 minutos con 100 nM PMA.

Cada una de estas incubaciones depende de las condiciones experimentales a evaluar (ver Resultados). Luego de tener las incubaciones listas, se leyeron las muestras en el citómetro de flujo Accuri C6 (CD Bioscience) en presencia o ausencia del inhibidor específico de H<sub>v</sub>1, CIGBI.

## **5) Ensayos de Proliferación de linfocitos T**

### **A. Purificación de Linfocitos T**

Los linfocitos T fueron aislados de bazos de ratones de ~60 días de la cepa C57BL/6. Los órganos fueron macerados y tratados con buffer de lisis ACK. Los esplenocitos fueron marcados con la sonda CFSE (CFSE Dye Kit, Invitrogen) durante 10 minutos a temperatura ambiente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **B. Ensayos de proliferación de linfocitos T y co-cultivos con MDSC**

Las MDSC obtenidas como previamente se describió, fueron tratadas con 200  $\mu$ M CIGBI durante 2 horas. Los linfocitos T (LT), para su proliferación, fueron estimulados usando 2  $\mu$ g/mL de Concanavalina A (ConA), donde se co-cultivaron junto a las MDSC previamente tratadas con el inhibidor de H<sub>v</sub>1 en una proporción MDSC:LT de 1:20 en placas de 96 pocillos. Se agregó  $6 \times 10^5$  LT por pocillo, marcados con la sonda éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) en duplicado. Los grupos control incluyeron controles positivos de LT estimulados con ConA sin MDSC y, un control de LT sin estimular. La proliferación de LT (o la falta de ella) fue determinada por la dilución de la sonda CFSE (emisión en 525 nm) entre los LT hijos a través de citometría de flujo a las 96 h de cultivo, donde la intensidad de la fluorescencia se registró usando el filtro FL1.

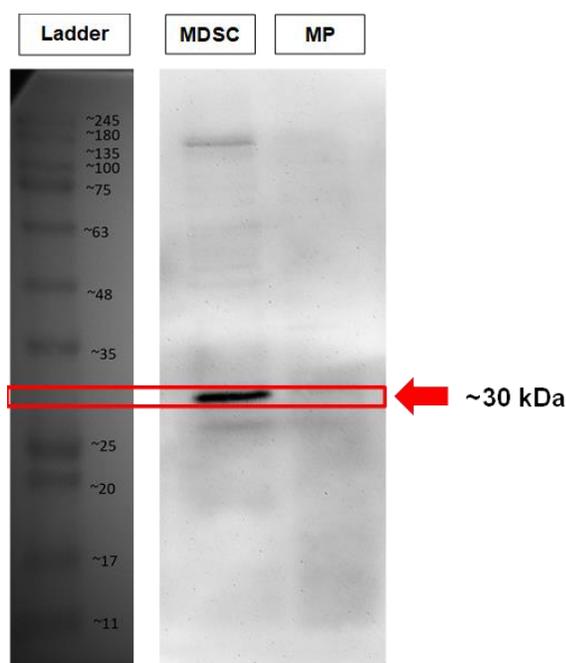
### **A. Análisis de Datos**

Para cada experimento se tomó una cantidad mínima de 50.000 eventos. Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo X. Para comparar los datos obtenidos y determinar el nivel de significancia estadística, se utilizó la prueba no paramétrica *Kruskal-Wallis*, con un valor  $p > 0.05$ .

## Resultados y Discusiones

Para evaluar si las células supresoras de origen mieloide de ratón expresan el canal H<sub>v</sub>1, se utilizó dos aproximaciones experimentales distintas. Por un lado, un SDS-PAGE Western blot (figura 3) y una citometría de flujo (figura 4).

En la figura 3 se muestra la inmunodetección para H<sub>v</sub>1 realizada en precursores mieloides (MP, del inglés myeloid precursors) (0 horas de diferenciación) y MDSC (96 horas de diferenciación). Los resultados muestran la presencia de una banda cerca de ~30 kDa en la banda de proteínas totales obtenidas de MDSC, mientras que en los precursores mieloides es prácticamente imperceptible.



**Figura 3. SDS-PAGE Western blot a precursores mieloides (MP) y células supresoras de origen mieloide (MDSC) de ratón.** Se observa la aparición de una banda de ~30 kDa que indica la presencia del canal H<sub>v</sub>1 monomérico en las MDSC, mientras que en los precursores mieloides la expresión es muy baja.

Se sabe que el canal H<sub>v</sub>1 es una proteína homodimérica con un peso molecular de ~64 kDa, donde cada una de sus subunidades posee la mitad de su peso molecular (Koch et al., 2008; Ramsey et al., 2006; Sasaki et al., 2006). Considerando que este corresponde a un experimento de *Western-blot* en condiciones denaturantes, la presencia de una banda en el carril de las MDSC revela la presencia de monómeros

de proteína (~32 kDa). Por otro lado, este resultado que la expresión de esta proteína es considerablemente mayor o prácticamente nula en los MP.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica de citometría de flujo. Estos experimentos se llevaron a cabo a distintos tiempos del proceso de diferenciación de los precursores mieloides hacia MDSC, en presencia del factor GM-CSF (ver Materiales y métodos).

Para poder interpretar los gráficos de estos resultados, se debe tener en cuenta que estos muestran la intensidad de fluorescencia (IF) asociada a la presencia de los marcadores evaluados, la cual es registrada por el equipo. Cada punto corresponde a la lectura de una célula. Los resultados son presentados de manera cronológica (de arriba hacia abajo) durante el protocolo de diferenciación. Así, en la columna A, se muestra cómo cambia la proporción de MDSC con respecto a la población total de los cultivos en función del tiempo.

Para discriminar si estas células corresponden a MDSC, se hizo una caracterización de fenotipo, evaluando la presencia de los marcadores CD11b (eje de las abscisas) y Gr-1 (eje de las ordenadas).

Por otro lado, en la columna B, se observa cómo cambia la IF asociada a la expresión de la proteína H<sub>v</sub>1, en la subpoblación de MDSC de la columna A. Es importante destacar que, en la columna B, los gráficos se encuentran divididos por una línea vertical negra, la cual separa la población celular en dos. Esta separación corta el eje de las abscisas en  $10^3$ , valor en el cual se ubica el pico de IF en la condición de 24 hr. De esta manera esta división nos sirve como punto de referencia para comparar la condición inicial con respecto a aquellas tomadas posteriormente. Otra consideración importante que surge de este último detalle es que, los números observados a cada lado de la división en los gráficos de la columna B indican el porcentaje de células presentes en cada porción que surge de esta división.

Entonces, los resultados presentados en la figura 4 muestran que durante el tiempo de diferenciación en presencia de GM-CSF, la población positiva para los marcadores Gr-1 y CD11b aumenta paulatinamente, obteniendo al final de este protocolo una población de 74.1 % de MDSC con respecto al total de células de la preparación (panel de las 96 horas, figura 4. A). De esta población Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, el 84.2 % posee

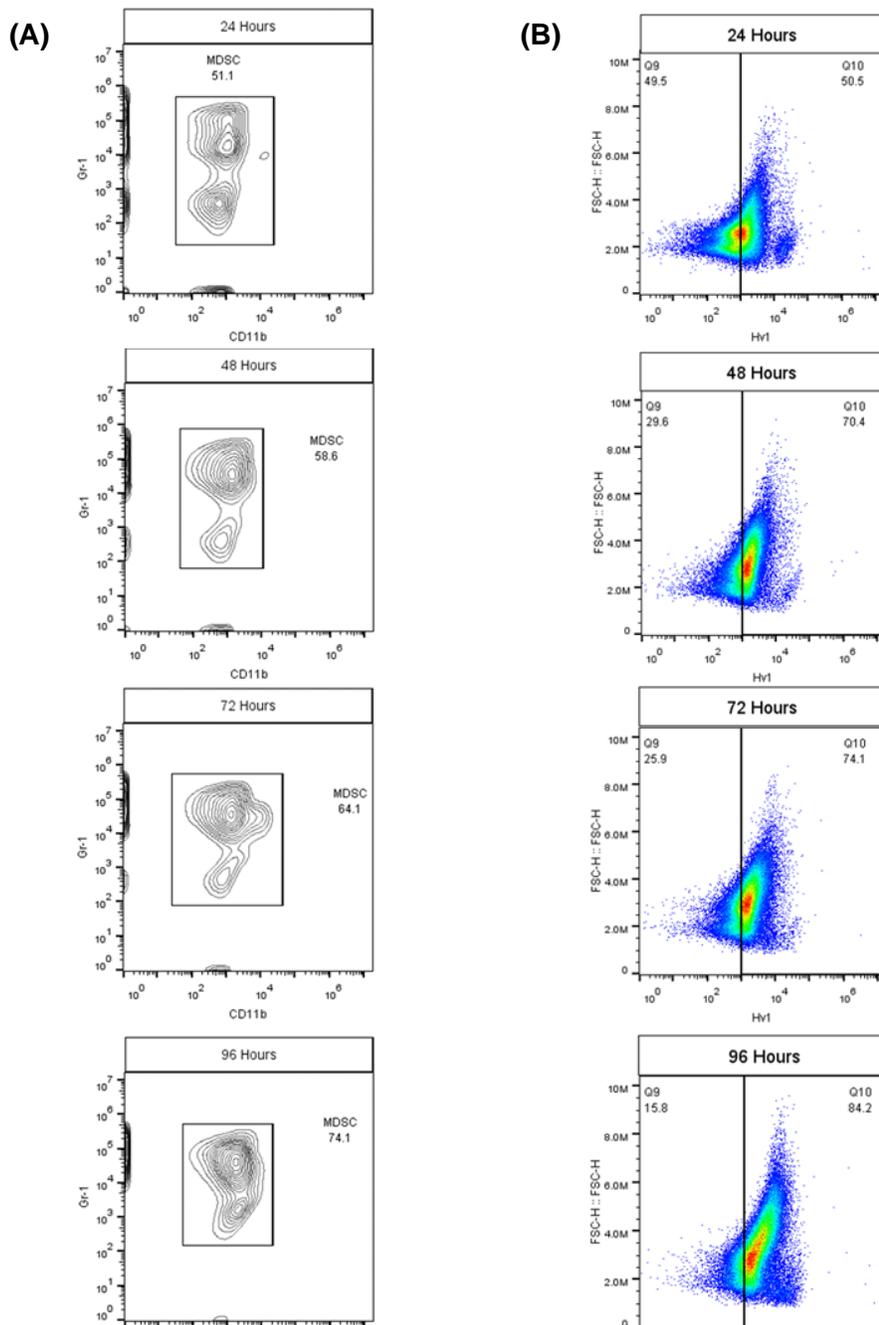
una alta intensidad de fluorescencia asociada a la expresión de H<sub>v</sub>1 (panel de las 96 horas, figura 4. B).

Un punto importante para destacar es que, para los experimentos de citometría de flujo, las MDSC en las que se usa el protocolo de marcaje con anticuerpos fluorescentes, no se permeabilizaron (ver Materiales y Métodos). Por lo tanto, la fluorescencia registrada por el citómetro corresponde a anticuerpos que se encuentran acoplados a proteínas de la membrana citoplasmática.

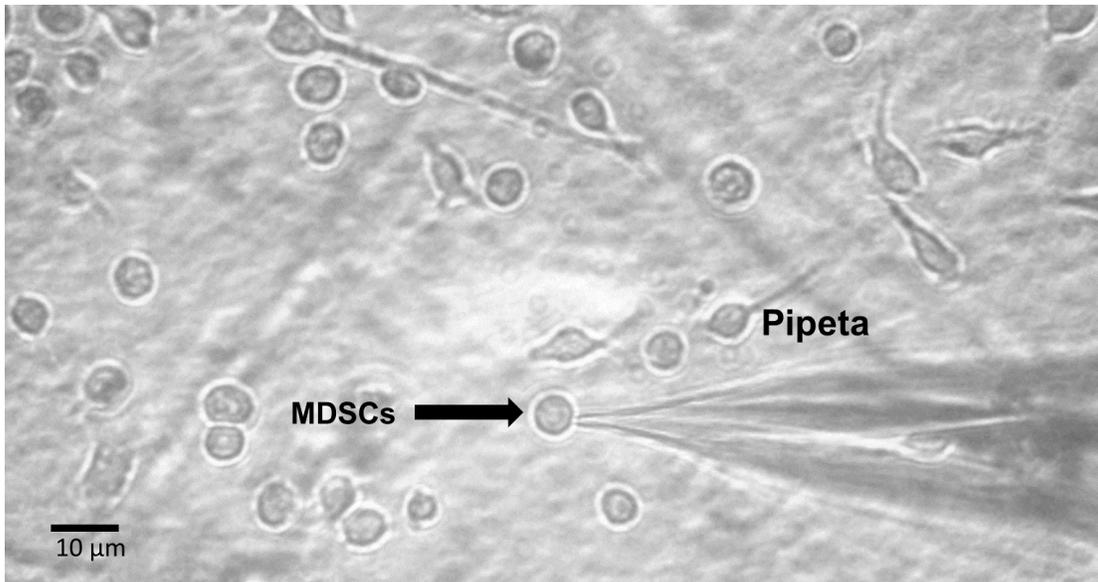
Estos ensayos de citometría explican por qué en los resultados obtenidos con *Western-blot*, observamos una nula presencia de banda en el carril de los PM (0 hr de diferenciación). Así, con estos resultados en conjunto (figura 3 y 4), se puede concluir que las MDSC expresan el canal de protones sensible a voltaje, H<sub>v</sub>1, en sus membranas.

H<sub>v</sub>1 es una proteína cuya expresión, propiedades biofísicas y función se ha estudiado ampliamente en células del sistema inmunológico con actividad proinflamatoria (ver Introducción). Las MDSC, por el contrario, son células del sistema inmunológico con actividad antiinflamatoria. Por ellos, surge la pregunta de si este H<sub>v</sub>1 que se expresa en la membrana de las MDSC de ratón, posee las mismas características de aquel que se expresa en células proinflamatorias del sistema inmunológico de ratón.

Para conocer las características funcionales del canal H<sub>v</sub>1 que se expresa en las MDSC, se realizó experimentos de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell*. En la figura 5 se puede observar una fotografía tomada en el microscopio óptico donde se muestran las MDSC de ratón durante un experimento electrofisiológico.



**Figura 4. (A) Citometría de flujo realizada en distintos tiempos de diferenciación de las MDSC.** La intensidad de fluorescencia tanto para CD11b (eje de las abscisas) como para Gr-1 (eje de las ordenadas) aumenta en función del tiempo, llegando a un 74.1% de MDSC. **(B) Expresión de la proteína H<sub>v</sub>1 en MDSC.** En la figura se observa en el eje de las abscisas la intensidad de fluorescencia para el marcador anti-H<sub>v</sub>1, mientras que en el eje Y se observa la dispersión frontal de la luz del láser del citómetro, la cual indica complejidad morfológica (uno de los criterios usados para caracterizar MDSC). Se observa el aumento en la intensidad de fluorescencia de H<sub>v</sub>1 en función del tiempo, obteniendo un 84.2% de la población positiva para H<sub>v</sub>1.

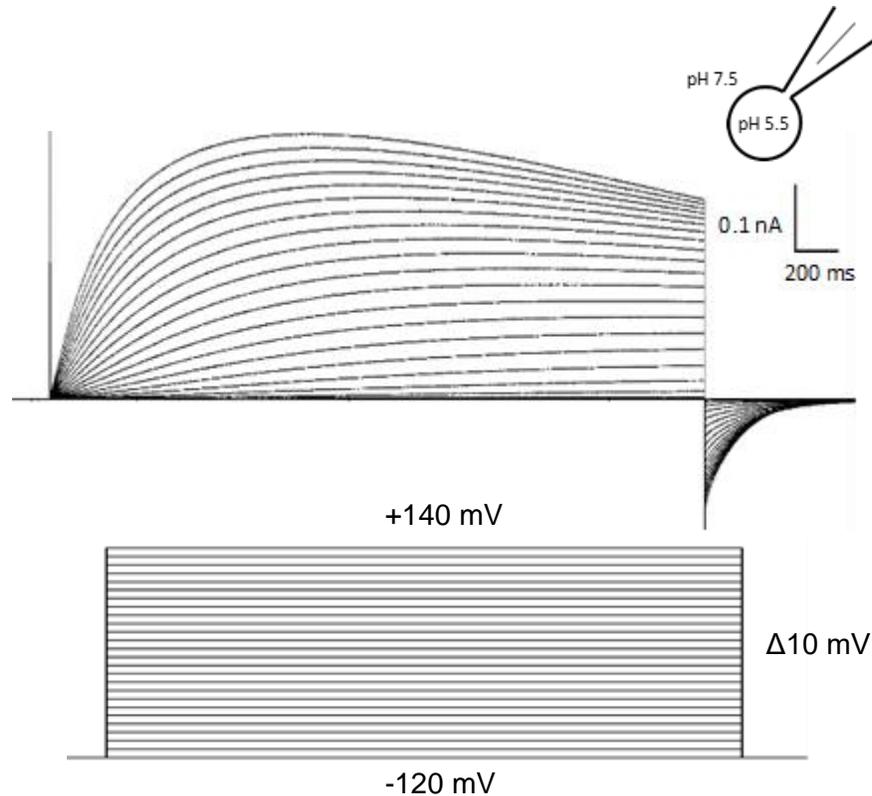


**Figura 5. Micrografía de un experimento electrofisiológico realizado en MDSC de ratón.** En la fotografía se observan células MDSC de ratón a las 96 horas de diferenciación, antes de realizar un experimento electrofisiológico usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell*. Se observa como la pipeta de registros toca la membrana celular para realizar un sello eléctrico ( $\geq 1.0 \text{ G}\Omega$ ). Se hace notar aquí que las MDSC tienen un diámetro de no más de  $\sim 8 \mu\text{m}$ .

Para estos experimentos, se usó soluciones de registro optimizadas para medir  $I_{H^+}$  (Ver Materiales y Métodos) y un protocolo de pulsos cuadrado de 3 segundos de duración, desde los  $-120 \text{ mV}$  hasta  $+140 \text{ mV}$  en saltos de  $10 \text{ mV}$ . Así, se obtuvo registros de corrientes macroscópicas, donde se observa que, en aquellos trazos de corrientes producidos por voltajes más despolarizantes, hay una disminución de la amplitud de la corriente dependiente del tiempo (figura 6). Existe una gran cantidad de reportes en la literatura que explican este fenómeno, el cual es conocido como depleción de protones, y se observa como una disminución de la corriente a voltajes más despolarizantes. Este es un fenómeno propio de las  $I_{H^+}$  (De-la-Rosa et al., 2016; Tu et al., 2018). La reducción de la corriente ocurre por una disminución de los  $\text{H}^+$  en la cercanía de los canales (De-la-Rosa et al., 2016).

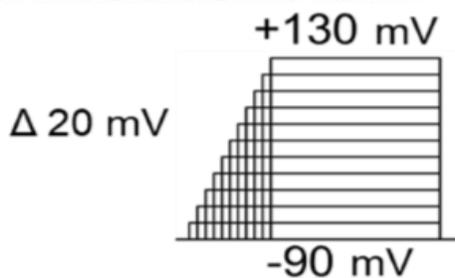
Los  $\text{H}^+$  se encuentran en concentraciones muy bajas ( $10^{-7} \text{ M}$ ), con respecto a otras especies iónicas que se encuentran en concentraciones milimolares como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ . Luego de la apertura de los canales, ocurre una disminución de  $\text{H}^+$  en la vecindad intracelular de los canales, la cual no puede ser restituida de manera eficiente por la difusión de los iones desde la solución amortiguadora (*buffer*) empleado para los

registros (DeCoursey & Cherny, 1996). Esto, produce una baja en la fuerza electromotriz del ion y en consecuencia, se observa la disminución en la amplitud de la corriente macroscópica (DeCoursey & Cherny, 1996).



**Figura 6. Corrientes de H<sup>+</sup> sensibles a voltaje en MDSC.** Registro representativo de corrientes de H<sup>+</sup> de MDSC usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell*. Las condiciones de pH establecidas fueron pH<sub>i</sub> 5.5 y pH<sub>o</sub> 7.5, estableciendo un  $\Delta$ pH 2. Se utilizó un protocolo de pulsos cuadrado de 3 segundos de duración desde -120 mV hasta +140 mV en saltos de 10 mV. A voltajes >40 mV se observa que la intensidad de la corriente pasa por un máximo y luego decae en el tiempo.

Este fenómeno impide un análisis correcto de las corrientes, por lo tanto, con el objetivo de evitar este fenómeno, se trabajó con un protocolo de pulsos optimizado para minimizar la depleción (figura 7). Este protocolo se caracterizó por tener una duración variable, esto quiere decir que, a medida que los pulsos de voltaje se hacen más despolarizantes, su duración se disminuye. De esta manera podemos minimizar la depleción de protones.



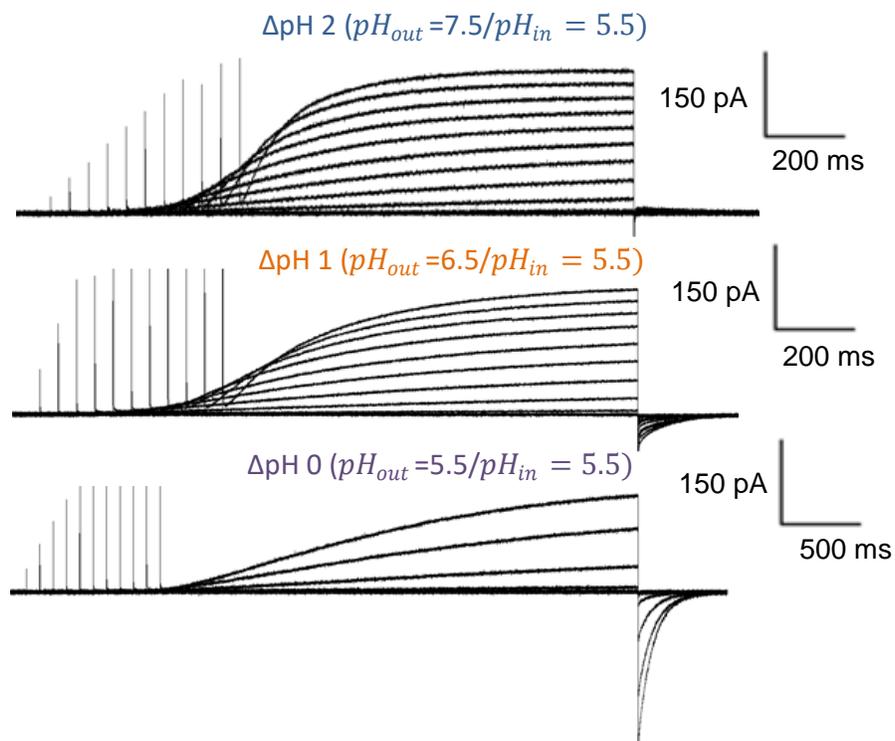
**Figura 7. Protocolo de pulsos de voltaje optimizado para minimizar el fenómeno de la depleción de  $H^+$ .** El protocolo de pulsos utilizado para evaluar las  $I_{H^+}$  en MDSC va desde -90 mV hasta +130 mV en saltos de 20 mV con una duración variable. A medida que se incrementa el valor de los pulsos de voltaje, se acorta su duración.

Con este protocolo, se evaluó la dependencia del  $\Delta pH$  de las corrientes, una propiedad biofísica que caracteriza las  $I_{H^+}$  de  $H_v1$  (ver Introducción). Para esto, se estableció  $\Delta pH = 0, 1$  y  $2$ , ajustando los pH de las soluciones tanto intracelular como extracelular. Se evaluó las curvas de activación en función del voltaje para cada condición de  $\Delta pH$ . En la figura 8 se observan registros representativos de  $I_{H^+}$  obtenidas para cada una de las condiciones. En la figura 9, se observan las curvas de activación por voltaje y las constantes de tiempo ( $\tau$ ) obtenidas para cada una de los  $\Delta pH$  evaluados.

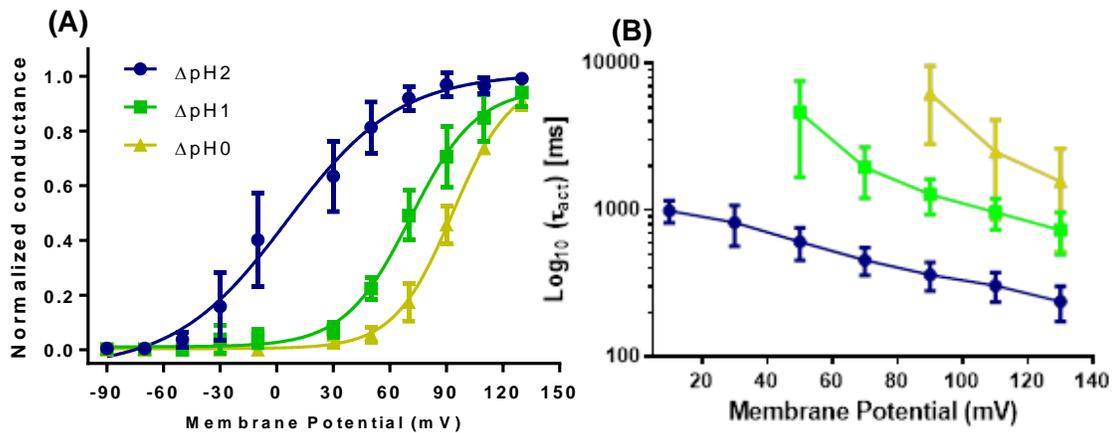
Los datos de conductancia en función del voltaje ajustan a una función de Boltzmann (ver Materiales y Métodos). A partir del ajuste se obtuvo el parámetro  $V_{0.5}$ , el cual es el potencial al cual la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) de los canales es 0.5. Se observa que las curvas de activación de la figura 9. A se desplazan hacia voltajes más negativos a medida que se aumenta el  $\Delta pH$ . Esto indica que la proporción de canales abiertos en función del potencial aumenta mientras mayor es el  $\Delta pH$ . Los valores de  $V_{0.5}$  promedio para cada condición obtenidas con el ajuste a la ecuación de Boltzmann, fueron:  $5.62 \pm 4$  mV a  $\Delta pH 2$ ,  $71.08 \pm 1.7$  mV a  $\Delta pH 1$  y  $87.76 \pm 6.0$  mV a  $\Delta pH 0$ .

Por otro lado, las  $\tau$  disminuyen (figura 9. B), lo cual es un indicio de que la o las transiciones entre cambios conformacionales involucrados en la apertura del canal se vuelven más rápidos. Estos datos indican fuertemente que las  $I_{H^+}$  registradas en MDSC son moduladas por el  $\Delta pH$  que se establece a través de la membrana, lo cual es una característica conocida del canal  $H_v1$ . Estos resultados además son similares

a los reportados para células dendríticas de ratón (Szteyn et al., 2012), donde se observan desplazamientos en las curvas de activación en función del voltaje ( $V_{0.5}$  no es reportado por este autor). Además, los  $\tau_{act}$  de  $H_v1$  en células de mamíferos se han datado en el orden de los segundos (DeCoursey & Cherny, 1996). Esto coincide con los resultados obtenidos para los registros en MDSC. Según nuestros registros a  $\Delta pH$  2 se tiene  $\tau_{act}$  entre los 1 a 0.2 seg entre 10 mV a 130 mV, mientras que para aquellos a  $\Delta pH$  0 y 1, los  $\tau_{act}$  van desde 6 a 1 seg entre 50 mV a 130 mV (figura 9. B). Esta información corresponde con las cinéticas de activación extremadamente lentas que se han descrito para  $H_v1$  en mamíferos (DeCoursey & Cherny, 1993, 1996). Conforme a las constantes de tiempo calculadas, para un estado oligomérico de dímero de  $H_v1$  en sistemas heterólogos de expresión, se sugiere que el canal de protones sensible a voltaje observado en Células Supresoras de Origen Mieloide, se encuentra en una conformación dimérica (Koch et al., 2008, Gonzalez et al, 2010).



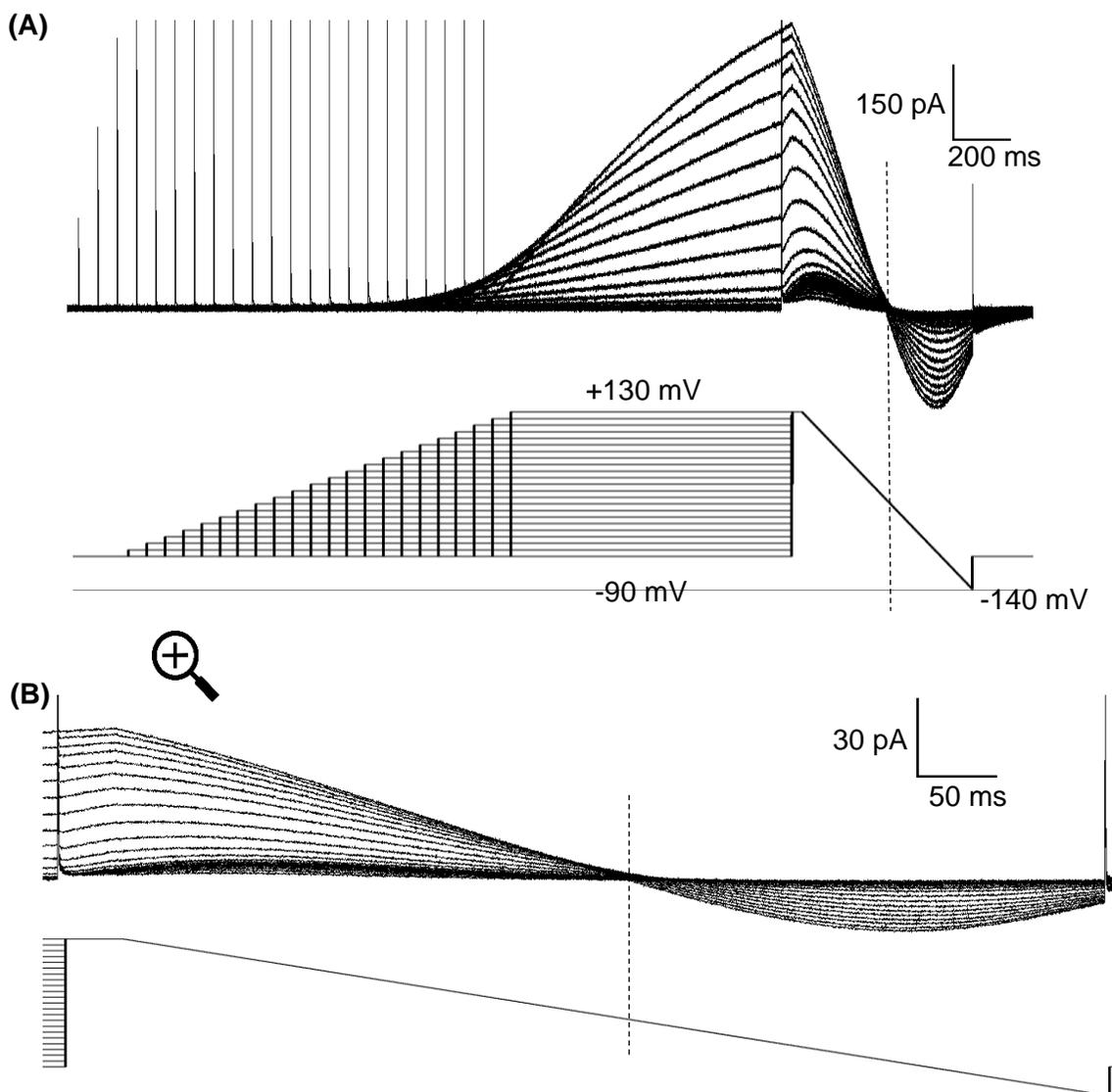
**Figura 8. Registros de  $I_{H^+}$  de MDSC a diferentes  $\Delta pH$ .** Las corrientes fueron registradas a diferentes condiciones de  $\Delta pH$ ,  $pH_i = 5.5$  como solución de pipeta y  $pH_o = 5.5$  (amarillo), 6.5 (verde) y 7.5 (azul) como soluciones de baño. Las corrientes fueron obtenidas a través de un protocolo de pulsos optimizado para evitar la depleción de protones, el cual escaló desde el -90 mV a +130 mV en saltos de 20 mV. Note que los protocolos de pulsos se hicieron más extensos en el tiempo a  $\Delta pH$  más bajos.



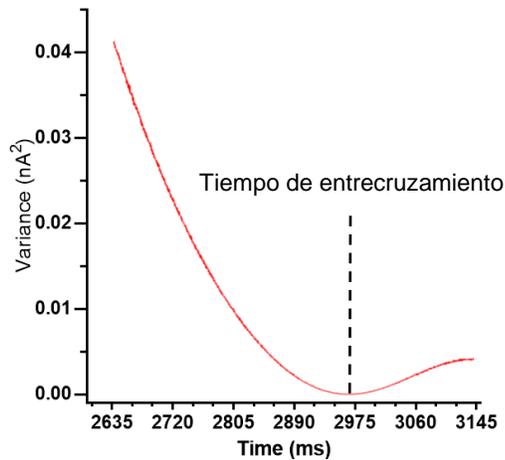
**Figura 9. Las corrientes de MDSC son dependientes de voltaje y de  $\Delta\text{pH}$ .** (A) se muestran las curvas de activación en función del voltaje (G-V) a  $\Delta\text{pH} = 2, 1$  y  $0$ . Los datos ajustaron a una ecuación de Boltzmann (líneas continuas). (B) Los valores de  $\tau$  se obtuvieron ajustando los trazos de corriente a una exponencial simple. Note que la variable dependiente está graficada en escala logarítmica. La simbología establecida para los gráficos fue  $\Delta\text{pH} 2$  ( $\bullet$ ;  $\pm\text{SD.}$ ,  $n=6$ ),  $\Delta\text{pH} 1$  ( $\blacksquare$ ;  $\pm\text{SD.}$ ,  $n=3$ ) y  $\Delta\text{pH} = 0$  ( $\blacktriangle$ ;  $\pm\text{SD.}$ ,  $n=3$ ).

Si un canal de iones es selectivo a una especie en particular, los valores del potencial de equilibrio del ion deben cumplir con los valores predichos por la ecuación de Nernst para esa especie iónica. Una de las características del canal  $\text{H}_v1$  es su gran selectividad a  $\text{H}^+$ , por lo tanto, se evaluó el potencial de reversión de las  $I_{\text{H}^+}$  de MDSC a diferentes condiciones de  $\Delta\text{pH}$  ( $-0.5, 0$  y  $0.5$ ) para estimar de manera indirecta su selectividad. Para esto se aplicó un protocolo de pulsos con rampa (figura 10), la demostración de esta estrategia experimental se explica en detalle en la sección Materiales y Métodos.

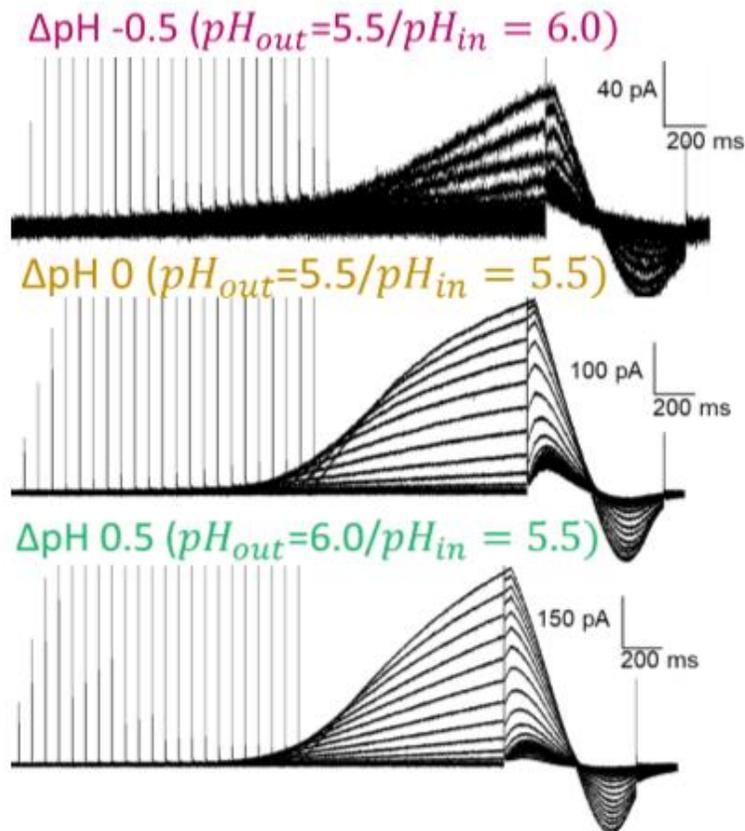
El protocolo de voltaje de pulsos con rampa va desde  $-90$  mV hasta  $+130$  mV en pulsos de duración variable en incrementos de  $10$  mV. Luego, cada pulso es llevado a los  $+130$  mV y posteriormente descienden en una rampa de potencial hasta los  $-140$  mV. El tiempo de la rampa varió según las condiciones experimentales (ver Materiales y métodos). El voltaje en el cual ocurre el entrecruzamiento de las corrientes corresponde al  $E_r$  experimental. Para obtener el valor de entrecruzamiento de los trazos de corriente, se calculó la varianza entre los trazos de corrientes producidos por la rampa de potencial. El punto de menor varianza calculada indicó el entrecruzamiento para cada registro (figura 11).



**Figura 10. Estimación del  $E_r$  a través de un protocolo de pulsos de potencial con rampa.** (A) Registro y protocolo de pulsos representativo usado para estimar el  $E_r$  de las  $I_{H^+}$  de MDSC. El protocolo utilizado escaló con pulsos de duración variada, desde -90 mV hasta +130 mV en incrementos de 10 mV. Luego, todos los pulsos terminaron en una rampa de potencial desde +130 mV hasta -140 mV. (B) Se muestra un acercamiento de los trazos de corrientes y la rampa de voltaje, señalando el potencial al cual ocurre el entrecruzamiento  $E_r = 0$  mV a  $\Delta pH = 0$ .

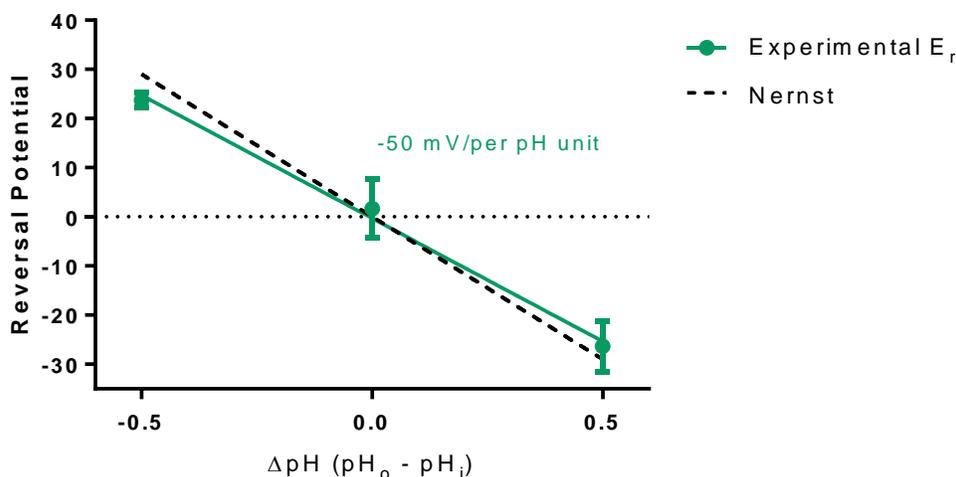


**Figura 11. Varianza de los trazos de corrientes producidos por la rampa de potencial.** El punto al cual ocurre el entrecruzamiento de las  $I_{H^+}$  se estimó a partir del cálculo de la varianza a partir de 2000 isócronas. El valor mínimo de varianza correspondió al tiempo de entrecruzamiento. En la figura se muestra de manera representativa el análisis realizado para cada uno de los registros.



**Figura 12. Registros representativos tomados a distintos valores de  $\Delta pH$  para estimar la selectividad a través de  $E_{H^+}$ .** Los registros fueron obtenidos a  $\Delta pH = -0.5, 0$  y  $0.5$ ; para estimar la selectividad de las corrientes a través de mediciones del potencial de reversión.

Los valores obtenidos de  $E_r$  se muestran en la figura 13, los cuales ajustaron a una línea recta, cuya pendiente tiene un valor de -50 mV por unidad de pH. La línea discontinua corresponde al valor de potencial de reversión predicho por la ecuación de Nernst, el cual corresponde a -58 mV por unidad de pH para un canal selectivo a  $H^+$  a 22°C.



**Figura 13. Estimación del  $E_r$  de las  $I_{H^+}$  de MDSC.** En la figura se muestra la relación entre el  $E_r$  y el  $\Delta pH$ . Los valores experimentales se ajustaron a una regresión lineal que predijo un valor de -50 mV por unidad de pH. La línea discontinua corresponde al valor estimado por la ecuación de Nernst, el cual es -58 mV por unidad de pH.

Este resultado sugiere que estas corrientes son selectivas a  $H^+$  y que, la diferencia que estos valores tienen con respecto al valor teórico, predicho por la ecuación de Nernst, puede deberse a que en este sistema se expresen de manera nativa otro tipo de proteínas de membrana que puedan conducir partículas cargadas, tales como conexinas o canales de cloruro, los cuales puedan generar otro tipo de conductancias adicionales y alterar este resultado. Esto se puede fundamentar a través de la ecuación de Millman (Millman, 1940), también llamada *Chord Conductance Equation*, la cual dice que el potencial de membrana ( $E_m$ ) es el promedio del potencial de equilibrio de cada ion contribuyente :

$$E_m = \frac{\sum(g_i \times E_i)}{g_{total}}$$

La cual, para nuestros resultados, podría escribirse de la forma:

$$E_m = \frac{g_{H^+} \times E_{H^+} + g_{leak} \times E_{leak}}{g_{total}}$$

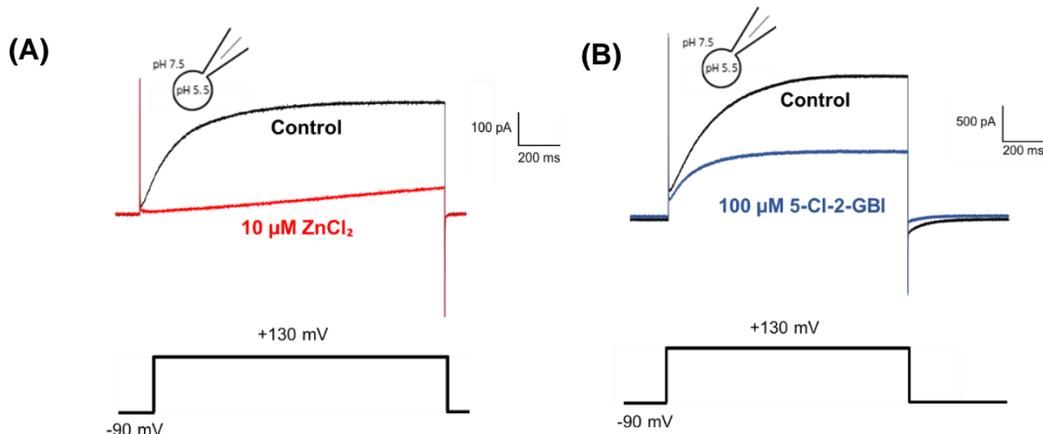
Donde las conductancias producidas por otro tipo de ion o iones contribuyentes han sido denominadas como *leak*.

Otra posibilidad es que los datos presenten una ligera depleción de protones, fenómeno que cambia el gradiente electroquímico de los  $H^+$  y en consecuencia cambia en potencial de reversión.

La farmacología para el canal  $H_v1$  es bien conocida, donde  $Zn^{+2}$  y los derivados del guanidinio son los inhibidores más efectivos (Hong et al., 2014). El ion divalente posee dos sitios de unión, ambos extracelulares, mientras que los derivados del guanidinio se unen en el vestíbulo intracelular de la proteína.

Es importante destacar que, los fármacos derivados del guanidinio, en su mayoría son compuestos que no atraviesan la membrana celular y por esta razón, no es posible realizar ensayos de inhibición con la técnica de *patch-clamp* la configuración de *whole-cell*. Afortunadamente, dentro de esta familia de fármacos se encuentra el 5-cloro-2-guanidinobezoimidazol (CIGBI), el cual si pasa a través de la membrana e inhibe las  $I_{H^+}$  en concentraciones  $\mu M$ .

Para evaluar la farmacología de  $H^+$  de MDSC, se registró un pulso de corriente antes y después de perfundir las células con los bloqueadores  $Zn^{+2}$  y CIGBI. En la figura 14, se puede observar que las corrientes son fuertemente inhibidas luego de aplicar 10  $\mu M$  de  $ZnCl_2$  y 100  $\mu M$  de CIGBI, respectivamente.



**Figura 14. Las corrientes de protones son inhibidas por  $ZnCl_2$  y CIGBI.** (A) Registros de corriente generado por una despolarización de -90 a +130 mV en presencia de un  $\Delta pH = 2$ , antes (Control) y después (trazo rojo) de 4 minutos de perfusión con 10  $\mu M$   $ZnCl_2$  en la solución de baño. (B) Corresponde a otra célula en las mismas condiciones de  $\Delta pH$ , antes (Control) y después (trazo azul) de 1 minuto de perfusión con 100  $\mu M$  de CIGBI.

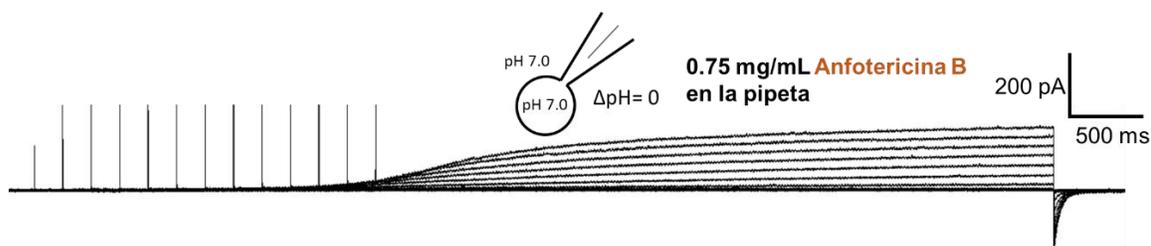
Esta caracterización electrofisiológica en conjunto con los resultados de SDS-PAGE Western-blot y citometría de flujo, permiten concluir que este sistema celular expresa de manera funcional un canal de protones sensible a voltaje,  $mH_v1$ , cuyas corrientes poseen características similares a las reportadas en la literatura (DeCoursey, 2013).

Entre los mecanismos de inmunosupresión que se han descrito para las Células Supresoras de Origen Mieloide, se encuentra la producción de altos niveles de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Gabrilovich et al., 2012), donde el productor primario de  $O_2^{\cdot-}$  (precursor de ROS y RNS) en MDSC es la enzima NOX2 (Lu & Gabrielovich, 2012). La expresión funcional del canal de protones  $H_v1$  en las MDSC podría estar relacionada a actividad enzimática de este complejo para permitir la producción de especies reactivas durante los mecanismos de inmunosupresión (ver Introducción).

Para evaluar el acoplamiento funcional entre NOX2 y  $H_v1$  en MDSC se evaluó la actividad del complejo enzimático (reflejado en la tasa de producción de ROS) en presencia y ausencia del inhibidor específico de  $H_v1$ , CIGBI. El PMA es uno de los estimuladores de producción de ROS vía NOX más utilizados en la literatura, el cual también ha sido usado en células del sistema inmunológico de ratón para evaluar acoplamiento funcional entre  $H_v1$  y NOX2 (Brandes et al., 2014; DeCoursey et al., 1996; Morgan et al., 2005; Szteyn et al., 2012). Esta molécula se une fuertemente a la proteína quinasa C (PKC) gatillando su activación (Brandes et al., 2014). Esta quinasa una vez activada, fosforila sitios clave en distintas subunidades del complejo NOX2 lo cual induce su ensamblaje funcional en la membrana y, en consecuencia, comienza la producción de ROS.

La primera aproximación experimental, consistió en realizar experimentos electrofisiológicos utilizando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado para registrar las corrientes de  $H_v1$  tras la estimulación con forbol 12-miristato-13-acetato (PMA). La idea de este planteamiento experimental tiene por objetivo observar desplazamientos en las curvas de activación del canal  $H_v1$ , tras la aplicación del activador.

En la figura 15 se observa un registro representativo de una corriente de protones en MDSC, la cual se obtuvo usando una concentración de 0.75 mg/mL de anfotericina B en la solución de la pipeta en condiciones de  $\Delta\text{pH} = 0$ , con  $\text{pH}_{\text{in}} = \text{pH}_{\text{out}} = 7.0$ . En la figura 1 de la sección de anexos, además, se muestra el curso temporal de la perforación de un experimento típico para poder obtener la configuración de parche perforado (ver Anexos).

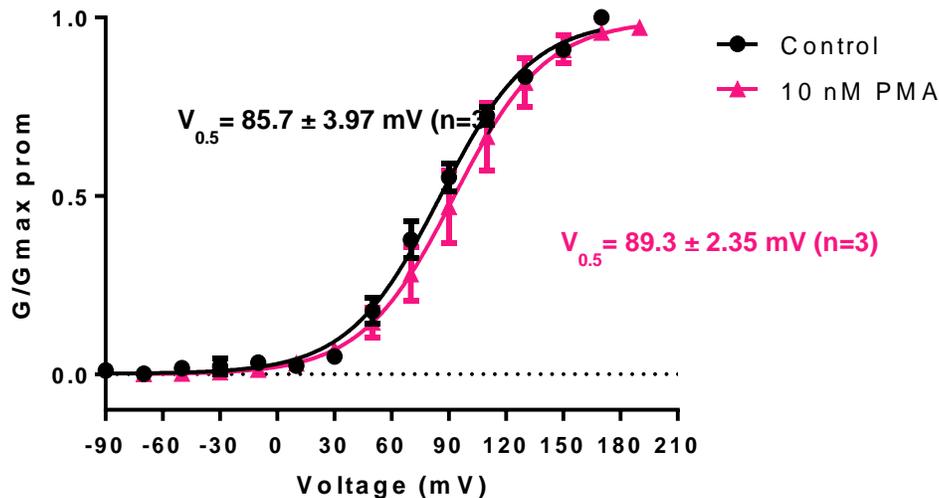


**Figura 15. Registros de corriente representativos obtenidos con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado en MDSC.** Las corrientes fueron registradas a  $\Delta\text{pH} = 0$ , usando 0.75 mg/mL de Anfotericina B en la solución de la pipeta. Las corrientes fueron obtenidas a través de un protocolo de pulsos optimizado para evitar la depleción de protones, el cual escaló desde el -90 mV a +130 mV en saltos de 20 mV.

Al estimular las células con 10 nM PMA durante 10 a 20 minutos con PMA, no se observa diferencias con respecto a la curva de activación control (figura 16). Sin embargo, si se aumenta la concentración del éster de forbol los sellos se vuelven inestables impidiendo realizar registros de corriente en la configuración de parche perforado. Frente a estos resultados surgen dos posibles explicaciones. Por un lado, es posible que, en este sistema celular  $\text{H}_v1$  y NOX2 no se encuentren acoplados funcionalmente. La otra opción es que simplemente la técnica de *path-clamp* en la configuración de parche perforado no sea la técnica adecuada para medir acoplamiento funcional en este tipo celular.

Por esta razón, se recurrió a la técnica de citometría de flujo como alternativa experimental para evaluar si existe acoplamiento funcional en MDSC.

Se realizó entonces mediciones de producción de ROS intracelular en presencia de los inhibidores de  $\text{H}_v1$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y CIGBI. Las MDSC fueron tratadas con 1 mM  $\text{ZnCl}$  y 200  $\mu\text{M}$  CIGBI y los resultados obtenidos se contrastaron con lo obtenido en la condición control vehículo, PBS 1X y DMSO, respectivamente.

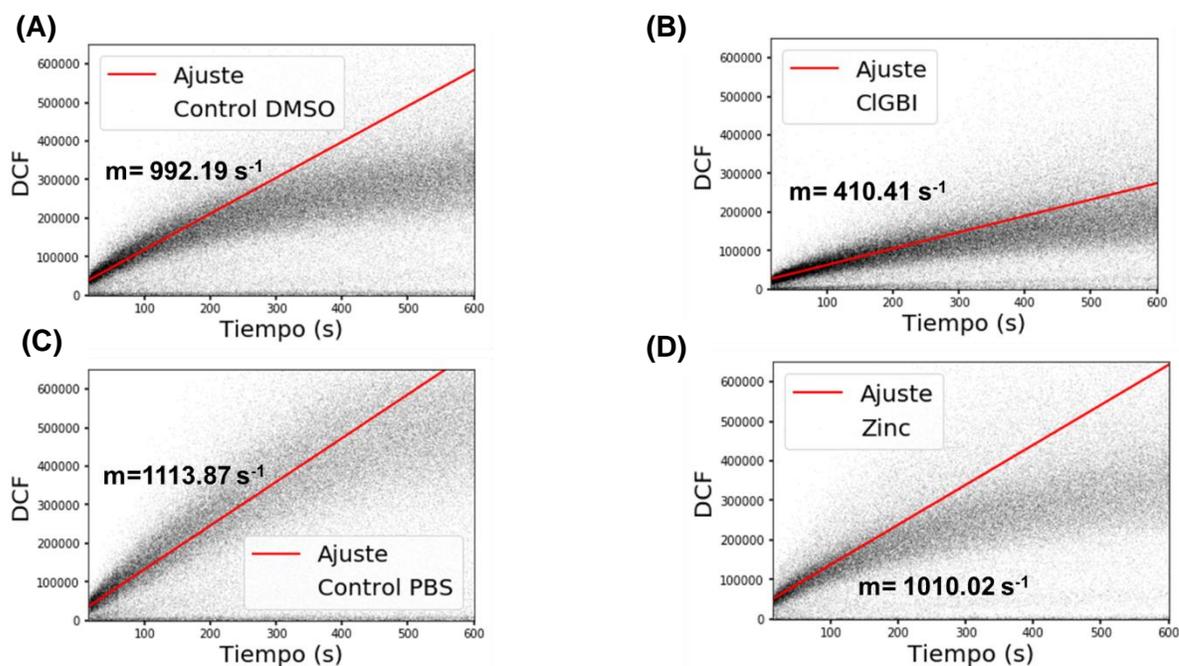


**Figura 16. Curvas de activación del canal Hv1 en MDSC usando la configuración de parche perforado a  $\Delta\text{pH } 0$ .** Curvas de activación obtenidas en células MDSC sin estimular (● círculos negros, control) y en células MDSC incubadas entre 10 a 20 minutos con 10 nM PMA (▲ triángulos rosados). La diferencia entre los  $V_{0.5}$  no es estadísticamente significativa.

Para evaluar la producción de ROS en esta población celular, se utilizó la sonda fluorescente, DCF. La IF de esta sonda se relaciona de manera lineal con la producción de ROS. Así, se evaluó el cambio de la IF de DCF en MDSC en presencia y ausencia de 1 mM ZnCl y 200  $\mu\text{M}$  CIGBI.

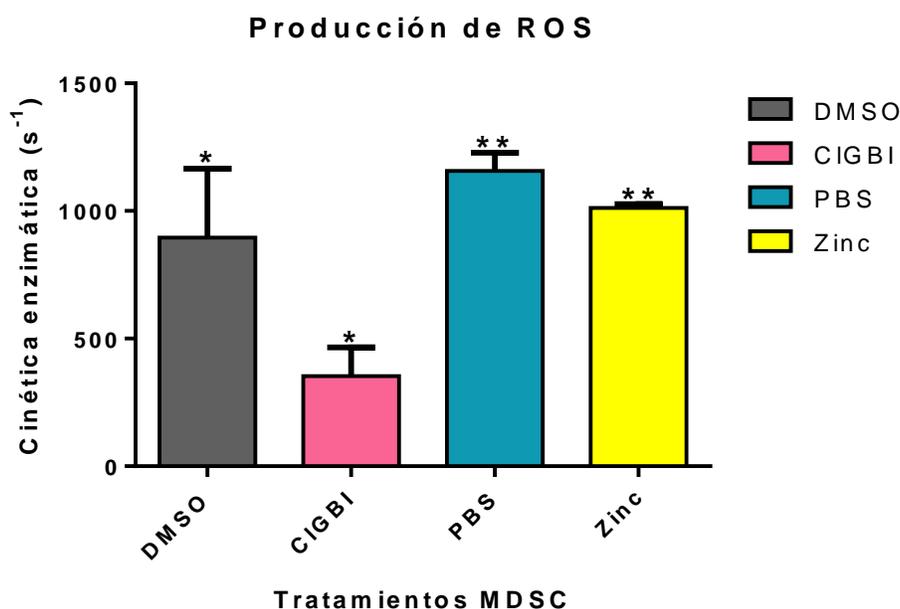
En la figura 17, se presentan resultados representativos donde se puede observar el cambio de la IF de DCF en función del tiempo, para cada uno de los tratamientos antes mencionados. El experimento comenzó con la adición de 100 nM PMA a las MDSC en suspensión y se registró la IF durante 10 minutos. Cada uno de los puntos que compone la curva IF en función del tiempo corresponde a un evento (célula) que es registrado por el citómetro de flujo.

Así, a partir de estos datos se realizó dos análisis para evaluar la actividad enzimática asociada a la producción de ROS: (1) se estimó la cinética enzimática a partir de la pendiente inicial del curso temporal de producción de ROS y (2) se comparó la intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida en la parte final de la curva para cada una de las condiciones experimentales.



**Figura 17. Curso temporal de la producción de ROS en MDSC en presencia de inhibidores de  $H_v1$  y estimación de la cinética enzimática.** En la figura se observa un experimento representativo para cada condición, donde se evaluó la producción de ROS, luego de la estimulación con 100 nM PMA, a través de la medición de la intensidad de fluorescencia DCF. Cada gráfico corresponde al curso temporal de la intensidad de fluorescencia, donde la línea roja corresponde al ajuste de la pendiente inicial que indica la cinética enzimática asociada a dicha producción. **(A)** Corresponde MDSC incubadas con DMSO (control vehículo CIGBI), cuya pendiente tiene un valor de  $m = 992.19 \text{ s}^{-1}$ . **(B)** corresponde al experimento de MDSC incubadas con 100  $\mu\text{M}$  CIGBI ( $m = 410.41 \text{ s}^{-1}$ ). **(C)** Corresponde al experimento de MDSC incubadas con PBS 1X (control vehículo de ZnCl) cuya pendiente inicial tiene un valor de  $m = 1113.87 \text{ s}^{-1}$  y **(D)** corresponde al experimento de MDSC incubadas con 1 mM ZnCl, con una pendiente asociada de  $1010.02 \text{ s}^{-1}$ .

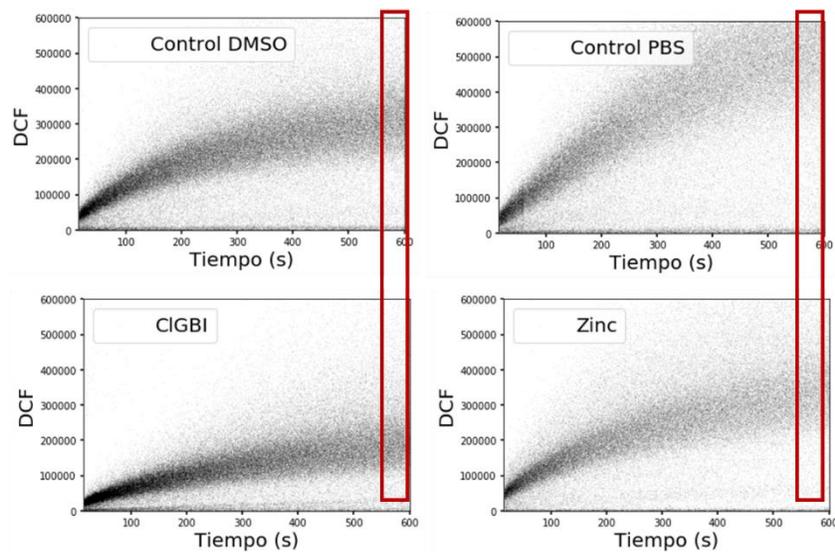
Entonces, se muestra cómo aumenta la producción de ROS tras la estimulación de PMA en las MDSC y como esta producción es modulada por cada uno de los tratamientos. Los resultados obtenidos para tres experimentos independientes (MDSC obtenidas de diferentes animales) son resumidos en los gráficos de la figura 18. Aquí, podemos observar que la cinética es fuertemente modulada por el tratamiento con el inhibidor específico de  $H_v1$  y en menor magnitud por  $\text{Zn}^{+2}$ . Para comparar cada resultado obtenido con su respectivo control, se utilizó la prueba estadística no paramétrica *Kruskal-Wallis* con un valor  $p < 0.05$ . En ambos tratamientos se observa una disminución estadísticamente significativa, donde la diferencia menos acentuada del tratamiento con el ZnCl se puede deber a que es una molécula poco específica.



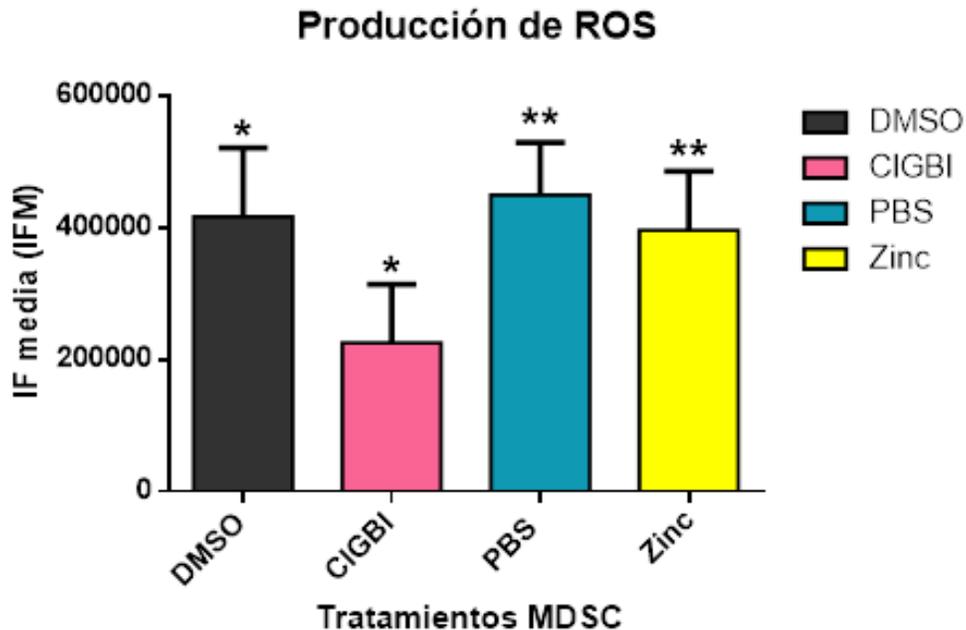
**Figura 18. Actividad enzimática relacionada a la producción de ROS en MDSC en presencia y ausencia de inhibidores de H<sub>v</sub>1.** En el gráfico se observa los resultados obtenidos del análisis de la pendiente inicial para estimar la cinética enzimática asociada a la producción de ROS para tres experimentos independientes entre sí (MDSC obtenidas de tres animales distintos) el tratamiento de 1 mM ZnCl<sub>2</sub> y 200 μM CIGBI. Los asteriscos indican diferencias significativas  $p < 0.05$  entre cada condición y sus respectivos controles, de acuerdo con la prueba estadística no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

Por otro lado, en la figura 19 se señala donde se recolectaron los datos para realizar los análisis de la IFM. En la figura 20 se encuentran resumidos los resultados obtenidos para los tres experimentos independientes entre sí.

Estos resultados nos permiten concluir que al usar moléculas que inhiben las  $I_{H^+}$  la producción de ROS en MDSC se ve disminuida significativamente. Las MDSC son una población celular que produce grandes cantidades de ROS vía NOX2. Así, estos resultados sugieren que la actividad del canal de protones H<sub>v</sub>1 se encuentra acoplada funcionalmente a NOX2 en MDSC.



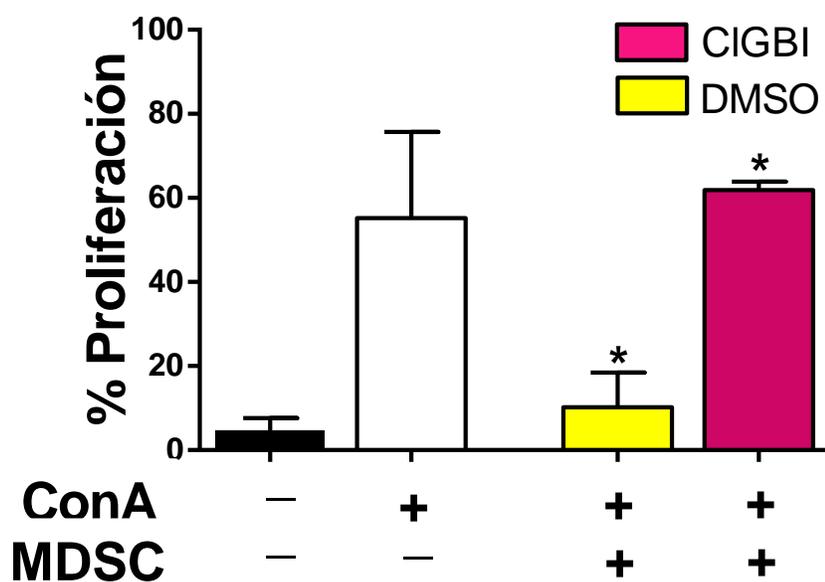
**Figura 19. Análisis de IFM de la sonda DCF en MDSC para cada uno de los tratamientos.** En el gráfico se señala de donde fueron colectados los datos de intensidad de fluorescencia para comparar así la intensidad IFM entre las condiciones y sus respectivos controles.



**Figura 20. IFM de la sonda DCF asociada a la producción de ROS en MDSC en presencia y ausencia de inhibidores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** En el gráfico se observa los resultados obtenidos del análisis de la intensidad de fluorescencia media de la sonda reportera de ROS, DCF, para tres experimentos independientes entre sí con uno de los tratamientos. Los asteriscos indican diferencias significativas  $p < 0.05$ , de acuerdo con la prueba estadística no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

Uno de los mecanismos por el cual las MDSC ejercen su inmunosupresión es a través de la producción de ROS (ver Introducción). Los ensayos de proliferación de linfocitos T co-cultivados con MDSC son ensayos rutinarios para caracterizar la actividad inmunosupresora de estas últimas (Bronte et al., 2016; Millrud, et al., 2016; Raber et al., 2014). Por lo tanto, para evaluar si la disminución de ROS producida por el tratamiento con los inhibidores de H<sub>v</sub>1, también afecta la capacidad inmunosupresora de MDSC, se realizó ensayos de proliferación de linfocitos T (LT) co-cultivándolos con MDSC con y sin el pretratamiento con el inhibidor específico CIGBI.

Para estos ensayos se realizaron co-cultivos de MDSC (con y sin tratamiento de CIGBI) y LT en una proporción 1:20 (MDSC:LT). La mitosis de los linfocitos T se estimuló con 2  $\mu$ M del mitógeno Concanavalina A. La figura 21 resume en un gráfico de barras, los resultados obtenidos para los experimentos de proliferación de linfocitos T co-cultivados con MDSC con y sin tratamiento de CIGBI.



**Figura 21. Ensayos de proliferación de LT co-cultivadas con MDSC pretratadas con CIGBI.** Ensayos de proliferación de linfocitos T co-cultivados en una proporción de 1:20 (MDSC:LT) en presencia (rosado) y ausencia (control vehículo, amarillo) del inhibidor específico de H<sub>v</sub>1, CIGBI. En la figura se observa que el porcentaje de proliferación de LT es restaurado en aquellos co-cultivos con MDSC tratadas con CIGBI, lo que indica que en estas células se afectó su capacidad inmunosupresora. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes entre sí (n=3), donde \*p < 0.05 de acuerdo con la prueba estadística no paramétrica *Kruskal-Wallis*.

Para estos experimentos, evaluamos la proliferación de los LT en distintos grupos experimentales. Se preparó dos grupos control de LT: (1) LT en ausencia de estímulos (ConA<sup>-</sup>/MDSC<sup>-</sup>, barra negra), y (2) presencia del mitógeno sin MDSC (ConA<sup>+</sup>/MDSC<sup>-</sup>, barra blanca). Por otro lado, se preparó otros dos grupos experimentales donde se co-cultivó MDSC y LT en una proporción 1:20 (MDSC:LT). En el primer grupo de co-cultivo, se evaluó la proliferación de los LT co-cultivados con MDSC pretratadas con el control vehículo (ConA<sup>+</sup>/MDSC<sup>+</sup>/DMSO, barra amarilla) y en el segundo grupo, se evaluó la proliferación de los LT co-cultivados con MDSC pretratadas con 200 μM CIGBI (ConA<sup>+</sup>/MDSC<sup>+</sup>/CIGBI, barra rosada).

Para el grupo control de LT ConA<sup>-</sup> (barra negra), se tiene un porcentaje de proliferación bajo como es de esperar para un grupo de células en ausencia de agente mitógeno. Por otro lado, para el segundo grupo control (barra blanca), el porcentaje de proliferación incrementa casi en un 60% cuando los LT se cultivan en presencia de mitógeno.

Para los grupos experimentales de proliferación con MDSC tratadas con el control vehículo (barra amarilla) y con el inhibidor CIGBI (barra rosada), podemos observar que el porcentaje de proliferación de células T para los co-cultivos con MDSC tratadas con el vehículo no afecta la inmunosupresión, lo que se refleja en un bajo porcentaje de proliferación de LT. Sin embargo, si observamos el porcentaje de proliferación de LT en aquellos ensayos con MDSC tratadas con el inhibidor de H<sub>v</sub>1 (barra rosada), podemos notar que la inmunosupresión es abolida, encontrándonos con que la proliferación es restaurada al nivel del segundo control (barra blanca).

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que el canal H<sub>v</sub>1 se encuentra acoplado a la actividad del complejo enzimático NOX2 y que además dicho acoplamiento funcional, podría ocupar un rol protagónico en los mecanismos de inmunosupresión modulados por ROS usados por esta célula antiinflamatoria del sistema inmunológico.

## Conclusión

Este estudio corresponde a la primera evidencia sobre la expresión del canal H<sub>v</sub>1 en las células supresoras de origen mieloide que, a su vez, resulta un hallazgo interesante ya que su presencia había sido estudiada y caracterizada en células del sistema inmunológico con actividad proinflamatoria (DeCoursey, 2010; DeCoursey et al., 2003; Morgan et al., 2009; Musset et al., 2008; Sztejn et al., 2012), y no en una célula del sistema inmunológico con actividad antiinflamatoria, como MDSC. Este canal parece tener un papel importante en la producción de especies reactivas de oxígeno a través del complejo enzimático NOX2, el cual está involucrado en los mecanismos de supresión que MDSC ejerce en otras células del sistema inmunológico. Este reporte se llevó a cabo a través de distintas aproximaciones experimentales tales como Western blot, citometría de flujo y electrofisiología.

El H<sub>v</sub>1 que las MDSC expresan en su membrana tiene las características típicas de un canal H<sub>v</sub>1, el cual a su vez se evidenció a través de una lectura en la producción de ROS usando citometría de flujo que se encuentra acoplado funcionalmente al complejo NOX2 para sustentar la producción de especies reactivas involucradas en los mecanismos de supresión de linfocitos T.

A través de metodologías en cultivo celular, tal como el co-cultivo de LT y MDSC, se evidenció que este acoplamiento funcional entre ambas entidades moleculares es importante para la función inmunosupresora de estas células antiinflamatorias.

Este hallazgo podría ser importante para ampliar las perspectivas terapéuticas contra el cáncer, donde las Células Supresoras de Origen Mieloide juegan un rol importante en la inhibición de los linfocitos T, en el microambiente tumoral. Diseñar un bloqueador específico para H<sub>v</sub>1 podría ser una estrategia interesante y eficiente para coartar la maquinaria enzimática de NADPH oxidasa que comanda la inmunosupresión.

## Referencias

- Alvarez, B., & Radi, R. (2003). Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins Review Article, 295–311. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0018-8>
- Babior, B. M., Kipnes, R. S., & Cumvu, J. T. (1973). CONCISE Biological Defense Mechanisms, 52(March), 741–744. <https://doi.org/10.1172/JCI107236.00.02>
- Bánfi, B., Schrenzel, J., Nüsse, O., Lew, D. P., Ligeti, E., Krause, K. H., & Demaurex, N. (1999). A novel H(+) conductance in eosinophils: unique characteristics and absence in chronic granulomatous disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(2), 183–194. <https://doi.org/10.1084/jem.190.2.183>
- Baniyash, M. (2004). TCR  $\zeta$ -CHAIN DOWNREGULATION : CURTAILING AN EXCESSIVE INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE. <https://doi.org/10.1038/nri1434>
- Blancher, C., & Jones, A. (n.d.). SDS-PAGE and Western Blotting Techniques, 57.
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Free Radical Biology and Medicine Nox family NADPH oxidases : Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 208–226. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- Castagnag, M., & Yoshimi, T. (1982). Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters, 257(13), 7847–7851.
- Cherny, V. V., & DeCoursey, T. E. (1999). pH-dependent inhibition of voltage-gated H(+) currents in rat alveolar epithelial cells by Zn(2+) and other divalent cations. *The Journal of General Physiology*, 114(6), 819–838. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.6.819>
- Cherny, Vladimir V, Murphy, R., Sokolov, V., Levis, R. a, & DeCoursey, T. E. (2003). Properties of single voltage-gated proton channels in human eosinophils estimated by noise analysis and by direct measurement. *The Journal of General Physiology*, 121(6), 615–628. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308813>
- Corzo, C. A., Cotter, M. J., Cheng, P., Cheng, F., Kusmartsev, S., Sotomayor, E., ... Gabilovich, D. I. (2009). Mechanism Regulating Reactive Oxygen Species in Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology*,

- 182(9), 5693–5701. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900092>
- Cuenca, A. G., Delano, M. J., Kelly-scumpia, K. M., Moreno, C., Scumpia, P. O., Laface, D. M., ... Moldawer, L. L. (2011). A Paradoxical Role for Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis and Trauma, *17*(April), 281–292. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00178>
- De-la-Rosa, V., Suárez-Delgado, E., Rangel-Yescas, G. E., & Islas, L. D. (2016). Currents through Hv1 channels deplete protons in their vicinity. *The Journal of General Physiology*, *147*(2), 127–136. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511496>
- De Kruijff, B., Gerritsen, W. ., Oerlemans, A., Demel, R. ., & Van Deenen, L. . (1974). Preparation of liposomes ( a ) Liposomes for K + leak experiments . Liposomes were prepared by dispersing, *339*, 30–43.
- DeCoursey, T. E. (2013). Voltage-Gated Proton Channels: Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology of the HV Family. *Physiological Reviews*, *93*(2), 599–652. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2012>
- DeCoursey, T. E., & Cherny, V. V. (1993). Potential, pH, and arachidonate gate hydrogen ion currents in human neutrophils. *Biophysical Journal*, *65*(4), 1590–1598. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81198-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81198-6)
- DeCoursey, T. E., & Cherny, V. V. (1996). II. Voltage-activated proton currents in human THP-1 monocytes. *Journal of Membrane Biology*, *152*(2), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s002329900092>
- DeCoursey, T. E., Kim, S. Y., Silver, M. R., & Quandt, F. N. (1996). III. Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. *Journal of Membrane Biology*, *152*(2), 141–157. <https://doi.org/10.1007/s002329900093>
- Decoursey, T E, Cherny, V. V, Zhou, W., & Thomas, L. L. (2000). Simultaneous activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human neutrophils, *97*(12), 6885–6889.
- DeCoursey, T E, Cherny, V. V, Zhou, W., & Thomas, L. L. (2000). Simultaneous activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6885–6889. <https://doi.org/10.1073/pnas.100047297>
- Decoursey, T E, & Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity, *62*, 2173–2193. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5177-1>
- DeCoursey, Thomas E., & Cherny, V. V. (1996). Effects of buffer concentration on

- voltage-gated H<sup>+</sup> currents: Does diffusion limit the conductance? *Biophysical Journal*, 71(1), 182–193. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79215-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79215-9)
- DeCoursey, Thomas E., Morgan, D., & Cherny, V. V. (2003). The voltage dependence of NADPH oxidase reveals why phagocytes need proton channels. *Nature*, 422(6931), 531–534. <https://doi.org/10.1038/nature01523>
- DeCoursey, Thomas E., & Cherny, V. V. (2007). Pharmacology of voltage-gated proton channels. *Current Pharmaceutical Design*, 13(23), 2400–2420. <https://doi.org/10.2174/138161207781368675>
- Decoursey, Thomas E, Cherny, V. V, Morgan, D., Katz, B. Z., & Dinauer, M. C. (2001). The gp91 phox Component of NADPH Oxidase Is Not the Voltage-gated Proton Channel in Phagocytes , but It Helps \*, 36063–36067. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100352200>
- Fernández, A., Oliver, L., Alvarez, R., Hernández, A., Raymond, J., Fernández, L. E., & Mesa, C. (2014). Very small size proteoliposomes abrogate cross-presentation of tumor antigens by myeloid-derived suppressor cells and induce their differentiation to dendritic cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-5>
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-supressor cells as regulators of th eimmune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3), 162–174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>. Myeloid-derived-suppressor
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012a). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews. Immunology*, 12(4), 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012b). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *J Can Res Updates.*, 33(4), 1–18. <https://doi.org/10.1038/nri3175>. Coordinated
- Gonzalez, C., Koch, H. P., Drum, B. M., & Larsson, H. P. (2010). Strong cooperativity between subunits in voltage-gated proton channels. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), 51–56. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1739>
- Gonzalez, C., Rebolledo, S., Perez, M. E., & Larsson, H. P. (2013). Molecular mechanism of voltage sensing in voltage-gated proton channels. *The Journal of General Physiology*, 141(3), 275–285. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210857>
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Amigorena, S., & Th, C. (2002). A NTIGEN P

## RESENTATION AND T C ELL.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>

- Henderson, L. M., Chappell, J. B., & Jones, O. T. (1988). Superoxide generation by the electrogenic NADPH oxidase of human neutrophils is limited by the movement of a compensating charge. *The Biochemical Journal*, *255*(1), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.01.003>.Crucial
- Hong, L., Kim, I. H., & Tombola, F. (2014). Molecular determinants of Hv1 proton channel inhibition by guanidine derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(27), 9971–9976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324012111>
- Hong, L., Pathak, M., Kim, I. H., Ta, D., & Tombola, F. (2013). Voltage-sensing domain of voltage-gated proton channel Hv1 shares mechanism of block with pore domains, *77*(2), 1–20. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0034>.PD-L1
- Koch, H. P., Kurokawa, T., Okochi, Y., Sasaki, M., Okamura, Y., & Larsson, H. P. (2008). Multimeric nature of voltage-gated proton channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(26), 9111–9116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801553105>
- Kusmartsev, S., & Gabrilovich, D. I. (2006). Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *55*(3), 237–245. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0048-z>
- Linley, J. E. (2013). Chapter 11 Perforated Whole-Cell Patch-Clamp Recording, *998*, 149–157. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-351-0>
- Lu, T., & Gabrilovich, D. I. (2012). Molecular pathways: tumor-infiltrating myeloid cells and reactive oxygen species in regulation of tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(18), 4877–4882. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2939>
- Mahmood, T., & Yang, P. (2012a). Western Blot : Technique , Theory , and Trouble Shooting, *4*(9), 7–12. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mahmood, T., & Yang, P. (2012b). Western Blot : Technique , Theory , and Trouble Shooting, *4*(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Millman, J. (1940). A Useful Network Theorem. *Proceedings of the IRE*, *28*(9), 413–

417. <https://doi.org/10.1109/JRPROC.1940.225885>
- Montero, A. J., Diaz-montero, C. M., Kyriakopoulos, C. E., Bronte, V., & Mandruzzato, S. (2012). Myeloid-derived Suppressor Cells in Cancer Patients : A Clinical Perspective, *35*(2), 107–115.
- Morgan, D., Cherny, V. V, Murphy, R., Katz, B. Z., & DeCoursey, T. E. (2005). The pH dependence of NADPH oxidase in human eosinophils. *The Journal of Physiology*, *569*(Pt 2), 419–431. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.094748>
- Musset, B, Cherny, V. V, Morgan, D., Okamura, Y., Ramsey, I. S., Clapham, D. E., & DeCoursey, T. E. (2008). Detailed comparison of expressed and native voltage-gated proton channel currents. *The Journal of Physiology*, *586*(10), 2477–2486. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149427>
- Musset, Boris, Capasso, M., Cherny, V. V, Morgan, D., Bhamrah, M., Dyer, M. J. S., & Decoursey, T. E. (2010). Identification of Thr 29 as a Critical Phosphorylation Site That Activates the Human Proton Channel Hvcn1 in, *285*(8), 5117–5121. <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.082727>
- Musset, Boris, Cherny, V. V, Morgan, D., & DeCoursey, T. E. (2009). The intimate and mysterious relationship between proton channels and NADPH oxidase. *FEBS Letters*, *583*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.005>
- Musset, Boris, Smith, S. M. E., Rajan, S., Cherny, V. V., Sujai, S., Morgan, D., & DeCoursey, T. E. (2010). Zinc inhibition of monomeric and dimeric proton channels suggests cooperative gating. *The Journal of Physiology*, *588*(9), 1435–1449. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188318>
- Musset, Boris, Smith, S. M. E., Rajan, S., Morgan, D., Cherny, V. V., & Decoursey, T. E. (2012). Aspartate112 is the Selectivity Filter of the Human Voltage Gated Proton, *480*(7376), 273–277. <https://doi.org/10.1038/nature10557>.Aspartate
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., ... Gabilovich, D. I. (2007). Altered recognition of antigen is a novel mechanism of CD8+T cell tolerance in cancer. *Nat Med.*, *13*(7), 828–835.
- Neher, E., & Sakmann, B. (1992). The patch clamp technique. *Sci.Am.*, *266*(3), 44–51.
- Niedel, J. E., J, K. L., & Vandebark, G. R. (1983). Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C, *80*(January), 36–40.
- Okamura, Y., Fujiwara, Y., & Sakata, S. (2015). Gating Mechanisms of Voltage-

- Gated Proton Channels. *Current Topics in Membranes*, 74(1), 259–292.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800181-3.00010-5>
- Peranzoni, E., Zilio, S., Marigo, I., Dolcetti, L., Zanovello, P., Mandruzzato, S., & Bronte, V. (n.d.). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current Opinion in Immunology*, 22(2), 238–244.  
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.021>
- Qiu, F., Chamberlin, A., Watkins, B. M., Ionescu, A., Perez, M. E., Barro-Soria, R., ... Larsson, H. P. (2016). Molecular mechanism of Zn<sup>2+</sup> inhibition of a voltage-gated proton channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(40), E5962–E5971.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1604082113>
- Quint, P., Reutzel, R., Mikulski, R., Mckenna, R., & Silverman, D. N. (2006). Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase : Mechanism of inactivation, 40, 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.045>
- Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609>
- Ramsey, I. S., Moran, M. M., Chong, J. A., & Clapham, D. E. (2006). A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*, 440(7088), 1213–1216. <https://doi.org/10.1038/nature04700>
- Ramsey, I. S., Ruchti, E., Kaczmarek, J. S., & Clapham, D. E. (2009). Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7642–7647.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0902761106>
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Review Regulatory T Cells and Immune Tolerance, 775–787.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
- Sasaki, M., Takagi, M., & Okamura, Y. (2006). A Voltage Sensor-Domain Protein Is a Voltage-Gated Proton Channel. *Science*, 312(5773), 589–592.  
<https://doi.org/10.1126/science.1122352>
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., ... Amigorena, S. (2006). NOX2 Controls Phagosomal pH to Regulate Antigen

- Processing during Crosspresentation by Dendritic Cells. *Cell*, 126(1), 205–218.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.035>
- Schmielau, J., & Finn, O. J. (2001). Activated Granulocytes and Granulocyte-derived Hydrogen Peroxide Are the Underlying Mechanism of Suppression of T-Cell Function in Advanced Cancer Patients Activated Granulocytes and Granulocyte-derived Hydrogen Peroxide Are the Underlying Mechanism of Su, 4756–4760.
- Serafini, P. (2013). Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: The good, the bad, and the ugly. *Immunologic Research*, 57(1–3), 172–184. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8455-2>
- Smith-garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (n.d.). T Cell Activation. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>
- Smith et al. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid ', 85, 76–85.
- Szteyn, K., Yang, W., Schmid, E., Lang, F., & Shumilina, E. (2012). Lipopolysaccharide-sensitive H<sup>+</sup> current in dendritic cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(2), C204–C212.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00059.2012>
- Thomas, R. C., & Meech, R. W. (1982). Hydrogen ion currents and intracellular pH in depolarized voltage-clamped snail neurones. *Nature*, 299(5886), 826-8.  
<https://doi.org/10.1038/299826a0>
- Tombola, F., Ulbrich, M. H., & Isacoff, E. Y. (2008). The Voltage-Gated Proton Channel Hv1 Has Two Pores, Each Controlled by One Voltage Sensor. *Neuron*, 58(4), 546–556. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.026>
- Tu, Y., Cooper, A. J., Teng, B., Chang, R. B., Artiga, D. J., Turner, H. N., ... Liman, E. R. (2018). Ion Channels, (March), 1–5.
- Walker, J. M., & Armstrong, D. (n.d.). *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*  
*Edited by.*

## Anexos

**Tabla 1. Volumen de Buffer de lisis estimado para cada tipo de placa de cultivo.**

Volumen Buffer de Lisis ( $\mu\text{L}$ )	Tipo de placa	Volumen de medio de cultivo de la placa (mL)	Área de la placa ( $\text{cm}^2$ )
300	35 mm	2	9
350	60 mm	3	28.2
500	100 mm	10	78.5

**Nota:** Los volúmenes de buffer de lisis empleados para cada tipo de placa son estimaciones realizadas previamente a través de la optimización de protocolo para la obtención de proteínas totales de células de origen mieloide de ratón C57BL6.

**Tabla 2. Composición y mezcla de gel separador (running gel) para SDS-Page Western blot.**

	7.5%	10%	12%	15%
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	2.5 mL	3.3 mL	4.0 mL	5.0 mL
Lower buffer 4X	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Agua bidestilada ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )	4.95 mL	4.15 mL	3.45 mL	2.45 mL
Persulfato amónico (APS)	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
tetrametiletildiamina (TEMED)	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$

	7.5%	10%	12%	15%
Acrilamida/Bisacrilamida 40%	1.9 mL	2.5 mL	3.0 mL	3.8 mL
Lower buffer 4X	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Agua bidestilada ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )	5.55 mL	4.95 mL	4.45 mL	3.65 mL
Persulfato amónico (APS)	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
tetrametiletildiamina (TEMED)	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$

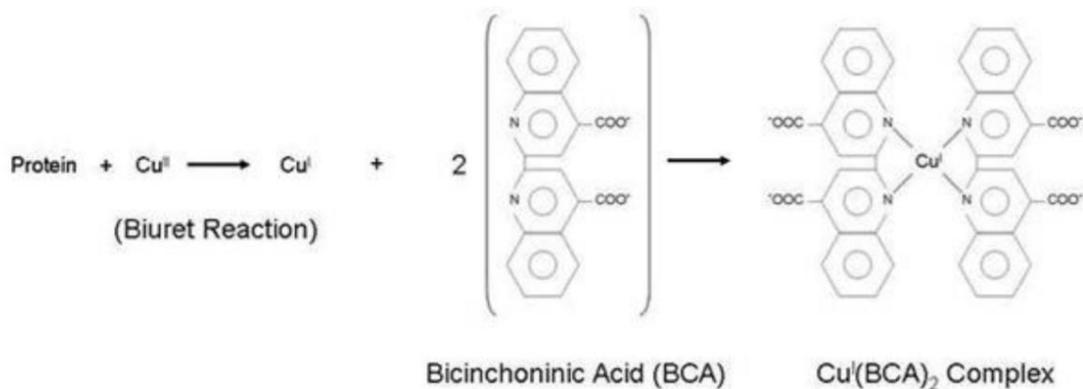
**Tabla 3. Composición y mezcla de gel concentrador (stacking gel) para SDS-Page Western blot.**

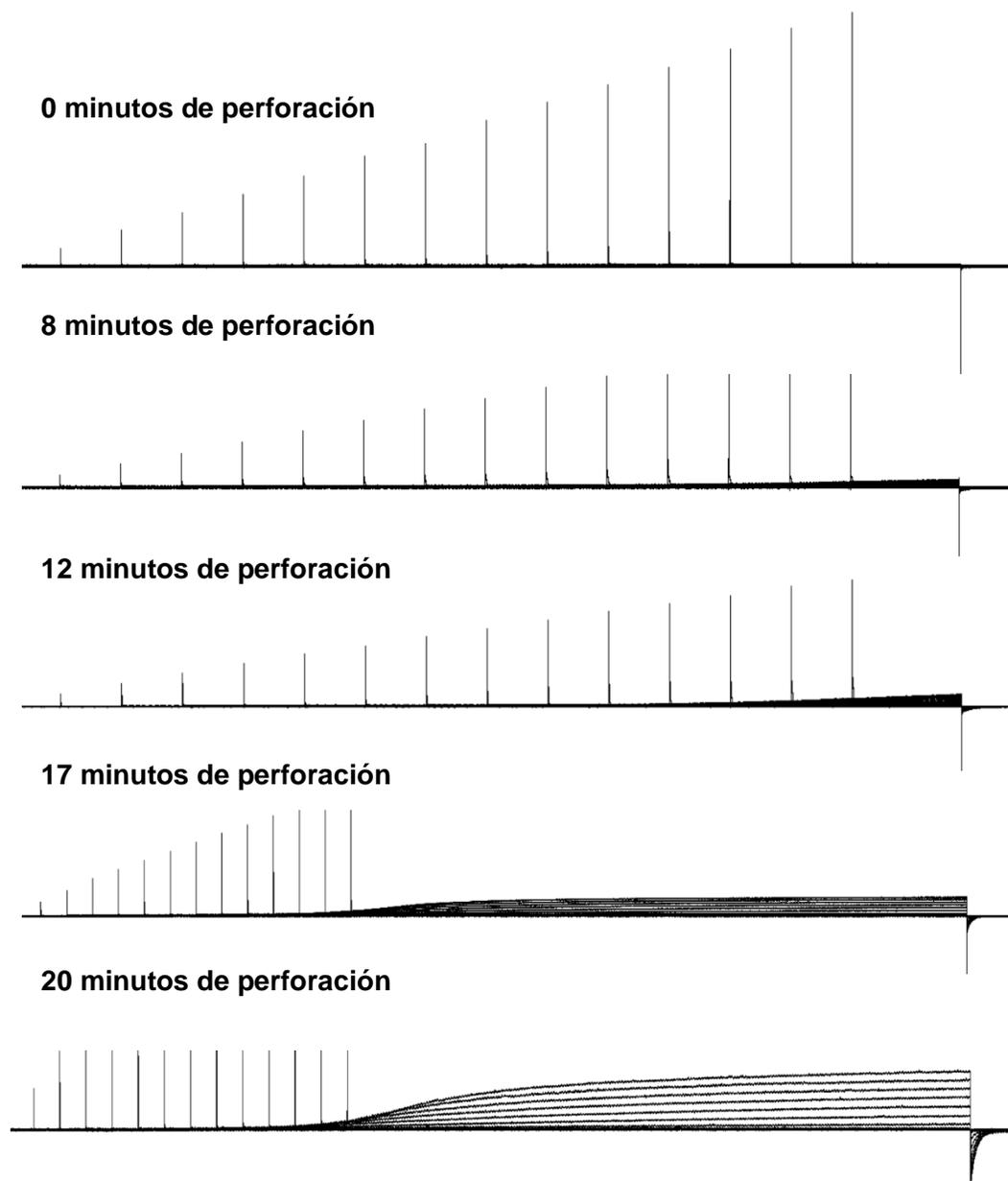
	4.0 %
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.65 mL
Lower buffer 4X	1.25 mL
Agua destilada	3.07 mL
APS	25 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L

**Tabla 4. Anticuerpos y sondas que se utilizarán para los diferentes experimentos en citometría de flujo**

Anticuerpo/Sonda	Dilución	Fluoróforo acoplado	Marca
CD11b Monoclonal Antibody (M1/70)	1:1000	PerCP-Cyanine5.5	Thermo Fisher Scientific
Ly6G (Gr-1) Monoclonal Antibody (RB6-8C5)	1:1000	PE	Thermo Fisher Scientific
Fixable Viability Stain 660 (FVS-660)	1:1000	Sonda Fluorescente	BD Biosciences
Rabbit polyclonal Anti-Hv1, HVCN1 (K-11): sc-136712	1:50	No tiene, anticuerpo primario	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-rabbit IgG	1:100	FITC	Santa Cruz Biotechnology

## Método del ácido bicinonínico para cuantificar proteínas totales





**Figura 1. Curso temporal de la perforación del parche con 0.75 mg/mL de anfotericina B.** Se observa el curso temporal de la perforación de un parche representativo con 0.75 mg/mL de anfotericina B en la pipeta. Observamos que la amplitud de la corriente empieza a aumentar conforme el tiempo. A los 17 minutos de perforación se aumentó la duración de los pulsos de voltaje para poder observar el estado estacionario de las corrientes.

