

Estudio del eje FABP4-PPAR γ en los efectos de los nitroalquenos en monocitos y macrófagos

Tesis de Doctorado
PEDECIBA Biología
Licenciada María Lamas

Tutora: Ana M. Ferreira
Co-tutor: Homero Rubbo

Cátedra de Inmunología
Facultad de Química/Ciencias
Universidad de la República
Diciembre 2019



Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a las agencias financiadoras que hicieron posible este trabajo. A la ANII y la CAP por las becas de maestría y doctorado, a la SUB, AUGM y a la Embajada Británica por las becas que permitieron hacer las pasantías en el exterior, a PEDECIBA por las alcúotas de estudiante e investigador y por los proyectos en los que se me asignaron cargos y finalmente a CSIC por el proyecto iniciación.

Quiero agradecerle a Ana, por haberme hecho parte de su grupo allá por el 2010. Gracias por tu calidez desde el día uno, por estar atenta a todas las cosas académicas que como tutora te incumbían, pero también siempre atenta y cercana cuando se trataba de cosas de la vida. Gracias por haberme transmitido con el ejemplo la dedicación, la rigurosidad y prolijidad que un científico debe tener para con su trabajo. Gracias por buscar siempre transmitir todo lo que sabés en pro de mi crecimiento y fomentar un ambiente de grupo cuasi familiar. Esas cosas por las que trabajas duro hacen que te considere para siempre como mi *madre académica*.

Quiero agradecerle a Homero, por haber sido mi co-tutor desde los inicios. Gracias por la buena onda que te caracteriza. En especial quiero agradecerle por el impulso imprescindible que nos dió para que pudiera defender en tiempo y forma. Nos faltaba coraje y él nos dió el empujón que estábamos precisando.

Quiero agradecer a un montón de colegas y amigos que me dieron una mano en las áreas que no dominaba y que colaboraron compartiendo su conocimiento, su tiempo y sus consejos enriqueciendo mi trabajo. Gracias a Virginia López que me ayudó con la síntesis del ácido nitroaraquidónico, Betina Córscico que me recibió en su laboratorio, donde Gisela Franchini me enseñó a usar el fluorómetro y me guió en la parte experimental. Quiero agradecerle a Natalia Botasso que me ayudó con la purificación de la FABP4 y en especial a Vale y a Jorge que me recibieron en su casa en La Plata durante mi pasantía. A Carlos Batthyány por todos los consejos e ideas que compartió con Ana y conmigo para encarar el trabajo y a Jorge Rodríguez por su buena disposición siempre que precisé algo. Un especial agradecimiento a mi amigo Mauricio Mastrogiovanni por el tiempo que dedicó a explorar posibles efectos de los nitroalquenos en mis experimentos usando el masa, y que a pesar de que no tuvimos éxito siempre se mantuvo dispuesto a ayudarme. A Analía Richeri y Andrés Di Paolo que me ayudaron a sumergirme en el mundo de la microscopía. A Judi Allen por dejarme hacer una pasantía en su laboratorio en medio de una mudanza y en especial a Dominik Rückerl por darme todo el tiempo que no le sobraba sin dudar. A Laura Coitiño, a Jenner Bonanata y en especial a Alicia Merlino, por ayudarnos con los experimentos *in silico*, sin su experiencia y conocimiento en el tema hubiera sido imposible obtener los resultados. Finalmente quiero agradecerle a Bruce Freeman y Francisco Schopfer que me proporcionaron los nitroalquenos. En especial quiero agradecerle a Francisco por el tiempo que le dedicó a estudiar mi trabajo y la calidad científica de sus observaciones y sugerencias.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de Inmuno, grandes científicos, trabajadores, buena gente, que hacen que el laboratorio sea un lugar hermoso de trabajo. Gracias a cada uno por interesarse en cómo iba, por saludarme con una sonrisa cuando pasaba un tiempo sin verlos, por los divertidos almuerzos compartidos. En Inmuno nunca falta una carcajada, un saludo, un abrazo, una mano para ayudar y eso es precioso.

Durante todos estos años, los amigos de la casita del medio fueron la mejor compañía que podría haber pedido. Con el tiempo este grupo fue cambiando pero siempre tuvo personas hermosas, y particularmente quiero agradecerle al plantel actual Ceci, Vale, Maite, Anabella, Mauri, Leti, Yami, Cami S., Sofi, Marcio, Cami M y Nacho, con los que armamos un hermoso grupo

humano, que tira para adelante e inyecta alegría sin medida, ¡gracias a todos por el tiempo convivido y compartido! Quiero agradecerle especialmente a Mauri, Leti, Maite y Anabella por haber sido más de una vez mis confidentes y consejeros. En especial a Maite quién compartió todo esto desde el inicio, codo a codo, siempre ayudándome en lo que podía, ¡gracias Mai por tu alegría y por tu amistad! También quiero agradecer a los otros jefes de la casita del medio, especialmente a Álvaro por valorarme, por siempre darme ánimos y buenos consejos mientras compartíamos un mate en la mañana y a Ceci F. por su cariño, sus consejos y su incuestionable disposición.

Quiero agradecer a mis afectos: a mis abuelas, a mis hermanos, especialmente a Vicu, a mis primos, a mis amigas del Clara, a la familia de Ima, que lejanos a lo que hago y desde su lugar, me acompañaron y se hicieron presentes en este último tiempo con sus mensajes de ánimo y suerte, ¡gracias a todos porque me hicieron sentir muy querida!

Gracias a mis amigos de la banda de FCien, con quienes comparto la vocación, con ellos celebramos los logros y ahogamos las penas de la vida de científicos, y sin duda son de las mejores cosas que me dejó la facultad.

Gracias a mis padres, que desde los inicios de la carrera, me dieron todo para que yo pudiera dedicarme a lo que me gustaba, me apoyaron en mis decisiones y festejaron mis logros. Me enseñaron que uno debe sentir pasión por lo que hace, y que el esfuerzo y la dedicación siempre traen buenos frutos. Son para mí un ejemplo de trabajo, de entrega y de vida.

Finalmente, quiero agradecerle especialmente a Ima, por su compañía a lo largo de este camino, que se hizo fundamental en el último tiempo. Desde tu lugar me aconsejaste infinitas veces, ayudándome a ver las cosas con otra óptica y a crecer como profesional y como persona. Gracias por tu cariño, tu paciencia, tu entendimiento. Gracias por ser mi compañero y amigo.

Índice

Resumen	15
Capítulo 1	17
1.1 Los Nitroalquenos como mediadores lipídicos generados en condiciones fisiológicas.....	18
1.2 Los NO ₂ -FA como moléculas moduladoras de la inflamación	20
1.3 Propiedades químicas de los NO ₂ -FA	21
1.4 Acciones señalizadoras de los nitroalquenos	22
1.4.1 Inhibición de NF-κB	22
1.4.2 Activación de Nrf2	24
1.4.3 Activación de HSF1	26
1.4.4 Activación de PPARγ.....	27
1.4.5 Efecto de la administración de nitroalquenos en modelos de inflamación <i>in vivo</i>	32
1.5 Las FABPs como transportadoras de ácidos grasos en la célula	33
1.6 Las FABPs presentan distintas distribuciones y funciones en el organismo	35
1.6.1 FABP1 – isoforma de hígado.....	35
1.6.2 FABP2 – isoforma de intestino.....	36
1.6.3 FABP4 – isoforma de adipocitos y macrófagos.....	37
1.7 Interacción entre PPARγ y FABP4	39
1.8 Contribución de la FABP4 a la activación de PPARγ.....	40
1.9 Los monocitos y macrófagos como modelo de estudio de los efectos de los NO ₂ -FA mediados por PPARγ	41
1.10 Aspectos básicos de los distintos grupos de monocitos y sus funciones	42
1.11 Aspectos básicos de las respuestas celulares mediadas por macrófagos	43
1.12 PPAR en la diferenciación de macrófagos	45
1.13 Hipótesis	47
1.14 Objetivos	47
Capítulo 2	48
2.1 Introducción	49
2.2 Materiales y Métodos.....	49
2.2.1 Reactivos químicos.....	49
2.2.2 Obtención de la forma recombinante de la FABP4 de ratón	51
2.2.3 Obtención anticuerpos policlonales de conejo anti-FABP4 de ratón	51
2.2.3.a Inmunización de conejos con rFABP4	51
2.2.3.b Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-rFABP4 en conejo: medida del título y avidéz por ELISA.....	52
2.2.3.c Purificación de los anticuerpos policlonales anti-rFABP4 de ratón por inmunoafinidad.....	52

2.2.4	Ensayos de estimulación de monocitos y macrófagos con NO ₂ -FAs	53
2.2.5	Ensayos de viabilidad	54
2.2.6	Análisis de la expresión génica	54
2.2.7	Detección de CD36	55
2.2.8	Detección de FABP4	56
2.2.8.a	Inmunofluorescencia	56
2.2.8.b	Western blot.....	56
2.2.9	Métodos para evaluar la translocación nuclear de la FABP4	57
2.2.9.a	Análisis por inmunofluorescencia	57
2.2.9.b	Análisis mediante fraccionamiento celular seguido de Western blot.....	57
2.2.10	Ensayos <i>in vitro</i> de unión a FABPs	58
2.2.10.a	Ensayos de desplazamiento de sondas fluorescentes	58
2.2.10.b	Análisis <i>in silico</i> de unión a FABP4	59
2.2.11	Análisis de los datos	59
2.3	Resultados.....	60
2.3.1	Estudio de la capacidad de los NO ₂ -FA de activar PPARγ	60
2.3.1.a	Análisis de la expresión de genes reporteros de PPARγ en monocitos y macrófagos	60
2.3.2	Análisis de la expresión de ABCA1, ABCG1 y CPT1A inducida por los NO ₂ -FA en monocitos y macrófagos	64
2.3.3	Estudio de los niveles proteicos de genes reporteros de la activación de PPARγ por NO ₂ -FA..	65
2.3.3.a	Producción de FABP4 recombinante y generación de anticuerpos anti-FABP4 como herramienta para el estudio de los efectos de los NO ₂ -FA sobre monocitos en diferenciación y macrófagos.....	65
2.3.3.b	Análisis de los niveles proteicos de FABP4 y CD36 en monocitos y macrófagos....	69
2.3.4	Dependencia de la activación de PPARγ en los efectos mediados por los NO ₂ -FA en monocitos en diferenciación	72
2.3.4.a	Efecto de la inhibición de PPARγ en la inducción de FABP4 y CD36.....	72
2.3.5	Estudios <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de la interacción FABP4-NO ₂ -FA	74
2.3.5.a	Estudio de la capacidad de los NO ₂ -FA de unirse a FABP	74
2.3.5.b	Estudio del efecto del glutatión sobre la unión FABP4 - NO ₂ -FA	76
2.3.5.c	Análisis de la capacidad de los NO ₂ -FA de unirse a FABP1 y FABP2	77
2.3.6	Estudio del efecto de los NO ₂ -FA sobre la localización celular de la FABP4	78
2.3.6.a	Evaluación de la metodología basada en el fraccionamiento subcelular y Western blot para el análisis de la translocación de la FABP4 al núcleo.....	78
2.3.6.b	Aplicación de la microscopía confocal para el estudio de la translocación de la FABP4	80

2.3.7	Estudio de la exposición de la señal de localización nuclear de FABP4 inducida por la unión de NO ₂ -FA	83
2.3.8	Estudio del papel de la FABP4 en la señalización mediada por los NO ₂ -FA	84
2.3.8.a	Efectos de la inhibición de FABP4 sobre la activación de PPAR γ , Keap1/Nr2 y HSF1 por NO ₂ -FA	84
2.3.9	Efectos de la inhibición de FABP4 sobre las respuestas anti-inflamatorias disparadas por NO ₂ -FA	89
Capítulo 3		91
3.1	Introducción	92
3.2	Materiales y métodos	92
3.2.1	Reactivos químicos	93
3.2.2	Animales de experimentación	93
3.2.3	Preparación de sobrenadante de cultivo de L929	93
3.2.4	Preparación y estimulación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) condicionados con NO ₂ -FA	93
3.2.4.a	Preparación de los BMDM condicionados	93
3.2.4.b	Ensayos de estimulación de BMDM condicionados	94
3.2.5	Obtención y estimulación de macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato	94
3.2.5.a	Obtención de macrófagos peritoneales	94
3.2.5.b	Ensayos de estimulación de macrófagos peritoneales	95
3.2.6	Ensayos de evaluación del fenotipo alternativo en macrófagos peritoneales	95
3.2.7	Determinación de la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo	95
3.2.7.a	Estrategia de selección de las poblaciones celulares hematopoyéticas obtenidas luego del condicionamiento de BMDM	96
3.2.7.b	Estrategia de selección para analizar los marcadores de superficie en las BMDM condicionadas	97
3.2.8	Determinación de la expresión de marcadores intracelulares por citometría de flujo	98
3.2.8.a	Estrategia de selección para analizar la expresión de marcadores de diferenciación alternativa y proliferación en macrófagos de la cavidad peritoneal	99
3.2.8.b	Estrategia de selección para analizar la expresión de marcadores de diferenciación alternativa y proliferación en macrófagos de la cavidad peritoneal reclutados por estimulación con tioglicolato	100
3.2.9	Obtención de extractos celulares	102
3.2.10	Separación de proteínas por SDS-PAGE y Western blot	102
3.2.11	Análisis de la expresión génica	102
3.2.12	Ensayo para la determinación de la actividad arginasa	104
3.2.13	Análisis de los datos	104

3.3	Resultados.....	105
3.3.1	El condicionamiento con los NO ₂ -FA durante la diferenciación de precursores de médula ósea modificó el fenotipo de los macrófagos obtenidos.....	105
3.3.2	El condicionamiento con NO ₂ -FA redujo la expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras, y aumentó la expresión de CD36 en la superficie de los BMDM.....	109
3.3.3	El condicionamiento con NO ₂ -CLA se asoció con la presencia de un mayor contenido de FABP4, dependiente de la activación de PPAR γ	114
3.3.4	Efecto del condicionamiento con NO ₂ -FA sobre la respuesta de los BMDM a estímulos de tipo clásico o alternativo y el posible papel de la FABP4 en dicho condicionamiento.....	116
	3.3.4.a Respuesta de los BMDM condicionados frente al LPS y el posible papel de la FABP4	116
	3.3.4.b Respuesta de los BMDM condicionados a IL4 y el posible papel de la FABP4	118
3.3.5	Estudio <i>in vivo</i> de la capacidad de ligandos de PPAR γ de potenciar la activación alternativa de los macrófagos inducida por IL4.....	122
3.3.6	Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la capacidad de los NO ₂ -FA de potenciar los efectos de la IL4 en macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato	125
	3.3.6.a Los NO ₂ -FA activaron PPAR γ y potenciaron la expresión de <i>Arg1</i> inducida por IL4 en macrófagos reclutados al peritoneo <i>in vitro</i>	125
	3.3.6.b Efecto de los ligandos de PPAR γ sobre la activación de macrófagos peritoneales inducida por IL4 <i>in vivo</i>	128
Capítulo 4	132
4.1	Los NO ₂ -FA actúan como ligandos parciales de PPAR γ en monocitos y en menor medida en macrófagos	133
4.2	La FABP4 regula la señalización de los NO ₂ -FA probablemente actuando como un transportador intracelular.....	136
	4.2.1 Los NO ₂ -FA son potenciales ligandos de la FABP4, pero en las células la unión dependerá de múltiples factores incluyendo los niveles de GSH	136
	4.2.2 La FABP4 actuaría como un <i>transportador no selectivo</i> de potenciales agonistas de PPAR γ .	137
	4.2.3 La FABP4 regula la señalización de los NO ₂ -FA.....	139
4.3	La presencia de los NO ₂ -FA durante la diferenciación de los macrófagos modula la expresión de moléculas de superficie y el nivel de FABP4 en el citosol.	142
4.4	El condicionamiento con los NO ₂ -FA inhibió la capacidad de los BMDM de adquirir un fenotipo inflamatorio tipo M1, por mecanismos independientes de la FABP4	145
4.5	El condicionamiento con los NO ₂ -FA potencia el fenotipo alternativo inducido por la IL4 en las BMDM de manera dependiente de la FABP4.....	145
Conclusiones	150
Publicaciones	152
Bibliografía	153

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1.1: Mecanismos de formación de los nitroalquenos.....	19
Figura 1.2: Esquema de la reacción de adición de Michael	22
Figura 1.3: Esquema de la activación de NF- κ B por ligandos de TLR	23
Figura 1.4: Esquema representativo de la vía Keap1/Nrf2	24
Figura 1.5: Esquema de la vía de HSF1	27
Figura 1.6: Esquema de los dominios de PPAR	28
Figura 1.7: Activación de PPAR γ por agonistas	29
Figura 1.8: Movimiento de la H12 de PPAR γ en presencia de agonistas y antagonistas	30
Figura 1.9: Estructura cristalográfica de FABP4	34
Figura 1.10: ubicación de las señales de localización y exportación nuclear y de la Phe57.	38
Tabla 2.1: Cebadores diseñados para qPCR	55
Figura 2.1: Análisis de la expresión de genes candidatos a reporteros de PPAR γ en monocitos THP-1 en vías de diferenciación a macrófagos y en macrófagos.	62
Figura 2.2: El tratamiento con NO ₂ -FA no afectó la viabilidad de monocitos y macrófagos	62
Figura 2.3: Los NO ₂ -FA indujeron la expresión de <i>FABP4</i> y <i>CD36</i> en monocitos en diferenciación y en menor medida en macrófagos.....	63
Figura 2.4: Análisis de la expresión de <i>ABCG1</i> , <i>ABCA1</i> y <i>CPT1A</i> en monocitos en diferenciación y macrófagos estimulados con NO ₂ -FA.....	65
Figura 2.6: Expresión y purificación de la forma recombinante de la FABP4 murina	67
Figura 2.7: Obtención, caracterización y purificación de anticuerpos de conejo anti-rFABP4.....	69
Figura 2.8: Los NO ₂ -FA indujeron un aumento en la síntesis proteica de FABP4 en monocitos en diferenciación, pero no en macrófagos.....	71
Figura 2.10: La inducción de la expresión de <i>FABP4</i> y <i>CD36</i> por los NO ₂ -FA es dependiente de PPAR γ	73
Figura 2.11: Los NO ₂ -FA desplazaron el ANS unido a la FABP4.....	75
Tabla 2.2: K_{dapp} de los complejos 1:1 rFABP4:FA y rFABP4:NO ₂ -FA	75
Tabla 2.3: $\Delta G_{unión}$ de los complejos 1:1 rFABP4:FA y rFABP4:NO ₂ -FA.....	76
Figura 2.12: El GSH interfirió con la unión del NO ₂ -OA y de otros FA no electrófilos a la rFABP4	77
Tabla 2.4: K_{dapp} de los complejos 1:1 rFABP1/rFABP2:FA y rFABP1/rFABP2:NO ₂ -FA.....	78
Figura 2.13: Evaluación de la translocación al núcleo de la FABP4 mediante fraccionamiento subcelular seguido de análisis por Western Blot.	79
Figura 2.14: Análisis de la translocación nuclear de la FABP4 utilizando microscopía confocal: ajuste de las condiciones experimentales.	81
Figura 2.15: Los NO ₂ -FA no promueven la translocación de FABP4 al núcleo en monocitos en diferenciación.....	83
Tabla 2.5: Peso relativo de la conformación cerrada (expresada en porcentaje) de los complejos FABP4:FA y FABP4:NO ₂ -FA durante simulaciones de dinámica molecular de 1.2 μ s.....	84
Figura 2.16: El tratamiento con BMS y HTS no modificó la expresión o síntesis de FABP4 comparado con la condición basal	85
Figura 2.17: El bloqueo de la actividad de la FABP4 afectó la señalización de los NO ₂ -FA a través de PPAR γ en monocitos en diferenciación	86
Figura 2.18: El bloqueo de la actividad de la FABP4 alteró la capacidad de los NO ₂ -FA de activar las vías de Keap1/Nrf2 y HSF1 en monocitos en diferenciación	87

Figura 2.19: El bloqueo de la actividad de la FABP4 con HTS alteró la capacidad de los NO ₂ -FA de activar las vías de Keap1/Nrf2 y HSF1 en monocitos en diferenciación.	88
Figura 2.20: FABP4 participa en la modulación de la expresión de citoquinas por NO ₂ -FA	90
Figura 3.1: Estrategia de análisis y selección de las poblaciones celulares hematopoyéticas obtenidas al condicionar precursores de médula ósea durante su diferenciación	97
Figura 3.2: Estrategia de selección de los macrófagos BMDM para analizar la presencia en membrana de marcadores de superficie.	98
Figura 3.3: Estrategia de selección para definir los macrófagos peritoneales	100
Figura 3.4: Estrategia de selección para definir los macrófagos de peritoneo reclutados por estimulación con tioglicolato	101
Tabla 3.1: Anticuerpos utilizados en la tinción de citometría de flujo	101
Tabla 3.2: Cebadores diseñados para RT-qPCR en muestras provenientes de monocitos y macrófagos murinos.....	103
Figura 3.5: Efectos del condicionamiento con NO ₂ -FAs sobre el rendimiento de la producción y la viabilidad de las células obtenidas	106
Figura 3.6: El condicionamiento de progenitores de médula ósea con NO ₂ -FAs condujo a un aumento en el porcentaje de la población de macrófagos obtenida	108
Figura 3.7: El condicionamiento con NO ₂ -FAs condujo a un aumento en la expresión de F4/80 en los macrófagos grandes (CD11b ⁺ F4/80 ⁺ FSC ^{alto}).....	109
Figura 3.8: El condicionamiento de los BMDM con los NO ₂ -FAs inhibió la expresión en la membrana plasmática de MHCII.....	110
Figura 3.9: El condicionamiento de los BMDM con los NO ₂ -FAs inhibió la expresión en la membrana plasmática de la molécula co-estimuladora CD86	111
Figura 3.10: El condicionamiento de los BMDM con los NO ₂ -FAs no alteró la expresión en la membrana plasmática de la molécula co-estimuladora CD80	112
Figura 3.11: El condicionamiento de los BMDM con los NO ₂ -FAs aumentó la expresión en la membrana plasmática del receptor barrendero CD36	113
Figura 3.12: No se detectaron cambios dependientes de PPAR γ en la expresión de <i>Fabp4</i> , <i>Cd36</i> y <i>Lpl</i> en BMDM condicionadas con los NO ₂ -FA.	115
Figura 3.13: El condicionamiento de las BMDM con los NO ₂ -FA indujo un aumento en el contenido proteico de FABP4 que fue inhibido por GW9662.....	116
Figura 3.14: El tratamiento de BMDM con LPS indujo la expresión de los genes <i>Nos2</i> e <i>Il6</i> , de forma dosis dependiente.....	117
Figura 3.15: La inhibición de la expresión de <i>Nos2</i> e <i>Il6</i> mediada por el NO ₂ -CLA en BMDM condicionados es independiente de la actividad de la FABP4.....	118
Figura 3.16: El tratamiento de BMDM con IL4 indujo la expresión de los genes <i>Arg1</i> , <i>Chi3l3</i> y <i>Mrc 1</i> de forma dosis dependiente.....	119
Figura 3.17: Los NO ₂ -FA son capaces de potenciar la expresión y actividad de la arginasa 1 inducida por la IL4, por un mecanismos dependiente de la FABP4.....	121
Figura 3.18: La expresión de varios marcadores de diferenciación alternativa inducidos por la IL4 en BMDM condicionados son independientes de la actividad de la FABP4.....	122
Figura 3.19: <i>In vivo</i> no se detectó potenciación por la Rosi de la expresión de <i>Arg1</i> inducida por IL4c en macrófagos peritoneales.....	124
Figura 3.20: El tratamiento con Rosi no modificó la proliferación inducida por IL4c de los macrófagos peritoneales	125

Figura 3.21: Los NO ₂ -FAs logran potenciar <i>in vitro</i> la expresión de <i>Fabp4</i> y <i>Arg1</i> inducida por la IL4 en macrófagos reclutados en el peritoneo por estimulación con tioglicolato	127
Figura 3.22: En presencia de IL4, los NO ₂ -FA y la Rosi indujeron un aumento dependiente de PPAR γ en la expresión de <i>Fabp4</i> en macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato	128
Figura 3.23: El tratamiento con NO ₂ -OA no potenció la expresión de marcadores de diferenciación alternativa inducidos por IL4c en macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato	130
Figura 3.24: El tratamiento con NO ₂ -OA no modificó la proliferación de macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato inducida por IL4c	131
Figura 4.1: El papel del eje FABP4/PPAR γ en la señalización de los NO ₂ -FA en monocitos en diferenciación.....	142

Lista de abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
ABCA1	Miembro 1 de la subfamilia A del casete de unión a ATP, del inglés, <i>ATP-binding cassette sub-family A member 1</i>
ABCG1	Miembro 1 de la subfamilia G de casete de unión a ATP, del inglés, <i>ATP-binding cassette sub-family G member 1</i>
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
ANS	8-Anilinoftaleno-1-Sulfónico
ARE	Elemento de respuesta a antioxidante, del inglés, <i>Antioxidant Response Element</i>
Arg1	Arginasa 1
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea, del inglés, <i>Bone Marrow-Derived Macrophages</i>
BMS	BMS309403, inhibidor de FABP4
BSA	Albúmina de suero bovino, del inglés, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CD3	Cluster de diferenciación 3, marcador fenotípico de Linfocitos T
CD11b	Cluster de diferenciación 11b, marcador fenotípico de células mieloides de la inmunidad innata
CD19	Cluster de diferenciación 19, marcador fenotípico de Linfocitos B
CD36	Cluster de diferenciación 36
CD80	Cluster de diferenciación 80, molécula co-estimuladora
CD86	Cluster de diferenciación 86, molécula co-estimuladora
CD115	Cluster de diferenciación 115, marcador fenotípico de monocitos y macrófagos
Chi3l3	Proteína 3 tipo quitinasa, del inglés, <i>Chitinase-like protein 3</i>
CLA	Ácido linoleico conjugado
CPT1A	Carnitina palmitoil transferasa 1A, del inglés, <i>Carnitine Palmitoyltransferase 1A</i>
c.s.p.	Cantidad suficiente para
DBD	Sitio de unión al ADN, del inglés, <i>DNA Binding Domain</i>
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco, del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPM	Destello por minuto
EAN	Especies activas derivadas del Nitrógeno
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzimoimmunoensayo, del inglés, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
F4/80	Marcador fenotípico de macrófagos, del inglés, <i>Adhesion G protein-coupled receptor E4</i>
FA	Ácido graso, del inglés, <i>Fatty Acid</i>
FABP1	Proteína de unión a ácidos grasos 1, del inglés, <i>Fatty Acid Binding Protein 1</i> , isoforma de hígado
FABP2	Proteína de unión a ácidos grasos 2, del inglés, <i>Fatty Acid Binding Protein 2</i> , isoforma de intestino
FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos 4, del inglés, <i>Fatty Acid Binding Protein 4</i> , isoforma de adipocito/macrófago

FABP5	Proteína de unión a ácidos grasos 5, del inglés, <i>Fatty Acid Binding Protein 5</i> , isoforma de epidermis/queratinocitos
FC	Fracción citosólica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, del inglés, <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
FN	Fracción nuclear
GCLM	Cisteína-glutamato ligasa, del inglés, <i>Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit</i>
GSH	Glutación
GW	GW9662, inhibidor irreversible de PPAR γ
HMOX1	Hemoxigenasa 1
HSF1	Factor de transcripción 1 de choque térmico, del inglés, <i>Heat Shock Transcription Factor 1</i>
HSP70	Proteína de respuesta al choque térmico, del inglés, <i>Heat Shock Protein</i>
HTS	HTS01037, inhibidor de FABP4
IKK	Quinasa de I κ B, del inglés, <i>IκB kinase</i>
I κ B	Inhibidor de NF- κ B, del inglés, <i>Inhibitor of kappa B</i>
IL1B/IL1b	Interleuquina 1 beta
IL4	Interleuquina 4
IL4c	Interleuquina 4 complejo
IL6	Interleuquina 6
IL10	Interleuquina 10
i.p.	intra peritoneal
Keap1	Proteína inhibidora de Nrf2, del inglés, <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LB	Linfocito B
LBD	Dominio de union al ligando, del inglés, <i>Ligand Binding Domain</i>
LT	Linfocito T
LMB	Leptomomicina B
LPS	Lipopolisacárido
Ly6C	Marcador fenotípico de monocitos, del inglés, <i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C</i>
Ly6G	Marcador fenotípico de neutrófilos, del inglés, <i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
MCP1	Proteína quimiotáctica de monócitos, del inglés, <i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
M-CSF	Factor estimulante de colonia de macrófagos, del inglés, <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MHCII	Molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II, del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex II</i>
M-MLV	Retrotranscriptasa, del inglés, <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
Mrc1	Receptor de Manosa, del inglés, <i>Macrophage mannose receptor 1</i>
NF- κ B	Factor nuclear, del inglés, <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	Óxido nítrico
\cdot NO ₂	Radical dióxido de nitrógeno
NO ₂ ⁻	Nitrito

NO ₂ -AA	Ácido nitroaraquidónico conjugado
NO ₂ -CLA	Ácido nitrolinoleico conjugado
NO ₂ -FA	Nitroalqueno
NO ₂ -OA	Ácido nitrooleico conjugado
NO ₂ -SA	Ácido nitroesteárico
Nos2	Sintasa de óxido nítrico 2
Nrf2	Factor nuclear, del inglés, <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
O ₂ ^{-•}	Radical superóxido
OA	Ácido Oleico
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés, <i>Phosphate buffered saline</i>
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
PPAR	Receptor nuclear, del inglés, <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PPRE	Elemento de respuesta a PPAR, del inglés, <i>PPAR response element</i>
Relmα	Proteína codificada por Retnla
Retnla	Molécula alfa tipo resistina, del inglés, <i>Resistin-like molecule alpha</i>
rFABP4	FABP4 recombinante
RN	Receptor nuclear
RPMI	medio del Instituto Roswell Park, del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
Rosi	Rosiglitazona
SDS	laurilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida empleando SDS, del inglés, <i>SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Suero bovino fetal
SF _d	Suero bovino fetal delipidado
SiglecF	Marcador fenotípico de eosinófilos, del inglés, <i>Sialic acid-binding Ig-like lectin 5</i>
STAT6	Factor de transcripción, del inglés, <i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
TCR _β	Receptor de las células T cadena beta, del inglés, <i>T Cell Receptor B chain</i>
TLR	Receptores de tipo Toll, del inglés, <i>Toll-Like Receptor</i>
TNF _α	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
wt	Silvestre, del inglés, <i>wild type</i>
Ym1	Proteína codificada por el gen Chi3l3

Resumen

Los nitroalquenos derivados de la nitración de ácidos grasos insaturados de cadena larga (NO₂-FA) son mediadores lipídicos que se producen endógenamente en contextos inflamatorios con capacidad para activar respuestas anti-oxidantes y anti-inflamatorias. Han sido postulados como agonistas parciales del receptor nuclear *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPAR γ), que se expresa principalmente en adipocitos pero también en células mieloides. En esta tesis, exploramos los eventos moleculares asociados a la activación de PPAR γ por los NO₂-FA en monocitos y macrófagos. En estadios tempranos de la diferenciación de monocitos a macrófagos humanos los NO₂-FA indujeron la expresión de dos genes reporteros de PPAR γ , la proteína de unión a ácidos grasos FABP4 y el receptor barrendero CD36. Estas respuestas dependieron de PPAR γ ya que fueron inhibidas por el antagonista irreversible de este receptor, GW9662. Por otra parte, una vez que las células se diferenciaron a macrófagos, los efectos de los NO₂-FA sobre la activación de PPAR γ fueron menores, sugiriendo que la competencia con ligandos endógenos podría ser determinante en el macrófago. Debido al aumento de la expresión de FABP4 inducido por NO₂-FA, y a la función de esta familia de proteínas en el transporte de lípidos en la célula, se estudió si la FABP4 puede unir los NO₂-FA *in vitro*. Demostramos que esta unión es posible y que otros miembros de la familia, incluyendo FABP1 y FABP2, también comparten esta propiedad. A su vez, resultados en monocitos indicaron que el bloqueo de la capacidad de unión de la FABP4 disminuyó la activación de varias vías de señalización utilizadas por los NO₂-FA, incluyendo PPAR γ , Keap1/Nrf2 y HSPs/HSF1, indicando que la FABP4 cumple un papel en la actividad señalizadora de estos nitroalquenos.

En segundo lugar, nos interesó profundizar en los efectos moduladores de los NO₂-FA sobre la respuesta de los monocitos enfrentados a estímulos de tipo clásico como el LPS y alternativo como la IL4, explorando el rol de la FABP4 en estas respuestas mediante el uso de inhibidores específicos. Para este fin trabajamos en un modelo de macrófagos derivados de progenitores de médula ósea de ratón, donde las respuestas a estos estímulos están ampliamente descritas. Comprobamos que el condicionamiento de estos progenitores con NO₂-FA durante su diferenciación a macrófagos modificó el fenotipo de las células, disminuyendo la expresión de MHCII y CD86, y aumentando la expresión de CD36 y de FABP4, ésta última mediante la activación de PPAR γ . Al enfrentar las células condicionadas al LPS, se observó que el tratamiento con los NO₂-FA, previno el aumento de la expresión de genes inflamatorios como ser *Il6* y *Nos2*, pero este efecto fue independiente de la actividad de la FABP4. Por otro lado, el condicionamiento con NO₂-FA potenció la respuesta de las células a la IL4, aumentando la expresión de *Arg1*, un marcador de diferenciación alternativa de macrófagos. En este caso el bloqueo de la FABP4 afectó de manera significativa la potenciación de la *Arg1* mediada por los NO₂-FA, indicando que la FABP4 y posiblemente PPAR γ están involucrados en este efecto. Finalmente, comenzamos a evaluar diferentes modelos *in vivo* para investigar si esta acción potenciadora de los NO₂-FA sobre el fenotipo alternativo de los macrófagos tiene un correlato *in vivo*. Si bien no fue posible concluir acerca de esta interrogante, el trabajo representa un avance para enfrentar este desafío en el futuro.

En conjunto, los resultados muestran que en monocitos y macrófagos los NO₂-FA son capaces de activar PPAR γ e inducir un aumento en los niveles de FABP4, la cual probablemente participa en

la entrada y el transporte posterior de los NO₂-FA en la célula. A través de estas acciones la FABP4 regula la activación de varias vías de señalización activadas por los NO₂-FA, incluyendo a Keap1/Nrf2, HSPs/HSF1 y NF-κB, así como también a su propio regulador PPARγ. Por otra parte, los NO₂-FA se comportan como potenciales moduladores de los perfiles de diferenciación del macrófago, ejerciendo efectos anti-inflamatorios sobre la activación de tipo clásica y potenciando la activación alternativa inducida por IL4. De esta manera, PPARγ y la FABP4 constituyen un eje que regula la señalización y, en consecuencia, los efectos moduladores de los NO₂-FA en monocitos y macrófagos.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Los Nitroalquenos como mediadores lipídicos generados en condiciones fisiológicas

Esta tesis está centrada en el estudio de las propiedades biológicas de derivados de la nitración de ácidos grasos insaturados de cadena larga ($\text{NO}_2\text{-FA}$), a los que llamaremos nitroalquenos. Estas moléculas se forman endógenamente en condiciones fisiológicas de inflamación, como consecuencia de la nitración de lípidos estructurales por parte de especies activas derivadas del nitrógeno (EAN). La abundancia de los ácidos grasos (FA) precursores así como la presencia de insaturaciones en su estructura, los transforma en un blanco atractivo para la adición homolítica al doble enlace de EAN. Es así que en condiciones inflamatorias el aumento de EAN combinado con la disponibilidad de FA favorece la formación de $\text{NO}_2\text{-FAs}$ (Figura 1.1). Concomitantemente, suceden alteraciones en la actividad de las lipasas que inducen la liberación de los FA desde los lípidos de membrana. De esta manera los FA quedan accesibles para sufrir reacciones de nitración o, en caso de que la nitración ya se hubiera efectuado, se liberan para ejercer su actividad señalizadora. Se han descrito varios mecanismos de generación de agentes nitrantes que generalmente confluyen en la formación del radical dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) como especie nitrante. Entre ellas se encuentra:

- 1) La oxidación del óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), favorecida por su capacidad de difundir y acumularse en compartimentos hidrofóbicos como el espacio intermembrana mitocondrial o las bicapas lipídicas, donde también se acumula el O_2 ¹. Esta co-existencia aumenta dramáticamente la oxidación del $\cdot\text{NO}$, originando entre otras especies al $\cdot\text{NO}_2$ ².
- 2) La formación de peroxinitrito (ONOO^-) como consecuencia de la reacción de $\cdot\text{NO}$ con superóxido (O_2^-), la cual puede originar la especie protonada ONOOH o carbonatada ONOOCO_2^- , que en un contexto inflamatorio producen moléculas con capacidades nitrantes como ser $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{OH}$ o $\cdot\text{CO}_3^-$ ³.
- 3) La oxidación de nitrito (NO_2^-) a $\cdot\text{NO}_2$ mediada por enzimas como peroxidases, microperoxidases, hemoproteínas y metales de transición⁴⁻⁶.
- 4) La protonación de NO_2^- , principal metabolito de $\cdot\text{NO}$, que origina ácido nitroso (HNO_2) y su posterior decaimiento en medio acuoso produciendo especies nitrantes y nitrosantes⁷.

Las condiciones necesarias para la formación de esta familia de nitroalquenos, tales como la baja tensión de oxígeno, la formación de radicales y el pH ácido, son características de contextos inflamatorios o de estrés metabólico y pueden encontrarse en sitios como el espacio intermembrana de la mitocondria, ambientes ácidos como el tracto digestivo o el entorno de macrófagos o neutrófilos activados⁸. De todos modos, el primer registro de la presencia de estos compuestos fue en un homogeneizado de lípidos proveniente de los músculos papilares bovinos en condiciones normales, en el que se halló al nitrohidroxiaquidónico⁹. Posteriormente se detectaron nitroalquenos provenientes de la mayoría de los ácidos grasos y sus correspondientes derivados nitrohidroxilados en plasma y orina de pacientes normales¹⁰⁻¹², pero se cuantificaron únicamente el ácido nitrolinoleico ($\text{NO}_2\text{-LA}$) y el nitrooleico ($\text{NO}_2\text{-OA}$) por disponer de estándares sintetizados *in vitro* solo para dichas especies. La concentración reportada por Baker y colaboradores del $\text{NO}_2\text{-LA}$ no esterificado en plasma rondó los 79 nM y en la membrana de los eritrocitos fue de 50 nM, mientras que el $\text{NO}_2\text{-OA}$ mostró valores de 619 y 59 nM respectivamente^{10,11}. Sin embargo, años después, el mismo grupo de investigación constató que no era posible detectar tales niveles de $\text{NO}_2\text{-FA}$ libres en muestras de plasma normal. En efecto, en contraposición

a lo descrito inicialmente, varios experimentos mostraron que una vez ingresados al torrente sanguíneo, los nitroalquenos reaccionan rápidamente formando aductos reversibles con tioles presentes en proteínas^{13,14}. Además, los NO₂-FA pueden ser rápidamente metabolizados por β-oxidación o saturación del doble enlace, y por lo cual es muy probable que los datos obtenidos por Baker hayan sido producto de artefactos en la metodología de medición⁸.

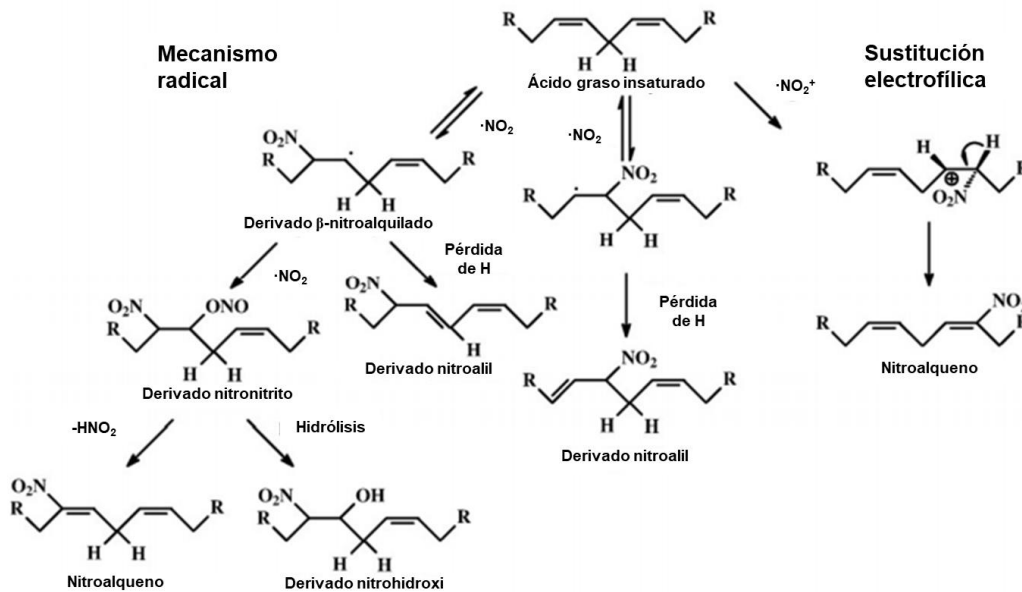


Figura 1.1: Mecanismos de formación de los nitroalquenos

El dióxido de nitrógeno puede mediar la oxidación y nitración de ácidos grasos bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas: el $\cdot\text{NO}_2$ reacciona con ácidos grasos insaturados mediante un mecanismo radical produciendo un radical β -nitroalquilado que en condiciones de baja tensión de oxígeno, se combina con otra molécula de $\cdot\text{NO}_2$ para formar intermediarios nitro/nitrito. Los nitroalquenos o los derivados nitrohidroxi pueden formarse a través de la pérdida de HNO_2 o la hidrólisis, respectivamente. Además la sustitución electrofílica al doble enlace, por el NO_2^+ produce nitroalquenos. Imagen adaptada de Trostchansky y Rubbo 2008¹⁵.

De todos modos, surgieron reportes posteriores que detectaron la presencia del NO₂-OA en plasma de pacientes normales, en un rango de concentraciones cercano a 1 nM¹⁶, valores 600 veces menores que aquellos reportados inicialmente. Por otro lado, surgieron evidencias de la generación de NO₂-FA en condiciones de inflamación o estrés oxidativo. El NO₂-LA fue detectado en el plasma de pacientes hiperlipidémicos¹², y en extractos lipídicos de mitocondria provenientes de corazones de rata sometidos a pre-condicionamiento isquémico. En este último estudio la concentración de NO₂-LA, basada en un estándar interno, rondó los 619 fmol/mg de proteína mitocondrial¹⁷. Estudios similares detectaron al NO₂-OA y al NO₂-LA a una concentración de 9.5 nM y 17.3 nM, respectivamente, en el miocardio de ratones sometidos a isquemia-reperfusión¹⁸. A su vez, otros estudios que utilizaron el cultivo macrófagos (J774.1) demostraron un aumento de la nitración del colesterol-linoleato (CLN) después de la activación de las células por 24 horas con LPS e Interferón- γ ¹⁹. Más recientemente se detectó y cuantificó por primera vez en pacientes normales, el derivado nitrado del ácido linoleico conjugado (NO₂-CLA) a una concentración de 0.72 nM en plasma²⁰ y posteriormente se lo cuantificó en orina, alcanzando una concentración de 9.97 ± 3.98 pmol/mg de creatinina²¹. Al igual que para los otros NO₂-FA, se comprobó la formación del NO₂-CLA bajo condiciones inflamatorias, que a su vez resultó darse de manera preferencial a la formación de derivados nitrados del OA o LA en ensayos *in vitro*. Parece ser que el posicionamiento

de los dobles enlaces en el C9 y C11 del CLA, permiten la estabilización por resonancia del radical producido luego de la adición del $\cdot\text{NO}_2$, lo que favorece su nitración frente a la del OA o LA ²². Es así, que macrófagos RAW264.7 activados con LPS/IFN- γ fueron capaces de generar preferentemente NO_2 -CLA en presencia de CLA, OA y LA ^{23,24}. Del mismo modo, mitocondrias de hígado de rata incubadas con NO_2^- en condiciones de pH simulando la condición de ischemia, generaron NO_2 -CLA ²³.

Por otra parte, al evaluar la formación de los NO_2 -FA *in vivo*, se comprobó que la inyección intraperitoneal de un estímulo inflamatorio como el zymosán con la posterior administración de CLA en la cavidad, generó niveles detectables de NO_2 -CLA (21 nM) en los lavados peritoneales ²⁴. Además, mediante la administración orogástrica de CLA y NO_2^- en ratas, se comprobó la nitración *in vivo* del CLA, que fue posteriormente detectado en varios tejidos como ser plasma, orina, estómago, intestino, colon, hígado y riñón ²³. Del mismo modo, ensayos en humanos mostraron que el consumo de NO_3^- y NO_2^- en presencia o ausencia de CLA generó niveles detectables de NO_2 -CLA en plasma y orina de pacientes normales ²⁵. En conjunto, existe un cuerpo de evidencias que indicaría que los NO_2 -FA pueden formarse fisiológicamente en condiciones de homeostasis y aumentar sus concentraciones durante procesos inflamatorios, siendo el CLA el blanco preferencial de nitración. Las concentraciones alcanzadas por los NO_2 -FA están mejor establecidas gracias a la mejora en la sensibilidad de los métodos de cuantificación y al cambio en la estrategia de obtención de las muestras, por ejemplo el uso de β -mercaptoetanol para detectar los NO_2 -FA aductados a proteínas ²⁶. De todos modos, es difícil asegurar que las concentraciones reportadas reflejan la totalidad de los NO_2 -FA presentes en determinado tejido, ya que la esterificación de los mismos en lípidos complejos representa un desafío para la cuantificación. Considerando estas salvedades, se podría estimar que en condiciones normales, el plasma presenta una concentración del orden nM, con algunos reportes sugiriendo que alcanzan concentraciones bajas del orden μM .

1.2 Los NO_2 -FA como moléculas moduladoras de la inflamación

En paralelo con su detección en sistemas biológicos, se reportaron varios efectos relacionados con el control de la inflamación por los NO_2 -FA, en una variedad de tejidos y/o cultivos celulares, que incentivaron continuar con el estudio de los mecanismos disparados por los NO_2 -FA en el interior celular. Algunos de los efectos reportados se listan a continuación:

- 1) modulación de la expresión de adhesinas (por ej. VCAM-1) en células endoteliales y leucocitos, lo que disminuye la extravasación de leucocitos al tejido donde se desencadena el proceso inflamatorio ^{13,18}.
- 2) cambios en los perfiles de citoquinas y quimioquinas (i.e. inhibición de la secreción de IL1, IL6, TNF α y MCP1) que limitan la permeabilidad del endotelio y la quimiotaxis celular que dirige a los leucocitos al sitio inflamatorio ^{13,19}.
- 3) inhibición de la producción de especies reactivas del O y N, que participan en los mecanismos efectores asociados a la fagocitosis de las células inflamatorias. Este efecto incluye la inhibición de la degranulación y la producción de superóxido en neutrófilos por un mecanismo independiente de la formación de cGMP ²⁷, y la inhibición en macrófagos murinos de la síntesis de la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) ^{19,28} y de la NADPH oxidasa ²⁹.

- 4) la inducción de la expresión de proteínas que controlan procesos redox e inflamatorios como ser la totalidad de las proteínas de fase II. Varios NO₂-FA provocaron un aumento en la expresión de la proteína de fase II, hemoxigenasa 1^{30,31,32}.
- 5) capacidad para contrarrestar la activación de las plaquetas²⁷, estudiada evaluando la capacidad para inhibir la agregación plaquetaria inducida por trombina *in vitro*.

Además de los efectos anti-inflamatorios descritos anteriormente, algunos nitroalquenos han mostrado otro tipo de propiedades biológicas que pueden ser relevantes en situaciones inflamatorias, si bien no son directamente anti-inflamatorias. El NO₂-LA, el ácido nitro araquidónico (NO₂-AA) y su derivado 6-metil nitroaraquidonato son capaces de inducir la relajación de anillos de aorta de rata precontraídos, mediante la activación de la guanilatociclasa soluble (sGC)^{27,28,33}; esta activación genera cGMP que actúa como segundo mensajero, el cual termina activando protein quinasas que inducen la relajación de la pared vascular.

1.3 Propiedades químicas de los NO₂-FA

El análisis de los efectos reportados por varios NO₂-FA, pone en evidencia que poseen propiedades químicas únicas, las cuales explican varias de sus acciones señalizadoras. La distribución relativa de los NO₂-FA entre el medio hidrofóbico y el medio acuoso se encuentra íntimamente relacionada con estos efectos. En primer lugar los NO₂-FA se definieron como electrófilos suaves, debido a que la presencia del grupo nitro le confiere electrofilicidad al carbono β adyacente, favoreciendo reacciones de adición de Michael con moléculas nucleofílicas (ver Figura 1.2). Esta reactividad en medio acuoso y pH fisiológico promueve la reacción con moléculas de agua, que trae como consecuencia el establecimiento de un equilibrio entre la especie nitrada y el derivado nitrohidroxilado^{11,34,35,36}.

Además del agua, los principales nucleófilos capaces de reaccionar con los NO₂-FA en un medio biológico, son los residuos de His y Cys en proteínas, conduciendo a la formación de aductos NO₂-FA-proteína^{14,37}. La modificación post traduccional de proteínas por especies oxidantes siempre se consideró como un marcador de toxicidad³⁸. Sin embargo puede interpretarse como un mecanismo que a través de la modificación de factores de transcripción, canales iónicos o proteínas celulares transduce una señal. De hecho, la adición de nitroalquenos a proteínas es un fenómeno reversible, y por lo tanto cobra relevancia biológica como mecanismo de señalización¹⁴.

Otra propiedad de los NO₂-FA es su decaimiento en medio acuoso, por el cual liberan pequeñas cantidades de ·NO. Los primeros reportes indicaban una producción realmente baja de ·NO a la que se le asociaron actividades señalizadoras a través de mecanismos dependientes de cGMP^{35,36}. Actualmente resultados obtenidos en modelos *in vivo* ponen en duda la relevancia fisiológica de estas pequeñas cantidades de ·NO³⁹. De todos modos los NO₂-FA son capaces de inducir la eNOS y al mismo tiempo fomentar la activación de mecanismos antioxidantes que protejan al ·NO de su inactivación oxidativa, permitiendo que se generen especies derivadas del ·NO con actividades señalizadoras^{34,36,40,41}.

Finalmente, otra de las propiedades químicas de los NO₂-FA es la esterificación en lípidos complejos como los que forman parte de las bicapas lipídicas donde logran estabilizarse. También se los encontró en el interior de lipoproteínas o gotas lipídicas^{35,37}. En estos entornos hidrofóbicos, los NO₂-FA no sufren el decaimiento en medio acuoso y por otro lado están protegidos de la

reacción con tioles. De este modo solo por la acción de enzimas como lipasas o esterases son movilizados para poder ejercer sus efectos.

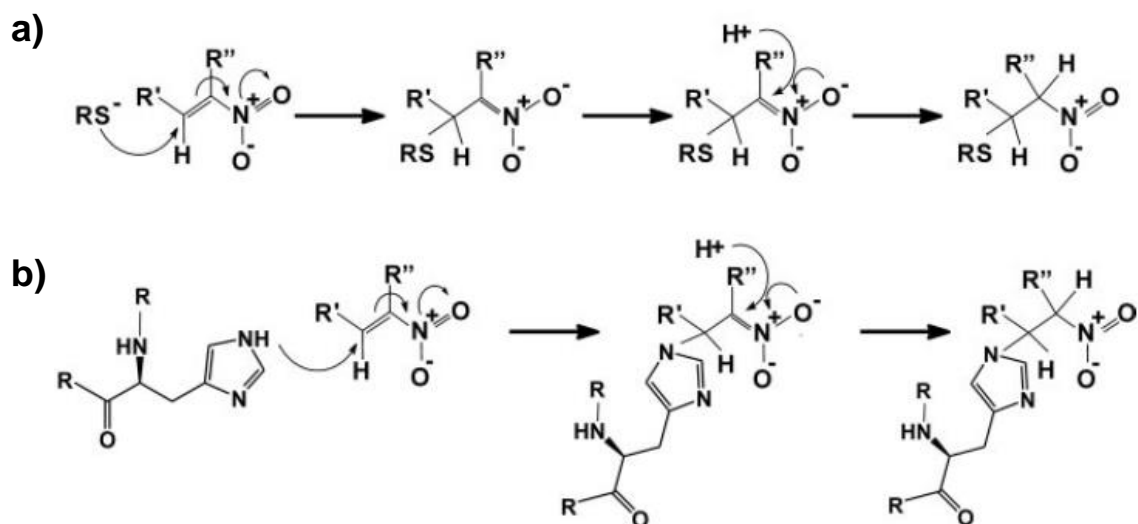


Figura 1.2: Esquema de la reacción de adición de Michael

Reacción de adición de Michael de los NO₂-FA a tioles (a) o a grupos amino (b). Imagen adaptada de Batthyany y colaboradores 2006 ¹⁴.

1.4 Acciones señalizadoras de los nitroalquenos

Existe un cuerpo importante de evidencias que indican que los NO₂-FA modulan funciones celulares asociadas a las respuestas metabólicas e inflamatorias. A nivel molecular, estas actividades están relacionadas con las propiedades químicas mencionadas en el punto anterior y se explican principalmente por 1) la capacidad de los NO₂-FAs de aductarse a factores de transcripción y 2) la condición de ser ligandos activadores del receptor PPAR γ .

Por un lado, la nitroalquilación proteica puede alterar la estructura, la distribución celular y/o la función de la proteína blanco ¹⁴. Muchas de las funciones anti-inflamatorias de los NO₂-FA se han correlacionado con la nitroalquilación de varios factores de transcripción centrales a la regulación de la inflamación y a la respuesta de estrés como ser NF- κ B, Keap1 y HSF1 ^{13,19,30,42}. Por otra parte, la capacidad de los NO₂-FA de unirse y activar a varios miembros de la familia de receptores nucleares conocida como PPAR (del inglés, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), les confiere el potencial para modular el metabolismo lipídico y de la glucosa, así como también regular la respuesta inflamatoria ⁴³⁻⁴⁵.

1.4.1 Inhibición de NF- κ B

NF- κ B es un factor de transcripción de la familia de proteínas Rel, que puede actuar como un hetero u homodímero de cinco subunidades (p50, p52, p65, p100 y p105). El dímero formado por p50 y p65 es la forma mayoritaria y presenta actividades relacionadas con la inflamación, ya que activa la expresión de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios (como ser IL1, IL6, IL8, TNF α , MCP1 y NOS2), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) e inhibidores de la apoptosis ⁴⁶. En condiciones normales NF- κ B se encuentra en el citoplasma asociado a su inhibidor la proteína I κ B, que se une ocultando la señal de localización nuclear en NF- κ B y permite la retención del mismo en el citoplasma. En respuesta a diferentes estímulos inflamatorios I κ B es

fosforilada por la IκB quinasa (IKK), lo cual la marca para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma, permitiendo la translocación al núcleo de NF-κB y posterior activación de los genes mencionados anteriormente ⁴⁷ (ver Figura 1.3). El hecho de que NF-κB se encuentre preformado pero inactivo en el citoplasma representa una ventaja, ya que permite que las células puedan responder rápidamente a patógenos o estímulos inflamatorios.

Así, la interferencia de los NO₂-FA en la activación de NF-κB constituye un mecanismo anti-inflamatorio. Se ha comprobado en experimentos *in vitro* y en cultivos celulares que varios NO₂-FA son capaces de inhibir la secreción de citoquinas y quimioquinas (MCP1, IL1, IL6 y TNFα) por monocitos y macrófagos activados, y la inducción de la NOS2 por macrófagos activados con LPS ^{13,19,48}. Ambas acciones serían mediadas por mecanismos que involucrarían la inhibición de la activación de NF-κB ¹⁹. Existen evidencias de la formación de aductos NO₂-FA-NF-κB, y se ha propuesto que modificaciones post-traduccionales derivadas de la nitroalquilación de residuos claves en las subunidades p65 y en menor medida p50, comprometen la activación del factor. Más específicamente se ha propuesto la nitroalquilación de Cys involucradas en la unión al ADN de estas subunidades, que son críticas para la actividad de las mismas ¹³. Otro mecanismo de inhibición de NF-κB sería la interrupción de los eventos corriente arriba de su propia activación. En particular se comprobó que el NO₂-OA evita la localización de TLR4 en balsas lipídicas interfiriendo con el posterior reclutamiento de TRAF6 e IKK, ambas necesarias para el inicio de la cascada de fosforilación inducida por LPS que desencadena la activación de NF-κB. La interrupción de estas estructuras evita la fosforilación de IKK y de IκB, lo que trae como resultado el secuestro de NF-κB en el citoplasma y la supresión de la respuesta inflamatoria ⁴⁸.

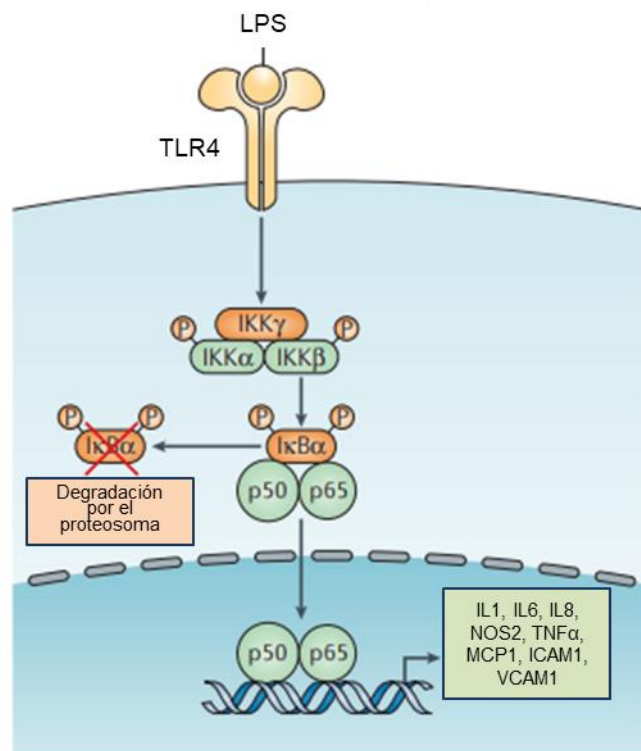


Figura 1.3: Esquema de la activación de NF-κB por ligandos de TLR

El reconocimiento de patrones asociados a patógenos como el LPS por los receptores de tipo Toll (TLR), desencadena una cascada de señalización que culmina con la activación de NF-κB. Este factor se encuentra secuestrado por su inhibidor en el citoplasma (IκB), que frente a ciertos estímulos es fosforilado por la IκB quinasa (IKK), la cual induce su degradación por el proteosoma, permitiendo la liberación y translocación de

Nf-κB al núcleo, y el inicio de la transcripción de genes inflamatorios. Imagen adaptada de Taniguchi y colaboradores 2018 ⁴⁹.

1.4.2 Activación de Nrf2

El factor de transcripción Nrf2 (del inglés *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*) reconoce en el ADN un elemento de respuesta a antioxidantes (ARE), que es un potenciador en *cis* de la expresión de una batería de genes antioxidantes, anti-inflamatorios y codificantes para proteínas de fase II con funciones citoprotectoras detoxificantes, como ser hemoxigenasa 1 (HMOX1), ferritina y glutatión peroxidasa, entre otras. Además, regula la expresión de enzimas metabólicas y de componentes de la vía de degradación por el proteosoma, proporcionando una protección contra el estrés oxidativo (revisado por ^{50,51}). La actividad de Nrf2 está controlada por la proteína Keap1 (del inglés *Kelch-like ECH-associating protein 1*), si bien se desconoce con exactitud el mecanismo subyacente, la hipótesis más aceptada implica que Keap1 actúa como un adaptador entre el complejo ubiquitin ligasa E3 y Nrf2, de modo que en condiciones normales se une a Nrf2 y promueve su continua ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S, manteniendo un nivel basal bajo de Nrf2. De esta manera Keap1 reprime la expresión de los genes controlados por Nrf2 ⁵². En cambio, la señalización a través de moléculas oxidantes o electrófilas, modifican residuos claves de Cys en Keap1 que inducen un cambio conformacional alterando la actividad ubiquitin ligasa y la unión con Nrf2. De este modo, Nrf2 se disocia de Keap1, se transloca al núcleo e inicia la expresión de genes capaces de controlar el estrés oxidativo y prevenir posibles daños celulares ⁵³ (Figura 1.4).

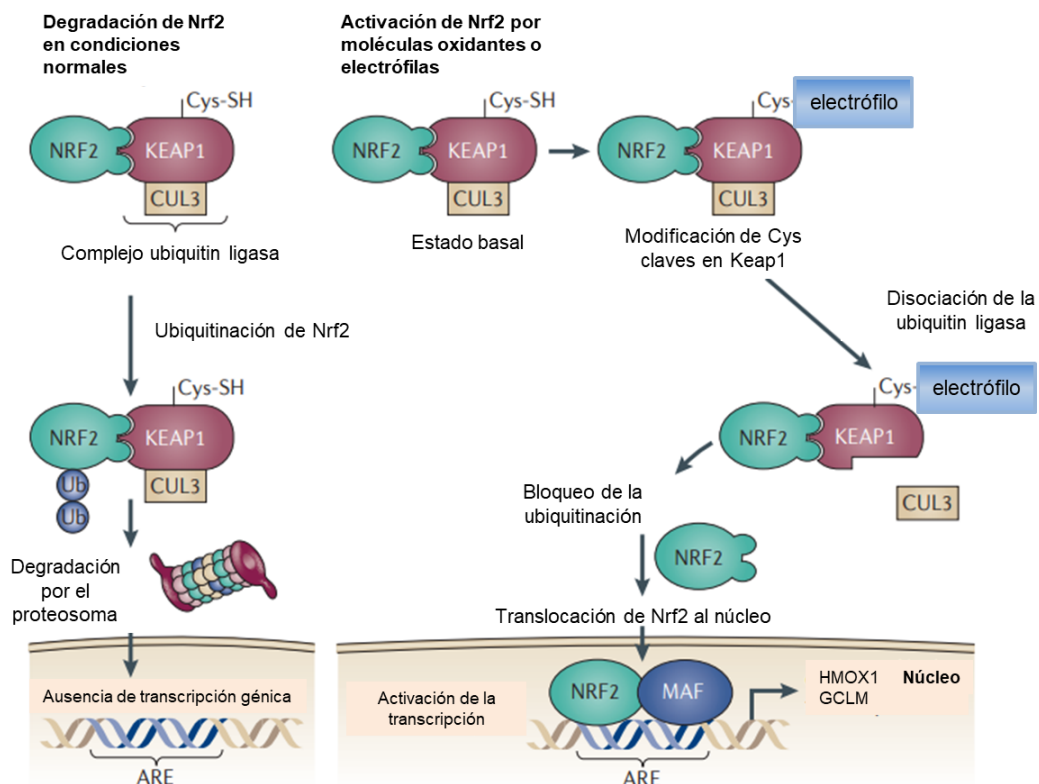


Figura 1.4: Esquema representativo de la vía Keap1/Nrf2

En ausencia de señales derivadas de estrés oxidativo, Keap1 actúa como adaptador de la ubiquitin ligasa E3 promoviendo la degradación de Nrf2. En presencia de señales activadoras como la modificación de residuos claves de Cys en Keap1, se produce un cambio conformacional que altera la unión con la ubiquitin ligasa, permitiendo así la liberación de Nrf2 y translocación al núcleo. Nrf2 promoverá la transcripción de

genes que respondan a elementos de respuesta a anti-oxidantes (ARE). Imagen adaptada de Sporn y colaboradores 2012 ⁵⁴.

Como se mencionó anteriormente uno de los genes activados por Nrf2 es la *HMOX1*, la cual participa en respuestas protectoras frente a enfermedades inflamatorias como aterosclerosis, fallas renales agudas, restenosis vascular, rechazo a trasplantes y sepsia (revisado por ⁵⁵). La *HMOX1* degrada al grupo hemo en biliverdina, CO y Fe. Si bien todos estos productos colaboran en las respuestas protectoras frente a la oxidación, el CO sería el mediador generado de mayor potencial anti-inflamatorio. Otra proteína inducida por Nrf2 es la glutamato cistein ligasa, en sus dos isoformas *GCLC* y *GCLM*. Estas enzimas catalizan el paso limitante de la síntesis de glutatión (GSH), que es uno de los antioxidantes más importantes en la protección contra especies reactivas presentes en el interior celular ⁵⁶.

Nrf2 está altamente expresado en monocitos y neutrófilos, sugiriendo un papel importante en la resolución de la inflamación mediada por estas células. En este sentido, se observó que animales deficientes en Nrf2 son hipersensibles al choque séptico ⁵⁷ y manifiestan una inflamación persistente durante los procesos de cicatrización ^{58,59}. Contrariamente, la activación de Nrf2 se correlaciona con una disminución en la producción de citoquinas inflamatorias ⁶⁰. Estos efectos pueden explicarse por varios mecanismos. En primer lugar, los procesos inflamatorios están asociados a un aumento en las especies reactivas del oxígeno (ROS), que a su vez generan un círculo vicioso de daño celular con generación de más ROS. La activación de Nrf2 induce la expresión de componentes claves en el control del daño oxidativo como NADPH, GSH y varias redoxinas, que logran cortar con el círculo de daño oxidativo ⁶¹. Más aún, existen evidencias que plantean un control mutuo entre NF- κ B y Nrf2. Por ejemplo, animales deficientes en Nrf2 tienen una activación exacerbada de NF- κ B en respuesta al LPS, lo que sugiere cierta inhibición de la respuesta inflamatoria por parte de Nrf2. Este evento se ha relacionado con un aumento en la fosforilación de I κ B en ausencia de Nrf2 lo que desencadena una mayor activación de NF- κ B ⁵⁷. También puede explicarse porque el LPS desencadena una activación temprana de NF- κ B y posteriormente activa a Nrf2 que auspicia como regulador del primero, de modo que este control estaría ausente en animales deficientes de Nrf2 ⁵¹. Finalmente hay evidencias que apoyan una supresión de NF- κ B mediada por Nrf2, a través de la competencia entre Nrf2 y p65 por un co-activador transcripcional llamado p300, necesario para la actividad transcripcional de ambas vías ⁶². De manera equivalente, se postuló la inhibición de NF- κ B a través de la degradación de la subunidad β de IKK por Keap1 ^{63,64}.

En cuanto a la activación de Nrf2 por los NO₂-FA, resultados en células musculares de la pared vascular y en células endoteliales mostraron que el tratamiento con NO₂-LA fue capaz de interferir con la inhibición mediada por Keap1 permitiendo la translocación al núcleo de Nrf2 ³¹, y la activación de la expresión *HMOX1* respectivamente ³⁰. Por su parte, resultados en astrocitos mostraron que el NO₂-AA y el NO₂-OA lograron inducir la translocación al núcleo de Nrf2 y aumentar la expresión de varios reporteros de la vía como ser la *HMOX1* y *GCLM*, entre otros ⁶⁵. Por otro lado, la activación de *HMOX1* también se observó en macrófagos J774.1 tratados con CLN, que paralelamente mostraron una disminución de la síntesis de NOS2, probablemente como consecuencia de una disminución en la activación o translocación de NF- κ B mediada por el CO ¹⁹. Si bien se sabe que existe una interacción de los NO₂-FA con Keap1 y se propone que el mecanismo subyacente implica la nitroalquilación de dicho factor, todavía no hay resultados directos que comprueben esta teoría. De todos modos se puede postular que la generación endógena de NO₂-FA en un contexto inflamatorio podría liberar a Nrf2 de Keap1 permitiendo la

activación de genes que protegerán los tejidos del daño oxidativo. Además, la liberación de Nrf2 podría modular el potencial inflamatorio de los macrófagos a través de la inhibición de la respuesta de NF- κ B.

1.4.3 Activación de HSF1

La respuesta al choque térmico (HSR, por sus siglas en inglés *Heat Shock Response*), involucra un conjunto de respuestas que se dan como consecuencia del estrés oxidativo y fisiológico, relacionado con cambios en la temperatura, pH y concentración del calcio intracelular. Esta respuesta es mediada por la familia de factores de choque térmico (HSF) que se compone de seis factores de transcripción dentro de los cuales HSF1 es el más relevante (revisado por 2018 ⁶⁶). En condiciones basales, HSF1 se encuentra en el citoplasma unido a su complejo inhibidor formado por las proteínas chaperonas HSP40, 70 y 90 ^{67,68}. A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo de activación de HSF1, se cree que está relacionado con modificaciones en el complejo inhibidor. Tanto HSP70 como HSP90 presentan Cys nucleofílicas posibles de ser modificadas por adición de electrófilos o lípidos nitrados, lo que provoca la liberación de HSF1 permitiendo la translocación al núcleo de los monómeros ^{69,70}, que una vez dentro se asocian formando un trímero activo, el cual se une a regiones conservadas en el genoma denominadas elementos de choque térmico (HSE), activando la transcripción de genes blanco (ver Figura 1.5). La HSR controla la expresión de cientos de genes, entre los cuales se encuentran proteínas chaperonas, enzimas proteolíticas, enzimas modificadoras del ARN y ADN, enzimas metabólicas, fosfatasa y quinasas.

Experimentos realizados en el análogo de HSP70 en levadura, dejaron en evidencia la importancia de los residuos de Cys, ya que al mutarlos se perdió la activación de HSF1 mediada por electrófilos ⁷¹. Desde un punto de vista simplista el mecanismo de activación-inactivación de HSF1 dependería de la actividad de las chaperonas, ya que bajo condiciones de estrés, HSF1 se libera de ellas para poder oligomerizar y activar a los genes blanco, dentro de los cuales se encuentran las HSP. Como resultado, aumentan los niveles de HSP libres que finalmente promueven la inactivación de HSF1 ⁷² (Figura 1.5).

Además de las funciones clásicas de esta familia de chaperonas, se les han asignado otras propiedades interesantes. Por ejemplo pueden ejercer efectos anti-inflamatorios relacionados a la inhibición de NF- κ B, en donde HSP70 a través de evitar la ubiquitinación de TRAF6, previene la degradación de I κ B aboliendo la translocación de NF- κ B al núcleo ⁷³.

La primera evidencia de que los NO₂-FA activan al HSF1, provino de experimentos en células endoteliales donde se evaluó la expresión génica luego del tratamiento con NO₂-OA mediante microarrays. La vía HSR resultó ser la más inducida, y en particular varios genes controlados por HSF1 aumentaron su expresión significativamente ⁴². El mecanismo de acción de los NO₂-FAs aún no es claro, pero podría explicarse por la nitroalquilación del complejo inhibidor que modifica el plegamiento de las chaperonas o aumenta su hidrofobicidad, favoreciendo la liberación de HSF1 y la activación de la HSR.

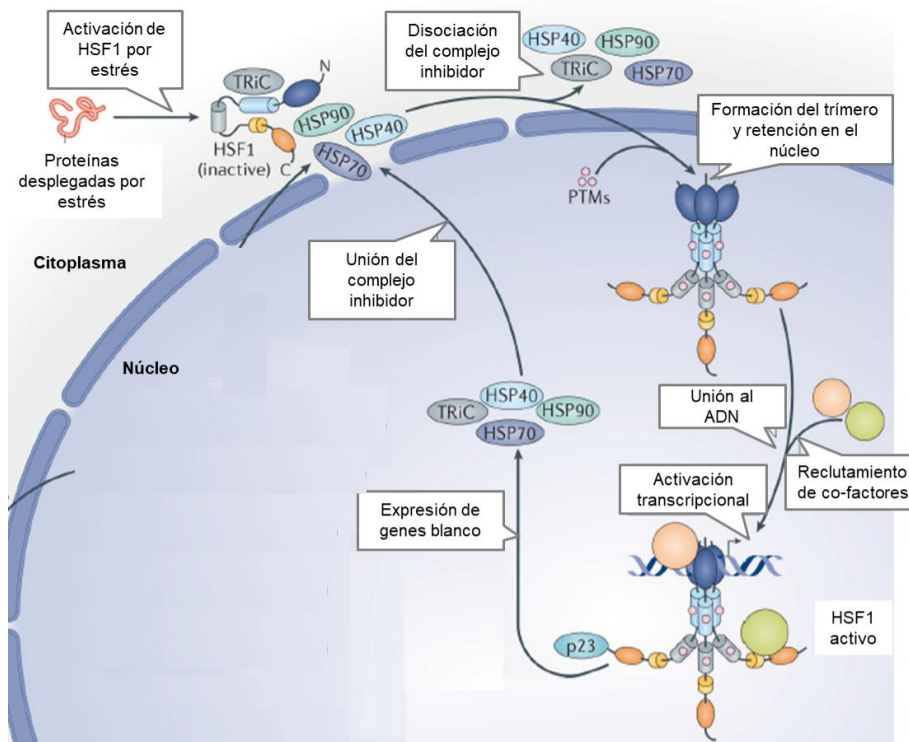


Figura 1.5: Esquema de la vía de HSF1

En condiciones basales HSF1 se encuentra en el citoplasma unido a su complejo inhibidor formado por las proteínas chaperonas HSP40, 70 y 90. Como consecuencia de señales de estrés, el complejo inhibidor sufre modificaciones que liberan a HSF1. Los monómeros de HSF1 se translocan al núcleo y forman un trímero activo que inicia la transcripción de los genes blancos, entre ellos los componentes del complejo inhibidor, promoviendo así el apagado de la vía. Imagen adaptada de Gomez-Pastor y colaboradores 2018 ⁶⁶.

1.4.4 Activación de PPAR γ

PPAR es una familia de receptores nucleares (RN) activados por ligando, que actúan censando lípidos y coordinando la expresión de proteínas encargadas de la regulación del metabolismo lipídico, la inflamación, el crecimiento y la diferenciación celular (revisado por ⁷⁴). Existen tres tipos de receptores PPAR, α , β y γ , codificados por tres genes diferentes, que resultan en proteínas con una alta homología de secuencia y estructura. De hecho en mamíferos incluyendo rata, ratón y humano hay más de un 80 % de similitud en la secuencia aminoacídica. De todos modos, los miembros de la familia presentan diferencias en la distribución tisular, en los ligandos que unen y en las funciones biológicas que controlan.

Los PPARs son proteínas modulares compuestas por 5 regiones nombradas de la A a la F en dirección N- a C- terminal (ver Figura 1.6). En el extremo N- terminal se encuentra el dominio A/B que contiene la región llamada función de activación 1 (AF1), que es responsable de la activación constitutiva independiente de ligando del RN. Continúa el dominio C, el más conservado entre los RN, que contiene al dominio de unión al ADN (DBD). El DBD reconoce motivos conservados en los promotores de los genes regulados por PPAR, formados por seis nucleótidos que reciben el nombre de elemento de respuesta a PPAR (PPRE). A continuación se encuentra una región bisagra denominada D que une el DBD con el dominio E/F. Este último incluye el dominio de unión a ligando (LBD), que contiene el bolsillo donde se acomoda el ligando, la región de transactivación dependiente de ligando (AF2) y una región involucrada en la dimerización del receptor ⁷⁵. El LBD

está menos conservado entre los diferentes tipos de PPAR que el resto de la estructura, lo que responde a diferencias en los ligandos que reconocen y por lo tanto a diferencias a nivel de las funciones fisiológicas de cada PPAR.

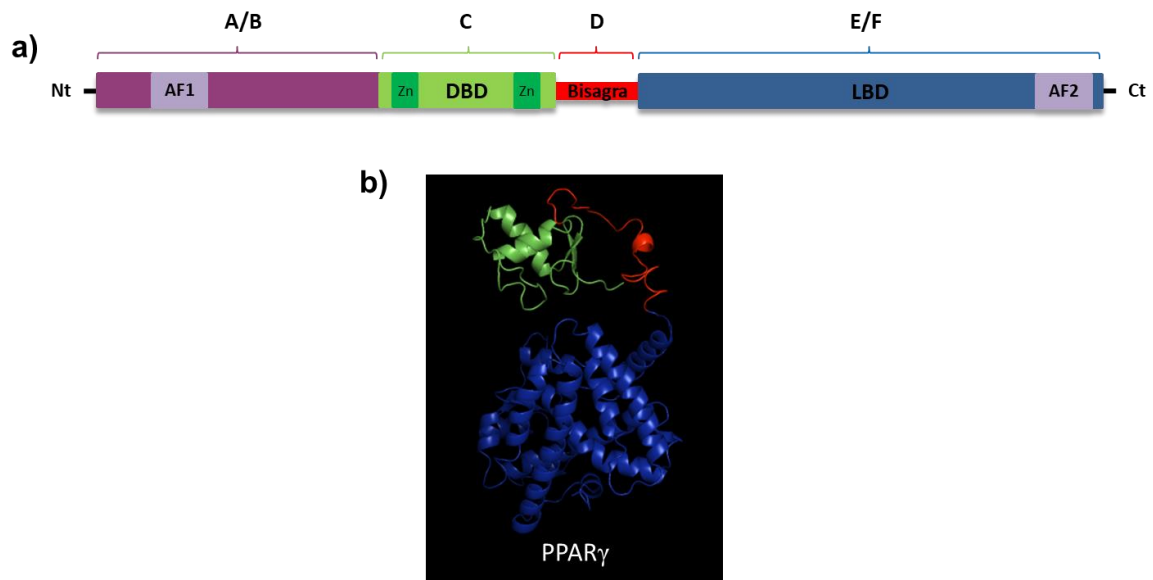


Figura 1.6: Esquema de los dominios de PPAR

(a) Desde el extremo Nt al Ct se disponen los distintos dominios de PPAR. Los dominios A/B contienen a la región función de activación 1 (AF1), a continuación el dominio C contiene el sitio de unión al ADN (DBD) flanqueado por dos motivos tipo dedos de Zinc. Luego se encuentra el dominio D que contiene la región bisagra. Finalmente el dominio E/F donde se ubica el dominio de unión al ligando (LBD) y la región función de activación 2 (AF2). (b) Estructura tridimensional del LBD de PPAR γ tomado del PDB 3e00, las regiones se representan siguiendo el mismo código de colores que en (a). Imagen adaptada de Lamas Bervejillo y Ferreira 2019⁷⁶.

La activación de PPAR es un mecanismo complejo en el que deben intervenir muchas moléculas. En primer lugar, para ser transcripcionalmente activo, PPAR debe formar un hetero dímero con el receptor retinoide X (RXR)⁷⁷. Este evento es necesario pero no suficiente, porque además se precisa de la unión del ligando al LBD, que induce cambios conformacionales en el RN, pudiendo favorecer o impedir la estabilización de su conformación activa. En el caso de la unión de un ligando activador, los cambios inducidos liberan moléculas co-represoras y al mismo tiempo reclutan moléculas co-activadoras que interaccionan con la maquinaria de transcripción^{78,79}, permitiendo su estabilización en el PPRE y posterior inicio de la transcripción del gen blanco (Figura 1.7).

La estructura cristalográfica del LBD de PPAR γ reveló que se encuentra formado por 3 a 4 láminas β y un conjunto de α hélices, numeradas desde H1 a H12 a las que se le suma la H2'⁸⁰. El dominio se pliega de manera tal de originar una cavidad en forma de Y, que presenta en la entrada un bucle flexible compuesto por la H2' y H3, lo que permite acomodar ligandos de gran tamaño sin perturbar el resto de la estructura. Tras la unión de un ligando activador se inducen cambios en la posición de la H12, que se cierra para favorecer la interacción del ligando con el RN. El cambio de posición expone la región AF2 contenida en la H12, la cual es clave en la interacción con los co-activadores⁸⁰. A su vez la H3 de la entrada al LBD se dobla favoreciendo la estabilización de H12 en su nueva posición. Finalmente, el ligando establece enlaces de hidrógeno con residuos claves en la cavidad, que terminan de estabilizar la conformación activa del RN. Se cree que varios antagonistas

de PPAR γ como el GW9662 (antagonista irreversible), actúan a través de imposibilitar el movimiento de la H12 evitando así la interacción con los co-activadores.

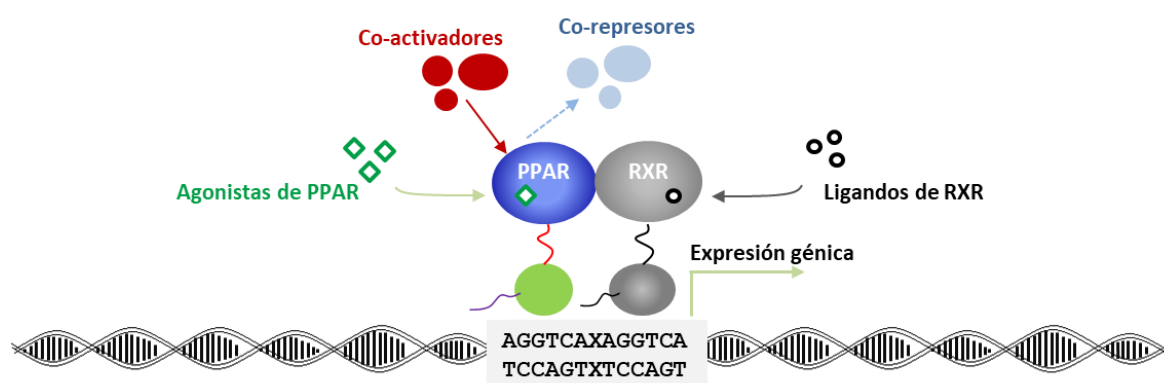


Figura 1.7: Activación de PPAR γ por agonistas

PPAR γ forma un heterodímero con el RXR, y posteriormente la unión de ligandos activadores (agonistas) induce cambios conformacionales que permiten la liberación de co-represores y el reclutamiento de co-activadores que interaccionan con el LBD en la región AF2. El heterodímero entonces se posiciona sobre el PPRE en el promotor del gen blanco para iniciar la transcripción. Imagen adaptada de Lamas Bervejillo y Ferreira 2019 ⁷⁶.

PPAR es capaz de regular el desarrollo, la diferenciación y la bioenergética celular a través de modular el metabolismo lipídico, el metabolismo de la glucosa así como también la respuesta inflamatoria. Su acción pleiotrópica, se debe en gran parte a la capacidad de unir una variedad de ligandos, de interaccionar con múltiples co-activadores y co-represores en distintos tejidos, y a su amplia distribución en el organismo. Se han descrito varios ligandos endógenos de PPAR, entre los que se encuentran los ácidos grasos de cadena larga (saturados, mono insaturados o poli insaturados), algunos NO₂-FA y eicosanoides derivados del metabolismo del ácido araquidónico ^{43,81,82}. En particular para el LBD de PPAR γ se han diferenciado dos clases de ligandos, totales y parciales ^{83,84}. Este concepto está relacionado con la eficacia de activación del RN, que implica la capacidad de un ligando de estabilizar una conformación que induce el reclutamiento de co-activadores de manera de alcanzar la máxima actividad transcripcional. En cambio, los ligandos parciales estabilizan una conformación que recluta un menor número de co-activadores y por lo tanto induce una menor actividad transcripcional. Es así que existen moléculas sintéticas como la familia de las Tiazolidineonas, dentro de las que se encuentra la Rosiglitazona (Rosi), que fueron clasificadas como ligandos totales de PPAR γ . Estos compuestos se usaban como drogas anti-diabéticas, pero debido a sus efectos secundarios como aumento del peso corporal y efectos hepatotóxicos, fueron retiradas del mercado ^{85,86}. La comparación de las estructuras cristalográficas generadas con ligandos totales y parciales, muestra que la hélice H12 adopta posiciones diferentes entre ambos tipos de ligandos, limitando la capacidad de activación transcripcional del RN (ver Figura 1.8). A pesar de los distintos reportes que indican la existencia de ligandos endógenos de PPAR, sigue siendo controversial su capacidad de inducir la activación del receptor en condiciones fisiológicas. Ya que la concentración de los ligandos en el organismo se encuentra en el orden nM, mientras que las afinidades de unión a PPAR rondan el orden μ M, por lo que la comprobación de la activación de PPAR por ligandos endógenos sigue siendo materia de estudio.

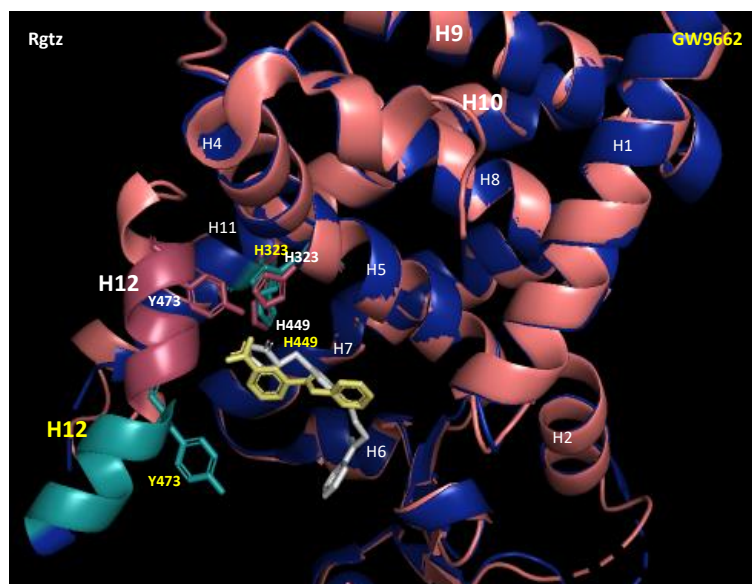


Figura 1.8: Movimiento de la H12 de PPAR γ en presencia de agonistas y antagonistas

Superposición del LBD de PPAR γ unido a Rosi (estructura en rosa, ligando en blanco, PDB 4xld) o a GW9662 (estructura en azul/turquesa, ligando en amarillo, PDB 3b0r). Nótese que los ligandos estabilizan a la H12 en posiciones opuestas, generando diferentes superficies de interacción con co-activadores y co-represores. Imagen adaptada de Lamas Bervejillo y Ferreira 2019 ⁷⁶.

Cabe destacar que la unión a los PPRE y posterior activación de la transcripción no es el único modo de acción de PPAR. De hecho PPAR logra la inhibición de factores de transcripción asociados a las respuestas inflamatorias a través de varios mecanismos que se denominan en su conjunto transrepresión (revisado por ⁸⁷). De este modo PPAR puede unirse a factores de transcripción y ejercer su actividad al secuestrar co-activadores necesarios para la activación o promoviendo la unión de co-represores a los factores de transcripción blanco de modo de interferir con su actividad. También se ha reportado que la sumoylación de residuos claves en el LBD de PPAR, impide la liberación de co-represores y mantiene al RN en su conformación no activa sobre promotores de genes blanco evitando su transcripción ⁸⁸. Muchos de los efectos anti-inflamatorios de PPAR se asocian con alguno de estos eventos de transrepresión.

En este trabajo nos centraremos en el estudio de PPAR γ , ya que dentro de la familia PPAR fue el tipo preferencialmente activado por los NO₂-FAs. En particular, la primer evidencia fue obtenida en ensayos *in vitro* utilizando células CV-1 ^{11,43}. En esa instancia los autores evaluaron la capacidad del NO₂-LA y NO₂-OA de activar PPAR α , β y γ , mediante la co-transfección del LBD de los distintos PPARs fusionados al DBD de Gal4, y el gen de la luciferasa bajo el control de 4 elementos de unión al ADN de Gal4. Demostraron que ambos NO₂-FAs activaron los tres tipos de PPAR, registrándose la mayor activación para PPAR γ , que además fue anulada en presencia de GW9662. Estos resultados se reforzaron cuando al transfectar la secuencia completa de los tres PPARs, junto al gen de la luciferasa bajo el control de un PPRE, obtuvieron los mismos resultados. Por otro lado, reportaron que ambos NO₂-FAs indujeron la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos, las cuales aumentaron la incorporación de glucosa como consecuencia de la diferenciación. Aún más, los NO₂-FA indujeron un aumento en la expresión de PPAR γ , así como de genes reporteros de su activación, FABP4 y CD36. Estos efectos a nivel transcripcional fueron similares a los inducidos por

Rosi, y se inhibieron en presencia de GW9662, indicando una dependencia de la activación de PPAR γ .

Posteriormente, basándose en evidencias provenientes de la estructura cristalina del complejo formado por PPAR γ y NO₂-LA⁸⁹, y en la capacidad del NO₂-OA de reclutar co-activadores y liberar co-represores²⁶, se postuló que ambos nitroalquenos son activadores parciales de dicho receptor, y probablemente el resto de la familia se comporte del mismo modo. Esta hipótesis se apoyó en que los cambios conformacionales inducidos por los NO₂-FAs en los residuos claves del LBD de PPAR γ son diferentes a los generados por Rosi, como un ejemplo de activador total. Del mismo modo, los NO₂-FA indujeron el reclutamiento de menos co-activadores (reclutaron CBP-1 y PGC-1 α , pero no TRAP220) y la liberación de menos co-represores (liberaron SMRTID pero no NCoR2) en comparación con Rosi. Por otro lado, dentro del conjunto de NO₂-FA observaron que existen distintos niveles de activación de PPAR γ . Particularmente la posición del grupo NO₂ afecta el nivel de activación del RN, ya que al comparar distintos isómeros posicionales observaron que la nitración en la posición 12 de ácidos grasos mono o poli insaturados (12-NO₂-LA o 12-NO₂-OA) indujo el mayor grado de activación comparado con la posición 9 o 10^{44,45}. Este efecto se explica por la interacción del grupo NO₂ con residuos claves en el LBD de PPAR γ como Glu343, con el que se establece un enlace de hidrógeno, promoviendo una estabilización extra de la conformación activa de PPAR γ , lo cual no es posible cuando el NO₂ se encuentra en una posición distinta a la 12⁸⁹. Por su parte, otra variable en la estructura de los NO₂-FA como el largo de la cadena hidrocarbonada, no mostró afectar la activación de PPAR γ ⁴⁵. Además de los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas entre PPAR γ y los NO₂-FA, existe la posibilidad de que se establezcan uniones covalentes con Cys y en menor medida con His del LBD²⁶. Ensayos *in vitro* donde se incubó el LBD con NO₂-OA o NO₂-LA, resultaron en la detección de péptidos del LBD conteniendo la Cys285 modificada con el NO₂-FA y posteriormente se verificaron estos hallazgos en ensayos similares utilizando cultivos celulares. Si bien la unión covalente entre NO₂-FA y PPAR γ podría indicar la activación del RN por transnitroalquilación, es necesario continuar en la búsqueda de estos aductos en muestras provenientes de individuos en condiciones fisiológicas tanto de salud como de enfermedad.

Posteriormente surgieron más evidencias que apoyaron la activación de PPAR γ por los NO₂-FA en modelos celulares de inflamación. Reddy y colaboradores, realizaron experimentos en células humanas del epitelio bronquial, estimuladas con TNF α . Estos experimentos mostraron un aumento de la actividad de PPAR γ inducida por el tratamiento con el NO₂-OA, que se asoció a una disminución de la fosforilación de p65, posiblemente debida a una interacción directa entre PPAR γ y p65, provocando la inhibición de la vía de NF- κ B⁹⁰. Otro modelo *in vitro* utilizado para el estudio de la activación de PPAR γ , fue la privación de oxígeno y glucosa con posterior re-oxigenación (OG/R) en células epiteliales de riñón, donde el tratamiento con NO₂-OA protegió a las células de la apoptosis inducida por OG/R. Estos eventos se asociaron a la fosforilación de Akt como consecuencia de la activación de PPAR γ por el NO₂-OA, ya que se observó una disminución de la fosforilación luego del tratamiento con GW9662 así como con siARN específico para PPAR γ ⁹¹. En conjunto, existen varias evidencias que sugieren el potencial de los NO₂-FAs como activadores de PPAR γ en ensayos *in vitro* y en cultivos celulares, de todos modos, si se considera que la expresión de PPAR γ se encuentra restringida a adipocitos, macrófagos y al epitelio intestinal y broncoalveolar, resulta evidente la falta de estudios que profundicen en la activación de PPAR γ en células mieloides relevantes para la respuesta inflamatoria, como los monocitos y macrófagos. Si bien la activación

de PPAR γ por los NO₂-FA parece tener un correlato en modelos *in vivo* de inflamación, no está completamente demostrada (ver más adelante).

1.4.5 Efecto de la administración de nitroalquenos en modelos de inflamación *in vivo*

Con el fin de evaluar si los efectos de los NO₂-FA observados *in vitro* presentaban un correlato en modelos más complejos, se estudió el potencial anti-inflamatorio de los NO₂-FA en una variedad de modelos inflamatorios *in vivo*. Entre ellos se encuentran modelos de patologías cardiovasculares como isquemia/reperfusión^{18,92}, aterosclerosis⁹³ e hiperplasia de la neoíntima⁹⁴. Además, se exploraron los efectos en modelos de hipertensión^{39,95}, daño pulmonar^{96,90}, daño renal⁹⁷⁻⁹⁹, esteatosis hepática^{100,101} y colitis¹⁰², así como también en modelos de diabetes²⁶ y obesidad¹⁰³. Más recientemente se testearon en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica¹⁰⁴ y dermatitis alérgica¹⁰⁵. En muchos casos no fue posible dilucidar con exactitud el mecanismo de acción de los NO₂-FAs en relación a las vías involucradas en los efectos anti-inflamatorios. De todos modos los resultados fueron en general prometedores, y por lo tanto los mecanismos que expliquen los efectos benéficos de los NO₂-FA constituyen un área de activa investigación.

De todos los modelos mencionados anteriormente, solo en unos pocos los efectos beneficiosos de los NO₂-FA se relacionaron con la activación de PPAR γ . Entre ellos está el modelo de colitis, que es un desorden intestinal inflamatorio y recurrente, el cual se había asociado a la desregulación de PPAR γ debido a que la susceptibilidad a padecerla aumentaba en ratones PPAR γ ^{-/+}. La administración del NO₂-OA en un modelo de colitis inducido por Dextran sulfato de sodio, redujo los síntomas característicos de la enfermedad y previno el acortamiento del intestino en comparación con el control (la longitud del intestino se considera un marcador robusto del avance de la enfermedad). Por otro lado, la administración del NO₂-OA logró prevenir las respuestas pro-inflamatorias regulando la activación de NF- κ B en el epitelio del intestino. Concomitantemente se observó una marcada activación de PPAR γ por el tratamiento con el NO₂-OA, sugiriendo que el NO₂-OA a través de la activación de este receptor nuclear podría estar inhibiendo la vía de NF- κ B, y mediando un efecto protector en el desarrollo de la enfermedad¹⁰².

Otros modelos en donde los NO₂-FA podrían haber actuado a través de la activación de PPAR γ son aquellos en donde se encontraba comprometido el endotelio pulmonar como ser la endotoxemia pulmonar, el daño pulmonar agudo y la alergia. En el daño pulmonar agudo inducido por inyección intra traqueal (i.t.) de LPS y posterior administración i.t. de NO₂-OA⁹⁶, se observó una disminución de la permeabilidad capilar, que ocasionó una baja en el número de células reclutadas, en particular de neutrófilos, así como en los niveles de especies reactivas del oxígeno, tanto en el pulmón como en los lavados bronquioalveolares (BAL), indicando un control de la inflamación local por parte del NO₂-OA. Al mismo tiempo se registró una disminución de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en plasma por el tratamiento con el NO₂-OA. En este caso, los autores indagaron en las vías involucradas y encontraron una correlación entre los efectos descritos anteriormente y un aumento de la actividad transcripcional de PPAR γ y Nrf2, a la vez que se observó una disminución de la activación de NF- κ B en el pulmón, debido al tratamiento con el NO₂-OA. En el mismo sentido, macrófagos purificados de los BAL también mostraron un aumento de genes reporteros de la activación de PPAR γ . De manera similar, en el modelo de alergia inducida por OVA,

el NO₂-OA logró reducir todos los marcadores inflamatorios expresados en células provenientes del epitelio respiratorio y de los BAL, que habían sido aumentados luego del desafío con OVA⁹⁰. Además, el NO₂-OA promovió la apoptosis de los neutrófilos reclutados al pulmón y la consecuente fagocitosis por los macrófagos pulmonares, los cuales mostraron un aumento en la expresión de CD36 a causa del tratamiento con NO₂-OA. Si bien el mecanismo de acción del NO₂-OA en estos dos modelos no fue completamente dilucidado, se cree que podría estar relacionado con la activación de PPAR γ . Esta teoría se basa principalmente en la evidencia directa que obtuvieron los autores sobre el aumento de los genes reporteros de PPAR γ tras el tratamiento con NO₂-OA, sumado a que la deficiencia de PPAR γ en células del endotelio, mostró una respuesta inflamatoria exacerbada en el pulmón en respuesta al LPS, evidenciando la importancia de la actividad de PPAR γ en este modelo⁹⁶.

Considerando la información detallada anteriormente, hay un conjunto de evidencias que sostienen que los NO₂-FA serían capaces de ejercer efectos anti-inflamatorios, a través de la activación de PPAR γ . Sin embargo la interacción entre estas dos moléculas implica que los NO₂-FA deben ingresar al núcleo celular para contactar al RN. *A priori*, este evento resulta poco probable considerando que los NO₂-FA son moléculas muy reactivas, y que una vez dentro de la célula, reaccionarán rápidamente formando aductos con tioles disponibles, como los residuos de Cys e Hys de proteínas. A esto se le suma, que por su naturaleza lipídica los NO₂-FA poseen una baja solubilidad en el medio acuoso, por lo que necesitarían de algún tipo de mecanismo de transporte que les permitiera alcanzar el núcleo. En este sentido, la familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos, FABPs (del inglés *Fatty Acid Binding Proteins*), podrían ser buenas candidatas para mediar el transporte de los NO₂-FA, considerando que ya habían sido propuestas como encargadas del transporte de ligandos activadores de PPAR al núcleo. Con el objetivo de comprender el posible papel de las FABPs en la señalización de los NO₂-FA, en la siguiente sección se describen las principales características estructurales y funcionales de esta familia de proteínas, así como también el papel que cumplen en la activación de PPAR γ .

1.5 Las FABPs como transportadoras de ácidos grasos en la célula

Las FABPs constituyen un grupo de proteínas citoplasmáticas de pequeño tamaño (entre 14 y 15 kDa) encargadas de la importación, almacenamiento y exportación de FA, así como del metabolismo del colesterol y fosfolípidos (revisado por^{106,107}). También se ha propuesto que cumplen un papel en el secuestro y/o distribución de ligandos que regulan procesos señalizadores y actividades enzimáticas. Más recientemente, con el uso de animales deficientes y drogas específicas para cada isotipo de FABP, se ha demostrado que esta familia de proteínas tiene un papel importante en muchos procesos mediados por lípidos y relacionados con el metabolismo y las respuestas inmunes. Desde un punto de vista general, las FABPs se pueden ver como chaperonas de lípidos que se encargan de escoltarlos y dictar sus funciones biológicas.

La familia de las FABPs se originó por sucesivas duplicaciones génicas, generando 9 isoformas, que se distribuyen en varios tejidos del organismo como ser el intestino, hígado, corazón, epidermis, cerebro y tejido adiposo. Incluso en alguno de ellos existe la co-expresión de más de una isoforma. En general los miembros de la familia presentan funciones especializadas relacionadas al tejido en el que se encuentran, pero también muestran funciones generales que se superponen con las de otras FABPs. Aunque en un comienzo fueron descritas como proteínas

intracelulares, datos actuales indican que ciertas isoformas son liberadas al exterior celular para continuar con el transporte de lípidos, pero también para cumplir funciones parácrinas/endócrinas relacionadas a la regulación de la homeostasis metabólica y la función celular ^{108,109}.

Sorprendentemente las distintas isoformas tienen una baja homología en su secuencia aminoacídica (entre 20%-70%), sin embargo su estructura tridimensional está altamente conservada, lo que refleja la importancia de la misma en las funciones celulares comunes a todas las isoformas. Dicha estructura está conformada por 10 hebras β -anti paralelas, llamadas βA a βJ , que se organizan en dos hojas β dispuestas en sentido ortogonal y cercanas una de la otra formando un barril- β ligeramente elíptico, que contiene en su interior un núcleo hidrofóbico (ver Figura 1.9) ¹¹⁰. Cada hebra se conecta con la otra por giros pronunciados excepto las dos primeras hebras, βA y βB , que se unen por un motivo hélice-giro-hélice. Dicho motivo se posiciona en uno de los extremos del barril desde el cual se extiende la cavidad de unión al ligando y se piensa que actúa como un portal para el acceso y egreso de FA a la cavidad. Es así que la hélice α -II del motivo hélice-giro-hélice establece interacciones con el giro que une las hebras βC y βD cerrando el portal (ver Figura 1.9).

La cavidad de unión, se comporta como un bolsillo hidrofóbico que contiene moléculas de agua que deben re-arreglarse al momento de la interacción con un ligando. El volumen de la cavidad es considerablemente más grande que los ligandos, y permite acomodar a los ácidos grasos con sus grupos carboxilatos orientados hacia el interior, interaccionando con residuos de Arg principalmente, pero también con otras cadenas laterales ¹¹¹. En general, todas las isoformas unen ácidos grasos de cadena larga (mayores o igual a 14 carbonos) saturados o insaturados, con diferencias en la selectividad, la afinidad y el mecanismo de unión como resultado de pequeñas diferencias estructurales entre las isoformas. En todos los casos la estequiometría de unión al ligando es 1:1, con excepción de FABP1 (o isoforma del hígado) que puede unir más de un FA e incluso ligandos de mayor tamaño ¹¹². A su vez, las afinidades de unión parecen estar regidas por la hidrofobicidad del ligando, cuanto más hidrofóbico mayor la afinidad de unión, con excepción de los FA insaturados ¹¹³. Es así que las necesidades lipídicas de cada célula, podrían potencialmente determinar la isoforma más expresada en cada sitio, según la afinidad que presente por los lípidos requeridos.

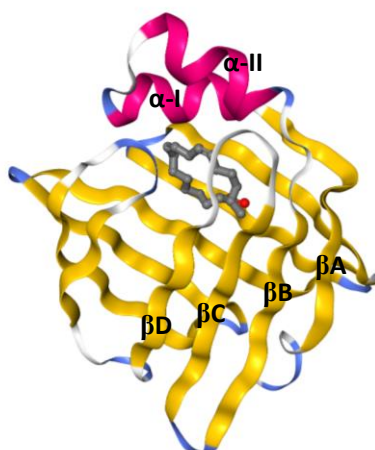


Figura 1.9: Estructura cristalográfica de FABP4

Imagen representativa de la estructura de barril β presentada por las FABPs (PDB 2Q9S). En amarillo se representan las hebras β que forman dos hojas β dispuestas en sentido ortogonal una de la otra, en azul los

giros que unen las hebras β y en rosa el motivo hélice-giro-hélice que constituye la región portal. En el interior del bolsillo hidrofóbico se encuentra el ácido linoleico (gris).

De manera intrínseca a su función las FABPs deben interactuar con membranas para la carga o descarga de los FA, y en este sentido se han descrito dos mecanismos distintos para la transferencia de ligandos, 1) a través de un paso de difusión al medio acuoso, o 2) a través de un contacto directo con la membrana, llamado mecanismo colisional ¹¹⁴. En ambos casos las características químicas de la región portal son las que determinan el mecanismo de transferencia de ligandos. Por lo tanto las interacciones particulares proteína-proteína o proteína-membrana de cada entorno celular también contribuyen a definir las funciones de la isoforma predominante en ese tejido.

Se han propuesto numerosas funciones para las FABPs relacionadas a su actividad chaperona, que a través del transporte de lípidos les permite intervenir en muchos aspectos del funcionamiento de la célula. Así, el destino de los lípidos que se unen a las FABPs queda determinado por el compartimento celular al que son transportados, entre los que se encuentran las gotas lipídicas para su almacenamiento; el retículo endoplásmico para la síntesis de membranas, el tráfico de vesículas y la señalización; las mitocondrias o los peroxisomas para su oxidación; enzimas citosólicas para regular sus actividades; el núcleo para activar la transcripción de genes que responden a ácidos grasos; el exterior celular para mediar el transporte de lípidos o ejercer acciones señalizadoras autócrinas/ parácrinas (revisado por ¹¹⁵). Particularmente en el núcleo los FA activan receptores nucleares como PPAR, que controlan la transcripción de genes relacionados al metabolismo y almacenamiento de lípidos ¹¹⁶⁻¹²⁰. A las funciones anteriormente descritas para las FABPs se les agregan la conversión de ácidos grasos a eicosanoides, la estabilización de leucotrienos ^{121,122}, además de la modulación del crecimiento y proliferación celular tanto en condiciones normales como patológicas (como el cáncer), e incluso se está estudiando el potencial de las FABPs como biomarcadores de algunas patologías ¹²³.

1.6 Las FABPs presentan distintas distribuciones y funciones en el organismo

1.6.1 FABP1 – isoforma de hígado

La FABP1 fue la primer FABP descrita; se la detectó en una fracción del hígado y se la caracterizó por la capacidad de unir compuestos aniónicos como la bilirrubina ¹²⁴. La FABP1 está altamente expresada en la membrana externa mitocondrial de los hepatocitos, pero también se expresa en enterocitos, túbulos renales y en el epitelio alveolar del pulmón (revisado por ¹²⁵). Su expresión en los hepatocitos puede llegar a alcanzar el 5 % de las proteínas citosólicas. A diferencia de los demás miembros de la familia, FABP1 puede unir varios ligandos al mismo tiempo en su bolsillo hidrofóbico. Además de FA, se ha descrito que puede unir ligandos voluminosos y una variedad de xenobióticos como benzodiazepinas, fibratos, y drogas no esteroideas entre otros ¹²⁶. Cuando dos FA se unen a FABP1, el primero se posiciona en el sitio más interno de igual manera que con el resto de las FABPs, mientras que el segundo debe acomodarse en el sitio de unión superficial, luego de la entrada del primero y su grupo carboxilato interactúa con residuos presentes en la región portal ¹¹². Las afinidades de ambos sitios de unión son muy similares para FA saturados, pero el sitio de unión interno tiene una afinidad 10 veces mayor que el superficial por FA insaturados ¹²⁷. Otra característica particular es que la FABP1 es el único miembro de la familia que

transfiere los ligandos por difusión en medio acuoso, lo cual puede deberse a que ninguna de sus dos α -hélices son anfipáticas y por lo tanto la interacción directa con membranas no está favorecida.

Además de las funciones clásicas de transporte de FA a distintos organelos en el citosol, la FABP1 ejerce funciones señalizadoras en el núcleo. Se determinó que una fracción del contenido total de la FABP1 se localizó en el núcleo¹²⁸, y allí co-localizó con PPAR α , a pesar de que no se ha detectado una señal de importación nuclear en la secuencia de la proteína. A su vez, la activación por FA de PPAR α y en menor medida de PPAR γ mostró estar directamente relacionada con la concentración de la FABP1 en la célula¹¹⁷, evidenciando una suerte de transporte de ligandos hacia PPAR.

Curiosamente, la delección de FABP1 en ratones no mostró cambios en la apariencia, morfología o viabilidad de los individuos. Éstos presentaron un peso normal y a pesar de una pequeña reducción en la incorporación de FA, los niveles de triglicéridos y FA en sangre no se modificaron^{129,130}. Sin embargo, los parámetros metabólicos de los animales deficientes luego de someterlos a una dieta rica en grasas/colesterol difirieron entre los distintos estudios de manera sustancial^{131,132}. El desarrollo de obesidad, hepatoesteatosis y síndrome metabólico no fue consistente entre los distintos trabajos publicados. Estas diferencias resaltan la importancia del tipo de dieta y tiempo de consumo, del género de los individuos, así como del trasfondo genético en los modelos empleados, que termina repercutiendo en el papel biológico de FABP1.

1.6.2 FABP2 – isoforma de intestino

La segunda FABP descrita fue la FABP2, que presenta una expresión en el intestino delgado en donde se co-expresa con la FABP1 y la FABP6 (ileal, II-FABP). A pesar de la co-expresión, cada isoforma se distribuye en diferentes segmentos del intestino. FABP1 se encuentra principalmente en la región proximal, mientras que FABP6 está en la región distal. Por su parte FABP2 se encuentra todo a lo largo del intestino pero se expresa con mayor abundancia en la región distal. Allí FABP2 puede constituir hasta un 2 % de las proteínas citoplasmáticas de los enterocitos, lo que representa un alto porcentaje de las proteínas de la célula¹³³. A su vez, existe una diferencia en la distribución anatómica dentro del intestino, mientras que FABP2 se localiza en la punta de las vellosidades, FABP1 lo hace en las criptas¹³⁴. Más aún, no se ha reportado un aumento de la expresión de una isoforma en ausencia de la otra, lo que indica diferencias en las funciones ejercidas por cada FABP¹³⁵.

FABP2 es la única isoforma de la familia que une solamente FA y los acomoda en el bolsillo hidrofóbico con una conformación diferente a las demás FABPs. La función principal de FABP2 es participar en la absorción de los lípidos de la dieta, a través de la unión de FA de cadena larga y su posterior disposición para formar triglicéridos¹³⁶. Por su parte, FABP1 parece encargarse de dirigir los monoglicéridos hacia la formación de fosfolípidos¹³⁷ y es fundamental en la formación de los quilomicrones. A diferencia de FABP1, FABP2 carga y transfiere sus ligandos a las membranas más eficientemente mediante un mecanismo colisional, que involucra la inserción de la región portal en las bicapas de fosfolípidos y la posterior liberación del ligando¹³⁸.

En cuanto a los efectos de la ausencia de FABP2 en modelos animales, se ha observado que bajo ciertas condiciones relativas a la edad, género o tipo de dieta, aumenta la probabilidad de desarrollar obesidad, hipertrigliceridemia, y acumulación de triglicéridos en hígado, todas características asociadas al síndrome metabólico^{135,139}.

1.6.3 FABP4 – isoforma de adipocitos y macrófagos

La expresión de FABP4 se ha reportado en adipocitos y macrófagos, donde se co-expresa con FABP5. Si bien en adipocitos la ausencia de FABP4 lleva a una compensación por aumento de la concentración de FABP5, este efecto no se observó en macrófagos. La FABP4 también se expresa en otros tipos celulares como las células endoteliales¹⁴⁰ y el epitelio de los bronquios¹⁴¹, pero en menor medida que en adipocitos y macrófagos. Esta proteína aumenta su expresión durante la diferenciación a adipocitos y es inducida principalmente por ligandos de PPAR γ , ácidos grasos, insulina y dexametasona^{142,143}. También es expresada durante la diferenciación de monocitos a macrófagos, así como por el tratamiento con LPS, PMA, ligandos de PPAR γ y LDL oxidada¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Se ha visto que FABP4 es capaz de inducir la ubiquitinación de PPAR γ y su degradación por el proteosoma¹⁴⁹, controlando de esta forma su propia expresión. En cuanto a los posibles ligandos, FABP4 mostró tener especial afinidad por ácidos grasos de cadena larga e insaturados¹⁴⁰, aunque también puede unir retinoides, eicosanoides y ligandos sintéticos como Rosi y la sonda fluorescente ANS.

De manera similar a las demás FABPs, FABP4 se encarga del transporte de los FA a distintos organelos celulares entre los cuales se encuentra el núcleo. Curiosamente la FABP4 no presenta una señal de localización nuclear reconocible de manera lineal en su secuencia aminoacídica. Sin embargo, se reportó que la unión de ciertos ligandos induce un cambio conformacional que expone una señal de localización nuclear (SLN) formada por residuos que se encuentran lejanos en la secuencia aminoacídica, pero cercanos en la estructura tridimensional de la proteína¹¹⁸. En particular, la señal está compuesta por tres residuos básicos Lys21/Arg30/Lys31 ubicados en la región de hélice-giro-hélice, similar a lo reportado para la proteína de transporte de ácido retinoico CRABP-II¹⁵⁰ (ver Figura 1.10a). La exposición de la SLN es dependiente del movimiento de un residuo en particular, la Phe57, la cual se encuentra espacialmente cerca de la región portal y puede adquirir dos posiciones induciendo en la proteína la conformación de portal cerrado o abierto¹²⁰. Cuando un ligando no activador se une a la FABP4, se posiciona en el bolsillo de manera que protruye desde interior hacia el exterior, y empuja a la Phe57 hacia su posición abierta, dejando el bolsillo hidrofóbico expuesto hacia el medio acuoso. En cambio, cuando un ligando activador se une a la FABP4, logra acomodarse totalmente en el bolsillo hidrofóbico permitiendo que la Phe57 se cierre sobre la cavidad de unión del ligando, lo que induce una perturbación en la hélice α -II del portal, y como consecuencia se expone la SLN, favoreciendo así la translocación de la FABP4 al núcleo (ver Figura 1.10b). La medición de las distancias atómicas entre Phe57 y un residuo que permanezca estático durante la unión de un ligando, como ser la Thr29, permite evaluar la capacidad del ligando de inducir la conformación cerrada y consecuente translocación al núcleo, conforme la distancia entre los dos residuos sea menor que la presentada por la apo-FABP4. Así, la translocación al núcleo de FABP4 y posterior activación de la transcripción es inducida solo por un sub-conjunto de los ligandos que puede unir. Cabe destacar que la FABP4 en ausencia de ligandos agregados de manera exógena, se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula. Esto puede explicarse solo si: 1) existen ligandos endógenos activadores de la exportación nuclear, 2) la apo-FABP4 presenta parte de su población en una conformación intermedia entre la conformación de portal abierto y cerrado que le permitiera translocarse al núcleo. Del mismo modo que sucede con la SLN, FABP4 posee una señal de exportación nuclear (SEN) ausente en su secuencia lineal, pero que se evidencia en la estructura tridimensional como una región rica en Leu

¹¹⁸ (ver Figura 1.10a). La sustitución de estas Leu por Ala, distorsiona el mecanismo de exportación e induce la acumulación de FABP4 en el núcleo ¹¹⁸.

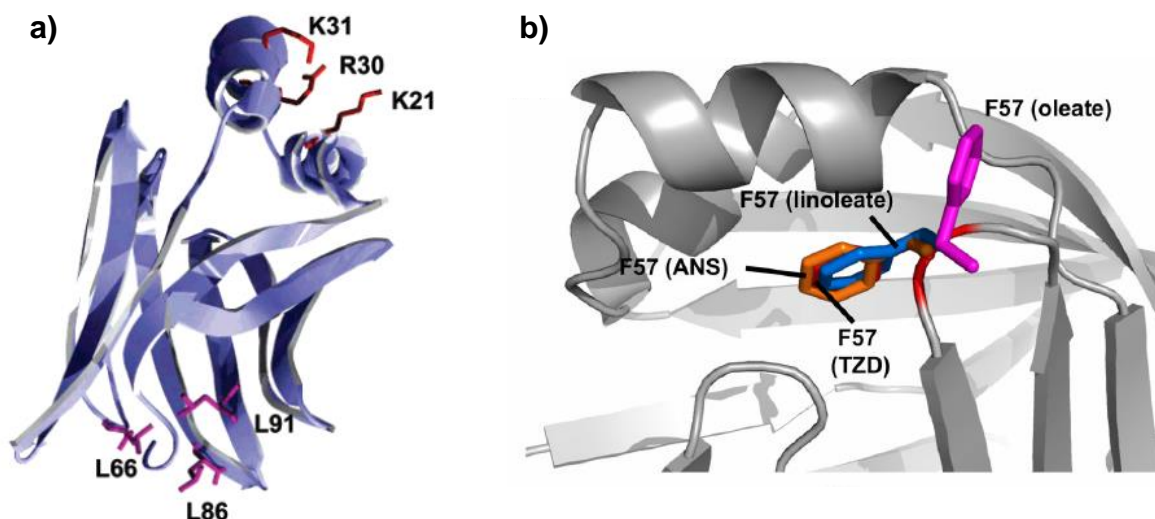


Figura 1.10: ubicación de las señales de localización y exportación nuclear y de la Phe57.

(a) Esquema de la estructura de FABP4 en donde se resalta la ubicación de la señal de localización nuclear (SLN) en el motivo hélice-giro-hélice, formada por los residuos Lys21/Arg30/Lys31. En el fondo del barril β , se ubica una región rica en lisinas que se denomina señal de exportación nuclear (SEN) y está formada por Lys66/Lys86/Lys91. (b) Representación del movimiento de la Phe57 entre sus posiciones cerrada (en azul y naranja) y abierta (en rosa). La posición cerrada es inducida por ligandos activadores como las tiazolidineonas, el ácido linoleico o el ANS. La posición cerrada en cambio la inducen ligandos no activadores como el ácido oleico. Imagen adaptada de Ayers y colaboradores 2007 y Gillilan y colaboradores 2006 ^{118,120}.

Datos cristalográficos indican que tanto la apo-FABP4 como la holo-FABP4 en presencia de ligandos no activadores se encuentran en solución formando un homo dímero a través de la región hélice-giro-hélice de ambas subunidades, ocultando así la SLN. Al momento de la unión de un ligando activador, se modifica la interacción entre las dos subunidades, perdiéndose el contacto a través de la región portal y estableciéndose a través de una cara lateral del barril β . De este modo, la unión del ligando activador permite la liberación de la región portal y la consecuente exposición de la SLN ¹²⁰. La formación del dímero fue corroborada por anisotropía con las proteínas en solución y por ensayos de interacción proteína-proteína inmovilizando la FABP4 a una columna. En ambos casos la formación del dímero se dio de manera independiente y dependiente de ligando ¹²⁰.

A pesar de carecer de un péptido señal en el extremo N-terminal, FABP4 es secretada al exterior celular por adipocitos ¹⁵¹⁻¹⁵³ y en menor medida por macrófagos ¹⁴⁰ y células endoteliales ¹⁵⁴, mediante una vía no clásica independiente del retículo endoplásmico y del Golgi. La secreción es inducida por la lipólisis y aumenta durante el ayuno lo que se corresponde con el aumento de la actividad lipolítica en el tejido adiposo. En este sentido, se determinó que la secreción es dependiente de la actividad de la Adenil-ciclasa protein kinasa A (PKA), de la Guanilil-ciclasa protein kinasa G (PKG) ¹⁵² y de la lipasa ¹⁵³. Los efectos de la FABP4 circulante se relacionarían con la estimulación de la producción de glucosa por células primarias de hígado *in vitro* y la actividad gluconeogénica en animales normales *in vivo*. Por su parte, el bloqueo de FABP4 reduce la producción de glucosa y corrige la diabetes en animales obesos ¹⁵¹. De esta manera, la FABP4 actúa

como una adipoquina que regula el metabolismo de la glucosa en el hígado. Además, se han reportado otras actividades independientes de la regulación del metabolismo como ser la inducción del estrés del retículo en la línea celular de hepatocitos HepG2¹⁵⁵, la inhibición de la activación de la eNOS en el endotelio vascular y el aumento de la proliferación/migración de las células del músculo liso vascular¹⁴⁰, entre otros.

En cuanto a las evidencias sobre los efectos causados por la deficiencia de FABP4, se observó que en animales obesos, indujo una baja resistencia a la insulina pero llamativamente no se observó un efecto de FABP4 en la sensibilización a la insulina en animales normales. A su vez, el silenciamiento de FABP4 por siARN, en ratones con obesidad inducida por la dieta, aumentó el peso corporal y la masa de grasa sin modificar la homeostasis de los lípidos y de la glucosa¹⁵⁶. Por su parte, en macrófagos la FABP4 indujo la acumulación de esteroides de colesterol y formación de células espumosas a través de la inhibición de la vía PPAR γ -LXR α -ATP *binding cassette A1*^{157,158}. Estos resultados se correlacionan con las observaciones que indican que la deficiencia en FABP4 protegió de la aterosclerosis en un modelo de ratones apoE-/-^{144,159}. Por otro lado, los macrófagos deficientes en FABP4 evidenciaron una disminución de la señalización redox y la activación del inflammasoma, mientras que la presencia de FABP4 indujo respuestas inflamatorias a través de la activación de las vías IKK-NF- κ B y c-Jun N-terminal kinase-AP-1^{157,158}. Por lo tanto, además de participar en el control del metabolismo lipídico y de la glucosa, los antecedentes indican que la FABP4 también se encuentra involucrada en la respuesta inflamatoria.

1.7 Interacción entre PPAR γ y FABP4

La literatura que versa sobre la interacción PPAR γ -FABP4 es relativamente abundante pero también controversial. En primer lugar, ensayos utilizando FABP4 inmovilizada e incubándola con PPAR γ marcado radiactivamente, corroboraron el establecimiento de una interacción^{116,160}, pero se ha cuestionado la dependencia¹¹⁴ o no de ligandos específicos de PPAR γ ¹⁵⁸ para hacer efectiva dicha interacción. Por otro lado, utilizando estudios fluorimétricos se comprobó que FABP4 transfirió únicamente ligandos específicos de PPAR γ y que dicha transferencia depende de la interacción directa proteína-proteína¹¹⁴. Un aspecto fundamental al concebir la interacción entre PPAR γ y FABP4, es que ambas proteínas deberían co-localizar en la célula, más aun considerando que el traspaso del ligando depende de la interacción directa proteína-proteína. Por lo tanto, la exposición de la SLN luego de la unión del ligando a FABP4 resulta imprescindible para efectuar la interacción PPAR γ -FABP4. Según los reportes, la localización de FABP4 parece variar entre los distintos tipos celulares y estados de diferenciación, mostrando una repartición entre núcleo y citoplasma dependiendo del modelo celular. El transporte activo hacia y desde el núcleo parece jugar un papel importante en la distribución, pero no puede dejar de considerarse que por el pequeño tamaño de las FABPs (15kDa), pueda existir una difusión pasiva a través de los poros nucleares en ambas direcciones. En un sistema artificial (células COS-7 transfectadas con FABP4) la FABP4 mostró una distribución tanto citoplasmática como nuclear en ausencia de ligando, pero en presencia de un ligando específico de PPAR γ , aumentó su localización nuclear y en algunos casos fue la única localización registrada^{118,160}. Más aún, el cambio en la localización subcelular, es independiente de modificaciones postraduccionales, pero dependiente de la capacidad de la FABP4 de unir ligandos¹⁵⁸. Utilizando FABP4 conjugada a GFP Tan y colaboradores observaron en células COS-1 una localización estrictamente citosólica, pero nuevamente en presencia de ligandos específicos de PPAR γ , la proteína se translocó enteramente al núcleo¹¹⁶. Resultados contrastantes

han sido observados en la línea celular 3T3-L1¹⁶¹ durante la diferenciación a adipocitos; en los pre-adipocitos la FABP4 se localizó en el núcleo, pero al diferenciarse a adipocitos se distribuyó en forma equitativa entre núcleo y citoplasma. Las diferencias observadas entre estos estudios podrían deberse no sólo a que involucran diferentes tipos celulares sino también a las distintas aproximaciones experimentales utilizadas (FABP nativa vs. FABP fusionada a GFP, entre otras). Se ha postulado la posibilidad de que tanto proteínas nucleares como citoplasmáticas se encarguen de anclar a la FABP en un compartimento, y entonces la distribución de FABP quedaría determinada por la concentración y/o disponibilidad de estas proteínas anclas, además de por los posibles cambios inducidos por el ligando. Es así que PPAR en el núcleo¹⁶² y la lipasa sensible a hormona (LSH) en el citoplasma¹⁶¹ son algunos de los candidatos a proteínas ancla, lo que explicaría el aumento de FABP4 en el citoplasma del adipocito diferenciado, concomitante al aumento de la expresión de LSH en el mismo compartimento celular a consecuencia de la diferenciación.

Una evidencia a favor de la existencia de una movilización de FABP4 al núcleo dependiente de sus señales de importación y exportación (determinados únicamente por la estructura terciaria de la proteína), es que en ausencia de ellas la FABP4 es incapaz de activar PPAR γ ¹¹⁸. La distribución celular de las FABPs en macrófagos no ha sido explorada posiblemente por las dificultades de detectarla a las bajas concentraciones celulares; de todos modos, sería interesante evaluarla en un modelo celular en condiciones cercanas a las fisiológicas, para evitar posibles artefactos.

1.8 Contribución de la FABP4 a la activación de PPAR γ

Más allá de la comprobación de una interacción directa entre estas proteínas *in vitro*, los efectos resultantes de esta interacción también parecen ser contradictorios. Por un lado, en células COS-7 y HEK293T en las que se expresó PPAR γ , la co-transfección del gen de FABP4 produjo un aumento en la activación de PPAR γ . Este aumento se observó en ausencia de ligandos exógenos, y se potenció por el agregado de ácidos grasos y de ligandos sintéticos de PPAR γ ^{116,118,163}. Además la activación fue revertida por el agregado de un inhibidor específico de FABP4 (HTS01037), indicando una dependencia clara del transporte mediado por la FABP4 para la activación de dicho factor nuclear¹⁶³. Estos antecedentes están de acuerdo con el concepto de que las FABPs transportan al núcleo ligandos activadores de PPAR γ ¹¹⁶. Sin embargo, existe otro conjunto de evidencias que sugieren que las FABPs limitan la activación de PPAR γ . La co-transfección de PPAR γ y FABP4 en células CV-1 disminuyó la actividad transcripcional del receptor PPAR γ . Esta menor actividad ocurrió tanto en estado basal como con el agregado de ligandos sintéticos de PPAR γ . Los autores sugieren que al ser expresadas en altas concentraciones, las FABPs secuestran o aceleran la metabolización de los ligandos de PPAR γ , tanto endógenos como exógenos, disminuyendo la activación de este factor nuclear¹⁶¹. En este contexto, la expresión de FABP4 mediada por la activación de PPAR γ es un asa de retroalimentación negativa que limita dicha activación. Vale la pena aclarar que si bien se propone que el secuestro de los ligandos por parte de la FABP4 explicaría la reducción de la activación de PPAR γ , se utilizaron únicamente ligandos no fisiológicos, por lo que el destino de ligandos endógenos podría diferir. En línea con estos resultados, tanto la ausencia como la inhibición de FABP4 en macrófagos provocaron un aumento de la activación de PPAR γ . El tratamiento con inhibidores de la FABP4 de células THP-1 o macrófagos FABP4^{-/-} mostraron un fenotipo con aumento de la expresión de genes reporteros de PPAR γ como CD36, ABCA-1 y/o cambios en funciones metabólicas asociadas a la activación de PPAR γ (aumento del transporte reverso del colesterol y disminución de esterificación del colesterol)^{144,164}. Además estos resultados

están de acuerdo con la observación de que en modelos de aterosclerosis, la deficiencia o la inhibición de FABP4 resultan en menor desarrollo de la placa de ateroma^{144,164}. Más aún, cuando se analiza la respuesta inflamatoria de macrófagos deficientes en FABP4 también se encuentra que la deficiencia parecería favorecer la activación de PPAR γ ya que se observa una reducción en la activación de NF- κ B en relación a los macrófagos control¹⁵⁸. Lo mismo se observó en células dendríticas deficientes en FABP4, y como resultado expresaron menores niveles de citoquinas inflamatorias en respuesta al LPS¹⁶⁵.

Como se mencionó anteriormente, está reportado que PPAR γ es capaz de reprimir la actividad transcripcional de varios factores de transcripción entre los que se encuentra NF- κ B, mediante mecanismos de transrepresión⁸⁸. Similarmente en otros trabajos se ha observado que, la ausencia de FABP4 disminuyó la expresión de COX-2 e iNOS, así como la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias como ser IL1 α y β , IL6, TNF α y MCP1, inducida por el tratamiento con LPS e IFN- γ en células FABP4-/-¹⁵⁸. El mismo efecto fue alcanzado al inhibir FABP4 con BMS309403 en THP-1 y RAW 264.7^{144,157,164}.

En suma, los antecedentes apoyan la idea que la deficiencia o inhibición de FABP4 en macrófagos, induce una disminución de la acumulación de lípidos, por activación del metabolismo del colesterol y promueve un fenotipo anti-inflamatorio, evidenciado por una reducción en la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias. Como ambos efectos podrían relacionarse con la activación de PPAR γ , podría sugerirse que FABP4 tiene un efecto de tipo inhibitorio sobre la activación de este receptor, por lo menos en ciertas circunstancias. Como se mencionó anteriormente, una hipótesis que explica este efecto, sería que en estado de reposo la FABP4 podría secuestrar o favorecer la degradación de ligandos endógenos activadores de PPAR. Una alternativa, sería que el destino del ligando transportado por la FABP4 depende de su estructura y de los cambios que pueda inducir en la FABP4, de esta manera la FABP4 podría actuar tanto secuestrando como transportando ligandos que tengan potencial para unirse a PPAR γ . En este contexto, si se considera la naturaleza lipídica de los NO₂-FA, sería posible que fueran transportados por la FABP4 en el interior celular. Incluso podrían competir con ligandos presentes en la célula, modificando el perfil de ligandos que transporta la FABP4 al núcleo, hacia la movilización de ligandos activadores de PPAR γ .

1.9 Los monocitos y macrófagos como modelo de estudio de los efectos de los NO₂-FA mediados por PPAR γ

Para estudiar la contribución de la FABP4 a la activación de PPAR γ en un contexto celular elegimos como modelo los monocitos y macrófagos. Hasta el momento, no existen estudios que hayan profundizado en la activación de PPAR γ por NO₂-FA en células mieloides. Sin embargo, la elección de este modelo resulta interesante por varios aspectos, en primer lugar los monocitos y macrófagos están involucrados en el inicio de la respuesta inmune innata, que induce una respuesta inflamatoria con aumento a nivel local de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno y por lo tanto aumenta la probabilidad de formación endógena de NO₂-FA. De modo que la interacción NO₂-FA macrófago y los efectos moduladores resultantes de ese encuentro podrían tener su correlato a nivel fisiológico. En segundo lugar, no se ha estudiado hasta el momento la activación de PPAR γ por los NO₂-FA en macrófagos, por lo tanto con nuestro trabajo estaríamos contribuyendo al conocimiento en relación a la señalización de los NO₂-FA. En tercer lugar, se sabe

que la FABP4 está altamente expresada en monocitos y macrófagos, y que su expresión depende de la activación de PPAR γ . En vistas de que los NO₂-FA son ligandos parciales de PPAR γ y que podrían activarlo en monocitos y macrófagos, dicha activación tendría como resultado un aumento de la expresión de FABP4, que favorecería la señalización por los propios NO₂-FA. Finalmente, ahondar en los efectos de los NO₂-FA sobre las respuestas de los monocitos y macrófagos en distintos contextos inflamatorios constituye un punto interesante en sí mismo, considerando la posibilidad de la administración de los NO₂-FA de manera exógena para la modulación de la inflamación en patologías que involucren a dichas células.

1.10 Aspectos básicos de los distintos grupos de monocitos y sus funciones

Los monocitos son células que circulan por la sangre y constituyen el 10 % de los leucocitos circulantes en humanos. Se desarrollan en la médula ósea a partir de un progenitor mielóide común compartido con los eritrocitos, plaquetas, células dendríticas (CD) y granulocitos. Luego de su generación los monocitos son liberados a la circulación a la espera de ser reclutados a un sitio de inflamación. Históricamente se creía que los monocitos reclutados originaban a los macrófagos de los tejidos y a las CD, hoy en día se sabe que la mayoría de las células derivadas de los monocitos presentan funciones diferentes a los macrófagos y CD y que por el contrario la mayoría de los macrófagos residentes de tejido poseen un origen embrionario. La característica más relevante de los monocitos es que pueden ser reclutados en gran número y de manera rápida al sitio en cuestión, en dónde pueden diferenciarse para proveer una respuesta inflamatoria o resolutoria dependiendo de las señales presentes en el microambiente (revisado por ¹⁶⁶).

Existen tres grandes grupos de monocitos que se definen dentro del conjunto de células HLA-DR⁺. En humanos, los CD14⁺CD16⁻ se denominan clásicos, y constituyen entre 80-90 % de los monocitos circulantes. El restante 10-20 % es conocido como no clásico y lo componen células CD14⁺CD16⁺ intermedio y CD14^{bajo}CD16⁺. En ratón los marcadores utilizados para definir a los monocitos son otros, mientras que los clásicos son definidos como Ly6C^{alto}CX3CR1^{med}CCR2⁺CD62L⁺CD43^{bajo}, los no clásicos lo son como Ly6C^{bajo}CX3CR1^{alto}CCR2^{bajo}CD62L⁻CD43⁺ ¹⁶⁷. La comparación transcripcional entre humano y ratón mostró una correlación entre los monocitos clásicos CD14⁺CD16⁻ y los Ly6C^{alto}, así como entre no clásicos CD14^{bajo}CD16⁺ y los Ly6C^{bajo}. De todos modos, la representación de cada grupo difiere entre las especies, ya que en humanos hay predominancia de los clásicos mientras que en ratón están igualmente representados.

Los monocitos Ly6C^{alto} pueden potencialmente diferenciarse a diversos tipos celulares. Una vez salidos de la médula ósea, son liberados a la circulación y en condiciones de homeostasis circulan por 1 día para luego migrar hacia diferentes tejidos con el fin re-repoblar parte de la población de macrófagos residentes, o alternativamente se quedan circulando para dar origen a los monocitos Ly6C^{bajo} ¹⁶⁸. De esta manera casi todos los tejidos del organismo presentan células descendientes de monocitos Ly6C^{alto}, aunque el aporte a los macrófagos residentes representa una fracción minoritaria al compararlos con los de origen embrionario. Los macrófagos derivados de monocitos difieren de sus monocitos precursores, ya que sufren cambios transcripcionales inducidos por el ambiente del tejido en el que se encuentran, que los asemeja a los macrófagos residentes de origen embrionario, aunque también con ellos mantienen diferencias epigenéticas, transcripcionales y funcionales. Otra posibilidad es que los monocitos extravasen a los tejidos sin

sufrir diferenciación a macrófagos, y en cambio constituyan un reservorio local de monocitos ¹⁶⁹. Finalmente, los monocitos Ly6C^{alto} pueden continuar en la circulación y dar origen a los monocitos Ly6C^{bajo}.

Los monocitos no clásicos tienen un promedio de vida en la circulación de 2 días en ratón y 7 días en humano ^{168,170}, dependiendo de la disponibilidad de M-CSF ¹⁷¹. El mayor tiempo de vida en la circulación les otorga una ventaja ya que mantiene un pool importante de células circulantes incluso en condiciones de inflamación, cuando los monocitos clásicos se destinan mayoritariamente a extravasar a los tejidos, y no pueden originar monocitos Ly6C^{bajo}. La función de los monocitos no clásicos en condiciones de homeostasis es monitorear la vasculatura mediante interacciones con las células endoteliales ¹⁷².

En condiciones patológicas los monocitos clásicos ejercen funciones no redundantes con las de los macrófagos y las CD, entre las cuales se encuentran actividades pro-inflamatorias, presentación de antígenos, remodelamiento del tejido o actividades anti-inflamatorias. Los monocitos pueden adoptar un papel pro-inflamatorio perjudicial en enfermedades como la encefalomiелitis autoinmune ¹⁷³ y la colitis inducida por DSS. Se ha reportado que también participan en procesos de fibrosis ¹⁷⁴, así como en la diferenciación a células espumosas en el contexto de la aterosclerosis ¹⁷⁵. Por otra parte, en varios modelos los monocitos infiltrantes cumplieron funciones esenciales en la reparación del tejido ^{176,177}. Finalmente, los monocitos reclutados también mostraron la capacidad de adoptar un fenotipo anti-inflamatorio productor de IL-10 en un modelo de daño en la médula espinal ¹⁷⁸, regulando la respuesta inflamatoria de macrófagos residentes. Es así que los monocitos clásicos en condiciones patológicas extravasan a los tejidos y ejercen funciones varias como consecuencia de la gran plasticidad que poseen para responder a los estímulos del ambiente.

Por su parte los monocitos no clásicos en condiciones patológicas así como lo hacen en condiciones de homeostasis, ejercen sus funciones principalmente en la vasculatura, por ejemplo se encargan de eliminar restos celulares circulantes ¹⁷⁹. También eliminan la proteína β -amiloide en el lumen de las venas previniendo su acumulación ¹⁸⁰. Se ha visto que en células del endotelio activadas por TLR7, los monocitos Ly6C^{bajo} se encargan del reclutamiento de los neutrófilos que median la muerte de las células endoteliales, para luego proceder a la eliminación de los desechos celulares ¹⁸¹. De este modo, los monocitos Ly6C^{bajo} actúan como fagocitos residentes de la vasculatura con el fin de mantener la homeostasis en dicho compartimento.

Finalmente, los monocitos pueden en ciertos casos cubrir la desaparición de macrófagos residentes que se da bajo ciertas condiciones inflamatorias ^{182,183}. No se conoce con exactitud, si los macrófagos derivados de monocitos pueden suplir todas las funciones de los macrófagos residentes de origen embrionario y se tiende a pensar que carecen de la capacidad de auto renovarse, al menos por períodos largos.

1.11 Aspectos básicos de las respuestas celulares mediadas por macrófagos

Los macrófagos son células del sistema inmune involucradas en la resolución de la inflamación. Son efectores y reguladores de la inflamación y la respuesta innata, que constituye la primera barrera de defensa del organismo. Expresan receptores codificados en la línea germinal, capaces de reconocer patrones comunes a patógenos, son capaces de producir proteínas con efectos microbicidas y dirigir la respuesta inmune mediante la producción de citoquinas y quimioquinas.

Además, están encargados de mantener la homeostasis de los tejidos, a través de la remoción de células apoptóticas y la producción de factores de crecimiento.

Los macrófagos son células residentes de tejidos linfoides y no linfoides, originadas a partir de precursores embrionarios, que en la etapa de desarrollo pueblan los tejidos y se mantienen allí hasta la adultez (^{170,184,185} y revisado por ^{167,186}). Durante el transcurso de la vida del individuo, estos macrófagos son capaces de autorrenovarse, manteniendo un pool constante de células en los tejidos independientemente de los monocitos circulantes en sangre. Su desarrollo, diferenciación y supervivencia depende íntimamente del factor estimulante de colonia 1 (M-CSF) e IL34 ^{187,188}. Los macrófagos presentan una gran plasticidad que les permite censar las señales del entorno y modificar su fenotipo en base a ellas. La clasificación más común define dos subpoblaciones denominadas clásica o M1 y alternativa o M2, en un intento de hacer un paralelismo con la diferenciación de células T (revisado por ¹⁸⁹). La denominación alternativa surgió en contraposición a la activación clásica de los macrófagos, cuando se encontró que ciertos estímulos como la IL-4 inducían la expresión del receptor de manosa (Mrc1), obteniéndose un fenotipo "alternativo" al anteriormente descrito ¹⁹⁰. Sin embargo, dentro de la subpoblación alternativamente activada, se encuentran una gran variedad de macrófagos con diferentes funciones, por lo que algunos autores proponen diferenciar a los macrófagos según sus roles en el mantenimiento de la homeostasis (revisado por ¹⁸⁹), determinando de esta manera tres grandes grupos, que además conciben la posibilidad de fenotipos intermedios entre ellos. Es así que la defensa del hospedador, la reparación de tejidos y la regulación de la respuesta inmune, definirían tres poblaciones de macrófagos.

En primer lugar los macrófagos activados directamente por patógenos en un contexto inflamatorio o los clásicamente activados, son aquellos que se diferencian en la presencia de ligandos de los receptores tipo Toll (TLR) e IFN γ . El IFN γ es producido tanto por agentes de la inmunidad innata, siendo la principal fuente las células NK (del inglés *Natural Killers*), como por agentes de la adaptativa. Sin embargo, las NK no son capaces de producir suficiente IFN γ para mantener la diferenciación de los macrófagos a lo largo de una respuesta inmune, por lo que se precisa de otra fuente como ser los linfocitos Th1. Como resultado de su activación, los macrófagos clásicos presentan una alta capacidad microbicida debido a sus capacidades fagocíticas mediadas a través de la expresión de receptores de superficie especializados ¹⁹¹, como ser receptores Fc y del complemento, y al aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, producidas por la activación de la NADPH oxidasa y la sintasa de óxido nítrico (NOS2). La activación induce a su vez, la producción de citoquinas inflamatorias entre las cuales se encuentran IL1, IL6 y TNF α ¹⁹², que si bien poseen un rol beneficioso para el hospedador, reclutando y activando células efectoras como monocitos y neutrófilos, pueden dañar los tejidos propios si su producción no es finamente controlada.

Por otra parte se encuentran los macrófagos encargados de la reparación tisular, comúnmente llamados macrófagos alternativos. Se cree que el estímulo de diferenciación sería la IL4, que se produce como resultado de daño tisular, aunque no es claro qué células son las responsables de su producción ¹⁹³. Basófilos y mastocitos podrían ser los responsables de esta producción temprana de IL4, mientras que la respuesta Th2 a helmintos parásitos genera por su parte la producción de IL4 e IL13 ¹⁹⁴. La diferenciación a macrófago alternativo induce la actividad de la arginasa 1, que transforma la L-arginina en ornitina, precursor de colágeno necesario para la producción de la matriz extracelular y de poliaminas que inducen la proliferación celular. A su vez al consumir la L-arginina, disminuye su disponibilidad generando una baja en la producción de óxido nítrico por

parte de la NOS2¹⁹⁵. Sin embargo algunos autores cuestionan el uso de la arginasa 1 como marcador exclusivo de macrófagos diferenciados con IL4, ya que hay reportes de aumento de la expresión de arginasa 1 en macrófagos diferenciados en un contexto inflamatorio bajo ciertas condiciones, así como también en macrófagos infectados por micobacteria¹⁹⁶. Es así que se aconseja la caracterización del fenotipo celular mediante el uso de varios marcadores en paralelo. Otros marcadores característicos del fenotipo encargado de la reparación tisular son la producción de grandes cantidades de quitinasas como Ym1 y Ym2 relacionadas con la reparación de tejido y la homeostasis¹⁹⁷, así como también de Relm α que inhibe la producción de citoquinas inflamatorias por Th2¹⁹⁸. Además resulta interesante que la administración de IL4 *in vivo* es suficiente para inducir la proliferación de macrófagos, mecanismo responsable de la autorrenovación de los macrófagos tisulares¹⁹⁹.

Se ha comprobado que los glucocorticoides liberados en respuesta al estrés pueden inhibir la respuesta inflamatoria mediada por macrófagos, inhibiendo la transcripción de citoquinas inflamatorias y originando así la tercer población de macrófagos denominada macrófagos reguladores (revisado por²⁰⁰). A su vez, este fenotipo puede generarse sobre el final de la respuesta inmune a modo de limitar la inflamación. Fueron descritos inicialmente mediante la estimulación con ligandos de TLR junto con complejos inmunes de IgG. La combinación de estímulos indujo un aumento en la expresión de IL-10, característica distintiva de este fenotipo regulador, a la vez que se provocó una baja en la producción de la interleuquina inflamatoria IL-12²⁰¹. Como IL-10 puede inhibir la producción y actividad de varias citoquinas pro-inflamatorias es que estos macrófagos son potentes inhibidores de la inflamación, por más de que preserven la capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias y de ser células presentadoras de antígenos²⁰¹. Muchas veces los macrófagos encargados de la reparación de tejido y los reguladores son agrupados bajo el nombre de macrófagos alternativamente activados.

En la actualidad hay un intento por dejar atrás las clasificaciones de los macrófagos hasta ahora utilizadas y unificar los criterios, mediante el uso de una nomenclatura que especifique el estímulo utilizado para la diferenciación del macrófago. Por ejemplo, el macrófago clásicamente activado debería nombrarse como M(LPS), mientras que aquél al que definimos anteriormente como reparador debería definirse como M(IL4) (revisado por²⁰²). De este modo se evita el uso de los términos, como M1, M2, clásico, alternativo y regulador, que a veces contemplan a más de una población y no reflejan el estímulo empleado para la obtención de las células. De todos modos, este cambio no está completamente instaurado y por un tema de simplicidad en este trabajo utilizaremos los términos clásico y alternativo.

1.12 PPAR en la diferenciación de macrófagos

Además de los datos que comprueban la función de PPAR γ en la regulación del metabolismo lipídico y la modulación de la respuesta inflamatoria, por interferencia con algunas vías de señalización, existen datos en la literatura que involucran a este factor en el programa de diferenciación de macrófagos y también de células dendríticas.

En relación a los macrófagos, fue reportado que el tratamiento con IL4 (estímulo para la inducción del fenotipo alternativo) en distintas poblaciones, indujo la expresión del propio PPAR γ . Al mismo tiempo, IL4 indujo la expresión de la 12/15 lipooxigenasa, enzima capaz de transformar ácidos grasos como ácido araquidónico o ácido linoleico, en 13-HODE y 15-HETE, ambos descritos como ligandos de PPAR γ . De modo que el tratamiento con IL4 no sólo aumenta la

expresión de PPAR γ , sino que favorece la producción de ligandos endógenos, promoviendo en última instancia la activación de este receptor. Dicha activación fue medida en términos de la expresión de CD36, un reportero de PPAR γ , y controlada a través de la utilización de inhibidores específicos del factor nuclear como ser el GW9662²⁰³. Posteriormente fue reportado que la deficiencia de PPAR γ en macrófagos, impidió que se alcanzara el fenotipo alternativo luego del tratamiento con IL4²⁰⁴. Dicho efecto quedó evidenciado en primer lugar por la incapacidad de inducir la actividad arginasa, lo cual puede relacionarse con una disminución de la expresión del gen ya que por presentar un PPRE en su promotor parece depender de la actividad de PPAR γ ^{204,205}. A su vez, tampoco se logró revertir el aumento de IL6 mediado por LPS, en las células deficientes para PPAR γ en comparación con las normales, evidenciando una dificultad para promover el fenotipo alternativo. Aún más, dicho fenotipo se caracteriza por un cambio en el metabolismo celular, promoviendo uno más oxidativo. En ausencia de PPAR γ , la IL4 fue incapaz de inducir la β -oxidación de ácidos grasos, contrastando con el cambio observado en las células control²⁰⁴. De esta manera la IL4 parece depender de la actividad de PPAR γ , para poder inducir el fenotipo alternativo en su totalidad.

Contrariamente Szanto y colaboradores, realizaron un extenso trabajo donde mostraron que macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) provenientes de animales deficientes en PPAR γ en presencia de IL4, no presentaron alteraciones en la expresión de ninguno de los marcadores alternativos entre los cuales se encontraba *Arg1*, *Chi3l3* y *Retnla*. Por el contrario, plantearon que la actividad de IL4 promueve la expresión de genes regulados por PPAR γ , como consecuencia de la sinergia entre el factor de transcripción que responde a la activación de IL4 llamado STAT6, y PPAR γ ⁹.

Por su parte, Bouhrel y colaboradores utilizando células humanas plantearon una relación distinta entre IL4 y PPAR γ . Observaron que la activación de PPAR γ por ligandos sintéticos logró potenciar la diferenciación a macrófagos alternativos inducida por el tratamiento con IL4, medido por el aumento de la expresión del receptor de manosa y la disminución de CD163. Estos efectos fueron solo apreciables cuando se estimularon monocitos, y no se observó ningún efecto cuando se estimuló únicamente con agonistas de PPAR γ , indicando una dependencia del efecto de IL4. Por el contrario, la activación de PPAR γ no provocó los mismos efectos cuando se estimularon con IL4 macrófagos con un fenotipo previamente adquirido, en particular macrófagos diferenciados en presencia de LPS. En este caso, el tratamiento con IL4 revirtió el fenotipo de los macrófagos hacia un fenotipo alternativo, pero la activación de PPAR γ no tuvo efectos adicionales²⁰⁶. Estos resultados indican que la activación de PPAR γ potencia el fenotipo alternativo inducido por IL4, pero que no es capaz por sí mismo de inducir la expresión de marcadores alternativos. Además los efectos son evidentes en células que aún no tienen un fenotipo adquirido como los monocitos circulantes.

Por otra parte, ensayos *in vivo* demostraron que el tratamiento con un ligando sintético de PPAR γ , la Rosi, aumentó el infiltrado de macrófagos alternativamente activados en el tejido adiposo de animales alimentados con una dieta rica en grasas. Como resultado del infiltrado se modifican las características del tejido adiposo, principalmente disminuye la inflamación inducida por obesidad, debido al cambio del fenotipo de los macrófagos desde el clásico al alternativo, los cuales terminan promoviendo la diferenciación hacia adipocito²⁰⁷. Estos resultados dejan en evidencia que la activación directa de PPAR γ , no sólo presenta efectos anti-inflamatorios, posiblemente explicados a través de la interferencia de la transcripción mediada por factores pro-inflamatorios como NF- κ B⁸⁸, sino que también a través de la modulación de la diferenciación hacia

macrófagos alternativos, ejerce un efecto en el metabolismo lipídico de los propios macrófagos, que pueden a su vez modificar las células del entorno.

De este modo, hay un conjunto de resultados que apuntan a la participación de PPAR γ en la adquisición del fenotipo alternativo en macrófagos inducido por la IL4, mientras que otros autores plantean que no existe tal relación. En este sentido, el estudio de la activación de PPAR γ por los NO₂-FA en macrófagos estimulados con IL4 podría contribuir a la mejor comprensión del diálogo que se establece entre estas dos vías de señalización

1.13 Hipótesis

Considerando la información previamente expuesta, existe la posibilidad que los NO₂-FA formados endógenamente o administrados en contextos inflamatorios, actúen como ligandos de PPAR γ induciendo la expresión de la FABP4 en macrófagos residentes y monocitos reclutados en el tejido. Dado el papel que cumple la FABP4 en estas células, planteamos que estaría involucrada en el transporte intracelular y la entrega de los NO₂-FA a blancos específicos, como ser PPAR γ en el núcleo. Además la FABP4 podría proteger los NO₂-FA de reacciones no productivas con nucleófilos celulares, favoreciendo la señalización de estos mediadores a través de Keap1 o las HSPs en el citoplasma. De esta manera la activación del eje PPAR γ -FABP4 contribuiría a regular la señalización por los NO₂-FA y en consecuencia sus efectos moduladores. En particular, en un escenario donde la IL-4 esté presente, la activación de PPAR γ por los NO₂-FA en monocitos y macrófagos, potenciaría la diferenciación de estas células al fenotipo alternativo, colaborando con los mecanismos asociados a la resolución de la inflamación.

Con esta hipótesis en mente nos planteamos los objetivos detallados a continuación.

1.14 Objetivos

OBJETIVO GENERAL: Estudiar los mecanismos moleculares involucrados en los efectos inducidos por los NO₂-FA en monocitos y macrófagos, explorando la activación de PPAR γ y el papel de la FABP4 en las vías de señalización inducidas y en la adquisición de fenotipos asociados a distintos contextos inflamatorios.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la activación de PPAR γ por NO₂-FA en monocitos en diferenciación y macrófagos, evaluando la regulación de la expresión de la FABP4 como reportera de PPAR γ y su rol en la señalización por NO₂-FA.
2. Estudiar el efecto modulador de los NO₂-FA sobre los macrófagos expuestos a distintos contextos inflamatorios, evaluando el papel de la FABP4 en esta modulación.

Capítulo 2

**La activación de PPAR γ y el papel
de la FABP4 en la señalización de
los NO₂-FA en monocitos y
macrófagos humanos**

2.1 Introducción

En este trabajo nos planteamos estudiar los efectos causados por los NO₂-FA en monocitos y macrófagos, ya que tienen particular importancia como protagonistas de la inflamación desarrollada durante la respuesta inmune innata y adaptativa. Como ya se comentó, frente a un estímulo inflamatorio los monocitos serán reclutados y extravasarán al tejido para colaborar con la respuesta local, donde comenzarán su proceso de diferenciación hacia macrófagos. En ese contexto podrían tomar contacto con los NO₂-FA formados por el aumento de especies nitrantes y oxidantes como consecuencia de la activación celular. Además estas células constituyen un buen modelo para analizar la capacidad de los NO₂-FA de activar PPAR γ , ya que son capaces de expresarlo a lo largo de su diferenciación.

Entre los modelos posibles a usar decidimos abordar el trabajo utilizando en primer lugar, una línea celular humana de pre-monocitos (THP-1) derivada de una leucemia monocítica²⁰⁸. Estas células son capaces de diferenciarse a macrófagos en respuesta a distintos estímulos como M-CSF, vitamina D3 y ésteres de forbol como PMA, alcanzando distintos estadios de diferenciación en función del tiempo de estimulación²⁰⁸. Se ha comprobado que las células obtenidas por diferenciación de THP-1 en general responden de manera similar a los monocitos y macrófagos derivados de sangre periférica, en cuanto a la expresión de receptores tipo Toll, marcadores de membrana y producción de citoquinas (revisado por^{209,210}).

De este modo resulta posible a través del uso de las THP-1, explorar los efectos de los NO₂-FA sobre la respuesta de las células en proceso de diferenciación de monocito a macrófago, para intentar comprender los mecanismos que sucederían a nivel fisiológico.

En línea con estas ideas, nos propusimos estudiar la activación de PPAR γ en monocitos y macrófagos, evaluando la posible regulación de la expresión de FABP4 como reportera de PPAR γ y el papel de la misma en la señalización de los NO₂-FA. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Examinar si los NO₂-FA inducen la activación de PPAR γ
- 2) Determinar si los NO₂-FA son potenciales ligandos de las FABPs *in vitro* y cómo se afectaría la unión a las FABPs por la presencia de nucleófilos celulares como el glutatión
- 3) Estudiar el efecto de los NO₂-FA sobre la localización celular de la FABP4
- 4) Estudiar el papel de la FABP4 en la señalización de los NO₂-FA interfiriendo con su actividad mediante el uso de inhibidores sintéticos

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Reactivos químicos

Todos los reactivos que se listan a continuación se obtuvieron de la empresa Sigma-Aldrich (EEUU): adjuvante incompleto de Freund (AIF), albúmina del suero bovino (BSA), cóctel de inhibidores de proteasas (#P8340), detergentes (laurilsulfato de sodio (SDS), monolaurato de polioxietilen-sorbitan (Tween 20), 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)phenil-polietilen glicol (Tritón X-100), Octilfenoxi poli(etilenoxi)etanol (IGEPAL[®] CA-630), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), glutatión, DL lisina, leptomicina B, reactivos testeados para su uso en cultivo celular (dimetil sulfóxido

(DMSO), L-glutamina y piruvato de sodio) o para la preparación de geles de poliacrilamida (bisacrilamida, N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina (TEMED) y persulfato de amonio), gel de sílica (*flash sílica*), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), solución antibiótica/antimicótica conteniendo penicilina, estreptomina y anfotericina B y todas las sales inorgánicas utilizadas en las soluciones amortiguadoras (salvo que se especifique lo contrario). Por otra parte, la acrilamida, bicarbonato de sodio (calidad cultivo celular), ditioneitol (DTT), HEPES (calidad cultivo celular), urea, tricina y los medios de cultivo DMEM (bajo contenido en glucosa) y RPMI 1640 se adquirieron de AppliChem (Alemania). El ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, cloroformo, etanol, formaldehído, isopropanol y metanol se obtuvieron de Dorwil, Argentina. El acetato de etilo, la acetona, el diclorometano, dietileter y hexano se adquirieron de Merck (Alemania). Los reactivos para uso en técnicas de biología molecular incluyendo agua libre de ARNasas (MP Biomedicals), la retrotranscriptasa M-MLV (del inglés: *Moloney Murine Leukemia Virus*) y el TRIzol reagent, se compraron a Life Technologies (EEUU) mientras que la ADNasa-I y el inhibidor de ARNasas Ribolock a Fermentas, Thermo Fisher Scientific (EEUU). El agonista rosiglitazona (Rosi) y el inhibidor GW9662 de PPAR γ se obtuvieron de Cayman Chem (EEUU). Los inhibidores de la FABP4 HTS01037 (HTS) y BMS 309403 (BMS) se adquirieron de Cayman Chem y ApexBio (EEUU), respectivamente. Las proteínas recombinantes FABP1 y FABP2 de rata fueron purificadas siguiendo protocolos convencionales²¹¹ y amablemente cedidas por la Dra. Betina Córscico (INIBIOLP, UNLP, Argentina).

Los ácidos grasos octadeca-9-enoico (ácido oleico, OA), 9,11-octadecadienoico (ácido linoleico conjugado, CLA) y 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico, AA) se obtuvieron de Nu-Check Prep, Inc (Elysian, MN, EEUU). Los siguientes derivados nitrados de los ácidos CLA, OA y ácido octadecanoico (SA) fueron preparados en el laboratorio del Dr. Bruce Freeman (Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA)^{11,23,212} y generosamente donados por el Dr. Francisco Schopfer: 9- y 12-nitro-octadeca-9,11-dienoico (9-NO₂-CLA y 12-NO₂-CLA), 9- y 10-nitro-octadeca-9-enoico (9-NO₂-OA y 10-NO₂-OA) y 10-nitro-octadecanoico (NO₂-SA). Cabe mencionar que los términos NO₂-CLA y ácido nitro oleico (NO₂-OA) refieren a la mezcla de los isómeros posicionales mencionados anteriormente. Por otra parte, se prepararon derivados nitrados del ácido araquidónico (NO₂-AA) siguiendo el protocolo descrito en²⁸, con algunas modificaciones. Brevemente, se incubó una solución de ácido araquidónico (AA) en hexano con NaNO₂ a una relación molar 1:1, y el medio se acidificó con H₂SO₄ (pH 3) agitando continuamente a 25 °C. Luego de 30 min, se agregó la misma cantidad de NaNO₂. Luego de 30 min, se agregaron a la mezcla de reacción acetato de etilo y NaCl saturado en una relación 1:2:1 (v:v:v), respectivamente. La fase orgánica se recuperó y secó con Na₂SO₄ anhidro. El solvente fue evaporado hasta obtener un aceite amarillo. Se realizó un primer paso de purificación por cromatografía en columna usando *flash sílica* y hexano:dietileter (7:3; v:v) como fase móvil. Se recolectaron las fracciones, se analizaron por cromatografía en capa fina (TLC) en placas Alugram SIL® G/UV (Macherel-Nagel, Alemania) usando hexano:dietileter:ácido acético (79:20:1) como fase móvil y aquellas fracciones enriquecidas en NO₂-AA se juntaron. Esta mezcla se fraccionó nuevamente mediante TLC preparativa para eliminar las especies hidroxiladas y los restos de AA, usando la misma fase móvil. Se seleccionó la fracción enriquecida en NO₂-AA y se realizó la extracción de lípidos por el método Bligh-Dyer²¹³. Brevemente, se agregó 2.2 partes de metanol, una de agua, y una de diclorometano (CH₂Cl₂), mezclando luego de cada agregado en un agitador tipo vortex, y se goteó metanol hasta formar una única fase. Posteriormente se agregó una parte de agua, y una de CH₂Cl₂ y se mezcló nuevamente. Se separó la fase orgánica, se agregó acetona y se secó el solvente, para luego resuspender el producto en metanol. Finalmente, la identidad del

ácido graso se verificó y cuantificó (usando AA deuterado como estándar) mediante HPLC ESI MS/MS (QTRAP 4500, AB SCIEX). Siguiendo este protocolo se obtiene una mezcla de isómeros posicionales, a la que le llamamos NO₂-AA.

De ahora en más haremos referencia al conjunto de nitroalquenos como NO₂-FA y al conjunto de ácidos grasos precursores como FA.

2.2.2 Obtención de la forma recombinante de la FABP4 de ratón

La forma recombinante de la proteína FABP4 de ratón se expresó y purificó siguiendo protocolos convencionales descritos previamente²¹¹. Brevemente, se dispuso de un pre-cultivo de bacterias BL21 transformadas con un plásmido pET11a conteniendo la secuencia del gen *Fabp4* de ratón. Las bacterias se incubaron a 150 rpm, 37 °C y cuando la suspensión alcanzó una Abs a 600 nm mayor a 0.6, se indujo la expresión de la proteína con IPTG 0.4 mM. A las 3 horas post-inducción el cultivo se centrifugó 15 min, 5000 rpm, 4 °C, se resuspendió el pellet en tampón TEK pH 7.7 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM) y se congeló a -20 °C. Posteriormente el pellet se sonicó (6 veces) con pulsos de 30 segundos e intervalos de 1 min entre los pulsos. Luego, el lisado fue centrifugado (30 min, 1000 rpm, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante. Se realizó un paso de precipitación salina, usando (NH₄)₂SO₄ saturado, por 2 h a 4 °C y agitación continua. Después, el sobrenadante (SN1) se centrifugó (30 min, 10000 rpm, 4 °C) y se concentró usando un concentrador de presión positiva (Amicon). Se agregaron 120000 cpm de [¹⁴C]-Palmitato a la proteína, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y luego se purificó la proteína cargada con el ácido graso radiactivo por cromatografía de exclusión molecular usando Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech Inc.), seguido de una cromatografía de intercambio aniónico (DE-52, Whatman), para depletar el ADN contaminante. Finalmente, la rFABP4 fue delipidada usando la resina Lipidex 5000. Brevemente, la columna fue equilibrada con 25 mM K₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 750 mM KCl, 15 mM NaN₃, pH 7.4, a 37 °C. Luego, la muestra fue sembrada y se colectaron fracciones a las que se le midió la absorbancia (Abs) a 280 nm y la radioactividad emitida. La calidad de la rFABP4 se estudió realizando un barrido espectral entre 240-340 nm y analizando su perfil por SDS-PAGE (12.5% de poliacrilamida) en condiciones reductoras, utilizando Coomassie para revelar la presencia de la proteína.

2.2.3 Obtención anticuerpos policlonales de conejo anti-FABP4 de ratón

2.2.3.a Inmunización de conejos con rFABP4

Se generó un suero policlonal anti-rFABP4 en conejo siguiendo protocolos convencionales. Todos los procedimientos se realizaron bajo la ordenanza de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la UdelaR. Como antígeno se utilizó la forma recombinante de la FABP4 de ratón (rFABP4) obtenida tal como se describe en 2.2.2. Brevemente, se inyectó un conejo New Zealand por vía subcutánea con 500 µg de rFABP4 en una emulsión de agua en aceite (1:1, v:v), preparada con Adjuvante Incompleto de Freund en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) en un volumen final de 2 ml. La inyección se realizó en varios puntos (4 o 5) del costado del lomo. Cuando el título de anticuerpos anti-rFABP4 en suero disminuyó significativamente (cerca de 16 veces menos que el título máximo alcanzado), se realizó una segunda dosis (refuerzo) equivalente a la anterior. El sangrado se realizó al día 47 post-refuerzo. El suero policlonal generado presentó un

título de 1/48000 por ELISA y por Western blot reconoció la rFABP4 y una banda de 15 kDa, presente en extractos de THP-1, compatible con la FABP4 humana.

2.2.3.b Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-rFABP4 en conejo: medida del título y avidéz por ELISA

El título es una medida arbitraria de la cantidad de anticuerpos en un suero, que se definió como el inverso de la dilución del suero que arroja una Abs a 450 nm igual a 0.1 en un ELISA de detección de anticuerpos. Por su parte el índice de avidéz es un parámetro que refiere a la fuerza de unión de los anticuerpos al antígeno y se define como la concentración de un agente caotrópico (por ejemplo tiocianato de potasio, KSCN) a la cual la mitad de los complejos antígeno-anticuerpo se disocian en un ELISA de detección de anticuerpos.

A continuación se describen los dos ensayos de ELISA utilizados para determinar título y avidéz del suero hiperinmune. Para determinar el título de anticuerpos, se sensibilizaron placas de ELISA de alta capacidad de adsorción (placas maxisorp, Thermo Fisher Scientific Nunc, EEUU) con 1 o 0.5 µg/ml de rFABP4 en tampón carbonato (100 mM NaHCO₃, 100 mM Na₂CO₃) pH 9.6, en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche. Luego de un lavado con PBS conteniendo Tween 20 0.05% (PBS-T), las placas se bloquearon con BSA, por incubación con PBS conteniendo BSA 0.5% (PBS-B), durante 1 h en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS-T y uno con PBS. Se incubó el suero del conejo a distintas diluciones en PBS conteniendo Tween 20 0.05% y BSA 0.05% (PBS-TB) por 1.5 h a 37 °C en cámara húmeda y luego se realizaron 3 lavados con PBS-T. Se incubó con anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:5000, Calbiochem) por 1.5 h a 37 °C en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados con PBS-T y uno con PBS. Se reveló la presencia de anticuerpos anti-rFABP4 mediante el agregado de la solución conteniendo el sustrato H₂O₂ (dilución final 1:1000 del stock 6 % v/v) y TMB 0.1 mg/ml en tampón citrato fosfato (Na₂HPO₄ 0.1 M, ácido cítrico 0.05 M, pH 5). Se frenó la reacción con el agregado de 50 µl de H₂SO₄ 2 N y se midió la Abs a 450 nm. Por otra parte, la avidéz promedio del antisuero se determinó por ELISA siguiendo la metodología descrita por Pullen *et al*²¹⁴. Brevemente, en base a los resultados del ELISA anterior, se sensibilizaron placas con 0.5 µg/ml de rFABP4 y luego de las etapas de bloqueo y lavado se sembraron los sueros de las distintas extracciones a una única dilución, correspondiente a aquella que generó un 80 % de la máxima reacción en el ELISA anterior (medida según la Abs a 450 nm). Luego de la incubación con los sueros, se realizó un paso de incubación con un agente caotrópico, KSCN, en un rango de concentraciones entre 4 M y 0.125 M, por 15 min y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS-T tres veces y con PBS 1 vez y se continuó con el revelado de los anticuerpos anti-rFABP4 como se describió anteriormente.

2.2.3.c Purificación de los anticuerpos policlonales anti-rFABP4 de ratón por inmunoafinidad

La fracción de anticuerpos específicos anti-rFABP4 del suero hiperinmune obtenido en conejo se purificó por inmunoafinidad usando rFABP4 conjugada a NHS-activated Sepharosa 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Science). Para la preparación de la matriz se lavaron 100 µl de resina con 10 volúmenes de HCl 1mM frío, luego se centrifugó 2 min a 2000 rpm a temperatura ambiente y se descartó el lavado. Para la conjugación de la proteína, la resina se lavó rápidamente con el tampón de conjugación (NaHCO₃ 0.2 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3), se centrifugó para descartar el lavado, se agregó medio volumen de tampón de conjugación conteniendo 300 µg de rFABP4, y se incubó 4 h

a temperatura ambiente con agitación continua. Sin descartar el sobrenadante se agregaron 4 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M a pH 8.5 y se dejó toda la noche a 4 °C. Luego se centrifugó y descartó el sobrenadante y se lavó tres veces con 1 volumen de Tris-HCl 0.1 M pH 8 y posteriormente tres veces con 1 volumen de Acetato 0.1 M, NaCl 0.5 M pH 4, repitiendo este esquema de lavado 4 veces. La resina conjugada se almacenó en 20 % de etanol. En paralelo, para obtener una resina control se realizó el mismo procedimiento con la diferencia de que se adicionó sólo el tampón en el paso de conjugación.

La purificación de los anticuerpos policlonales anti-rFABP4 del antisuero se realizó *in batch*, centrifugando entre cada paso 2 min a 2000 rpm a temperatura ambiente, para separar el sobrenadante de la matriz. En primer lugar, la matriz se lavó con agua miliQ para eliminar el etanol y luego se equilibró con PBS hasta verificar que se alcanzara un pH 7. Se agregaron 200 µl de suero y se incubó 20 min con agitación. Luego se conservó el sobrenadante y se lavó la matriz 3 veces con PBS. Finalmente se eluyeron los anticuerpos adsorbidos con 200 µl glicina 0.1 M pH 2.0 y se neutralizaron con Tris 2 M pH 9.6. Se repitió el paso de elución entre 3 y 5 veces, para luego lavar la matriz con PBS hasta alcanzar un pH 7. En paralelo, utilizando la matriz control se obtuvo una fracción del antisuero, conteniendo una mezcla de aquellos componentes, incluyendo anticuerpos, que se unieron de manera no específica a la matriz.

2.2.4 Ensayos de estimulación de monocitos y macrófagos con NO₂-FAs

Los pre-monocitos humanos THP-1 (ATCC, EEUU) se cultivaron en medio RPMI (RPMI 1640 conteniendo con 10 mM HEPES, 1.5 g/L bicarbonato de sodio, 1 mM piruvato de sodio, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomycin y 250 ng/ml anfotericina B) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SFB, GIBCO, EEUU). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ y sub-cultivaron cada 3-4 días para mantener la densidad del cultivo entre 0.2 y 1.0×10⁶ cel/ml. Para los ensayos las células se plaquearon a 5×10⁵ cel/pozo en placas de 24 pozos (Thermo Fisher Scientific Nunc, EEUU), utilizando un volumen final de 1 ml de medio RPMI. Para inducir la diferenciación a macrófagos las células THP-1 se cultivaron en presencia de 50 ng/ml de PMA en RPMI suplementado con 5 % SFB. Los NO₂-FA, sus correspondientes FA y la Rosi (un ligando total de PPAR γ) se testearon a una concentración final de 1 µM, y se usó como control negativo el vehículo (DMSO). Para determinar los efectos sobre los monocitos en diferenciación, los compuestos se agregaron junto con el PMA. Para determinar los efectos en los macrófagos completamente diferenciados, se obtuvieron macrófagos luego de 72 h de diferenciación con PMA, se cultivaron por 48 h en ausencia de PMA (24 h en RPMI suplementado con 1 % SFB y 24 h en RPMI sin SFB), y luego se estimularon con NO₂-FAs, Rosi o controles en ausencia de SFB. Para determinar cambios en la expresión de genes de interés por RT-qPCR (retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa) todos los experimentos se frenaron luego de 6 h de estimulación, mientras que para evaluar cambios a nivel proteico por citometría, inmunofluorescencia o Western blot los experimentos se frenaron luego de 16 h de estimulación. Cabe señalar que se realizaron ensayos cinéticos para evaluar la activación de PPAR γ donde se usaron como tiempos finales 3, 6, 9 y 17 h, y se midieron los cambios en la expresión de genes reporteros por RT-qPCR.

Con el fin de evaluar la contribución de la activación de PPAR γ en los efectos inducidos por los NO₂-FAs, se realizaron experimentos similares en presencia del inhibidor de PPAR γ , GW9662²¹⁵, que se une de manera irreversible al receptor nuclear. Brevemente, las células se trataron con PMA

por 3.5 h, y luego por 30 min con GW9662 (1 o 2.5 μ M) en RPMI suplementado con 5 % SFB. Luego, las células se estimularon con los NO₂-FAs o sus correspondientes FA controles. Se estudiaron los niveles de ARNm y proteína a las 6 h y 16 h post-estimulación, respectivamente.

Para evaluar el papel de FABP4 en la señalización de los NO₂-FAs, se realizaron ensayos de estimulación en presencia de los inhibidores de FABP4 BMS¹⁶⁴ y HTS²¹⁶ en medio RPMI suplementado con 5 % SF delipidado (SFd, PAN Biotech, Alemania). Las células se pre-trataron con PMA junto con BMS (25 μ M) o HTS (15 μ M) por 2 h, y luego se estimularon con NO₂-FAs o los controles por 6 h. Posteriormente, se analizó la expresión de ARNm como se describe más adelante. En el caso de HTS, se realizó un paso adicional de pre-incubación (24 h) en RPMI conteniendo 5 % SFd como se describió previamente²¹⁷.

2.2.5 Ensayos de viabilidad

La viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] (Bio Basic Inc., Canadá). Las células se cultivaron en presencia de 200 μ g/ml de MTT en PBS con 0.1 % glucosa por 3 h a 37 °C, 5 % CO₂. Luego se lavaron con PBS y el formazán generado se disolvió en DMSO y se midió la Abs a 560 nm. En el caso de los monocitos en diferenciación, la viabilidad también se analizó mediante la exclusión de la sonda de viabilidad conocida como LIVE/DEAD, conjugada al fluorocromo FITC (Invitrogen), evaluando su difusión en las células muertas por citometría de flujo. Brevemente, se incubaron 3x10⁵ células con 10 μ l de L/D-FITC diluido 1/500 en PBS por 10 min en oscuridad a temperatura ambiente y luego se realizaron 2 lavados con PBS conteniendo 0.1 % BSA y 2 mM EDTA.

2.2.6 Análisis de la expresión génica

Para analizar la expresión génica en primer lugar se obtuvo el ARN total de las células. Para esto, las células se lisaron con TRIzol Reagent siguiendo las recomendaciones del fabricante (300 μ l del reactivo para 5x10⁵ células, pipeteando varias veces para homogeneizar) y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento. Para extraer el ARN total, al homogeneizado se le agregó cloroformo (60 μ l), se agitó manualmente y separaron las fases acuosa y orgánica mediante centrifugación (12000 *g*, por 15 min a 4 °C). Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN con isopropanol (150 μ l) mezclando suavemente y dejando reposar a temperatura ambiente por 10 min. Luego se centrifugó la muestra (12000 *g*, por 15 min a 4 °C), se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 300 μ l de etanol (75 % en agua libre de ARNsas) usando un agitador tipo vortex. Posteriormente la muestra se centrifugó (7500 *g*, 5 min a 4 °C), se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 30 min. Se resuspendió el pellet en 20 μ l de agua libre de ARNsas y se calentó durante 10 min a 55 °C para disolver completamente el ARN. Se midió la concentración y se verificó la calidad del ARN obtenido (relación Abs 260/Abs 280 y Abs 260/Abs 230) utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Las muestras de ARN se congelaron a -80 °C para su conservación.

En segundo lugar a partir del ARN total se preparó el ADN copia (ADNc), pero previamente las trazas de ADN genómico se eliminaron de la muestra por tratamiento con ADNasa-I, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, 1 μ g de ARN se mezcló con 1 unidad de ADNasa-I, su correspondiente tampón conteniendo MgCl₂ y agua libre de ARNsas (c.s.p. 10 μ l). Se incubó 30 min a 37 °C en termociclador (Bioer, China). Luego se inactivó la enzima por incubación a 65 °C

durante 10 min en presencia de EDTA. A continuación se realizó la síntesis de la hebra complementaria de ADN (ADNc) usando la transcriptasa reversa M-MLV. Brevemente, a la mezcla de reacción anterior se le adicionaron la enzima M-MLV (200 unidades), 0.5 mM dNTPs, 5 μ M cebadores aleatorios y el inhibidor de ARNasas Ribolock (40 unidades). La reacción de síntesis se realizó en un termociclador en tres pasos utilizando las siguientes condiciones: 25 °C por 10 min, 37 °C por 50 min y 70 °C por 15 min.

Para evaluar los niveles de expresión génica, se utilizaron cebadores específicos del gen de interés para amplificar el ADNc correspondiente por PCR en tiempo real (qPCR). Los cebadores, se diseñaron en el software Primer Express (Applied Biosystems, EEUU) y se verificó su eficiencia de amplificación exigiendo que fuera entre 90 y 110%. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 2.1. Para la qPCR se empleó el kit comercial QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen, Hilden-Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 5 μ l de SYBR con los cebadores específicos (sentido y anti-sentido) a una concentración final de 0.9 μ M, en un volumen final de 10 μ l conteniendo 2 μ l de molde. La reacción se realizó en un Rotor-Gene Q real-time PCR cycler (Qiagen) utilizando el siguiente protocolo: 15 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 30 s a 72 °C. El cambio en el nivel de expresión de los genes de interés se reportó relativo a los niveles observados en las muestras control usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ²¹⁸, donde $\Delta Ct = Ct$ del gen de interés - Ct de un gen constitutivo. En algunos casos se informó la cantidad de ARNm del gen de interés sin normalizar por la condición control, calculado como $2^{-\Delta Ct}$. Para todos los ensayos se usó como gen constitutivo el *GAPDH*, excepto para aquellos que se realizaron en presencia de BMS donde se usó el *18S*.

Tabla 2.1: Cebadores diseñados para qPCR

Gen	Cebador sentido	Cebador anti-sentido
<i>18S</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>ABCA1</i>	TTTCCAGGCCAGTACGGAAT	TCGCCAAACCAGTAGGACTT
<i>ABCG1</i>	CTGACATTTCCCCTGGAGATG	TCCAGTACACGATGCTGCAGTA
<i>CD36</i>	GTGGCAGCTGCATCCCATAT	TCTGACTTGGAACATAGAAGATTTTGA
<i>CPT1A</i>	GGTGGTGGGCGTGATGA	CAGTTGGCCGTTTCCAGAGT
<i>FABP4</i>	GCCAGGAATTTGACGAAGTCAC	TTCTGCACATGTACCAGGACAC
<i>FABP5</i>	CCCTGGGAGAGAAGTTTGAAGA	AATGCACCATCTGTAAAGTTGCA
<i>GAPDH</i>	ACCCACTCCTCCACCTTTG	CTCTTGTGCTCTTGCTGGG
<i>GCLM</i>	AGACGGGGAACCTGCTGAA	TCATGAAGCTCCTCGCTGTC
<i>HO1</i>	AAGACTGCGTTCCTGCTCAA	GGGGGCAGAACTTGCACCT
<i>HSP70</i>	CCACCAAGCAGACGCAGAT	GCCCTCGTACACCTGGATCA
<i>IL1B</i>	TTGGTGATGTCTGGTCCATATGA	GGACATGGAGAACACCACTTGT
<i>MCP1</i>	GCTCAGCCAGATGCAATCAA	GCCTCTGCACTGAGATCTTCCT
<i>MMP9</i>	GGGACGCAGACATCGTCATC	TCGTCATCGTCAAATGGGC
<i>PPARG</i>	CAACAGACAAATCACCATTGTTAT	GGATGGCCACCTCTTTGCT

2.2.7 Detección de CD36

Los monocitos THP-1 en diferenciación (1×10^6 cel/pozo, en placas de 24 pozos) estimulados según se describió en 2.2.4, se lavaron dos veces con PBS frío y se despegaron por tratamiento con PBS conteniendo 1 mM EDTA, 0.1 % NaN_3 , 0.1 % glucosa (tampón PBS_{FC}) por 10 min a 4 °C. Luego

de bloquear con PBS_{FC} suplementado con 0.1 % SFB, las células se incubaron con anticuerpos IgM de ratón anti-CD36 humano (BD Biosciences, EEUU) o con el control isotópico (BD Biosciences) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente las células se lavaron 3 veces y se incubaron con un anticuerpo anti-IgM de ratón conjugado a ficoeritrina (BD Biosciences) según el protocolo del fabricante. Las células se adquirieron en un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y se analizaron usando el software FlowJo (version 7.6, EEUU, www.flowjo.com).

2.2.8 Detección de FABP4

2.2.8.a Inmunofluorescencia

Las células THP-1 (5×10^5 células) se plaquearon sobre cubreobjetos colocados en placas de 24 pozos y preincubaron con PMA (50 ng/ml) por 2 h. Luego se estimularon con 1 μ M de NO₂-FA, FA o Rosi en RPMI suplementado con 5 % de SFD, por 10 h a 37 °C, en atmósfera húmeda conteniendo 5 % CO₂. En paralelo, se prepararon células control mediante tratamiento con el vehículo (DMSO). Posteriormente las células se fijaron por 10 min con 4 % de formaldehído en PBS, lavaron tres veces con PBS, e incubaron con anticuerpos de conejo anti-rFABP4 o anticuerpos control (preparados tal como se describió en la sección 2.2.3.c), diluídos 1:100 en PBS conteniendo 0.1 % tritón x100, 0.1 % azida y 0,1 % DL lisina (tampón de incubación) suplementado con 5 % de suero de cabra, durante toda la noche a 4 °C y en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS, las células se incubaron con anticuerpos de cabra anti-IgG (H+L) de conejo conjugados a Alexa Fluor TM 488 (Invitrogen, 1:1600 en el tampón de incubación) por 1.5 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron tres lavados con PBS y posteriormente se tiñeron con DAPI (Calbiochem-Novabiochem, 300 nM en PBS) por 30 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS y los preparados se montaron con glicerol:Tris-HCl 100 mM pH 8.5 (9:1, v:v) y se sellaron. Las células se observaron y fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia (Nikon E800, Japón).

2.2.8.b Western blot

2.2.8.b.1 Obtención de extractos celulares

Se obtuvieron extractos celulares de monocitos en diferenciación estimulados con NO₂-FAs en forma similar a la descrita en 2.2.4, pero a partir de un mayor número de células. Brevemente, se plaquearon 3×10^6 monocitos THP-1 p/pozo en placas de 12 pozos (Thermo Fisher Scientific Nunc, EEUU). Luego de 16 h de estimulación, los monocitos se lavaron 2 veces con RPMI sin SFB a 37 °C, lisaron utilizando un tampón hipotónico (Hepes 10 mM, EDTA 0.5 mM, KCl 10 mM, pH 7.5, suplementado con DTT 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas, 500 μ l p/pozo) y sonicaron (3 rondas de pulsos de 1 min a 15 % seguido de tres rondas a 30 % de la potencia total) usando un Omni-Ruptor 4000 (OMNI International Inc.). La concentración aproximada de proteínas se estimó en base a la Abs a 280 nm.

2.2.8.b.2 Separación de proteínas por SDS-PAGE y Western blot

En un primer paso las muestras de los lisados celulares se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) siguiendo protocolos convencionales. Brevemente, se utilizaron geles concentradores y separadores de acrilamida de 1.5 mm de espesor al 4 % (m/v) y al 12.5 % (m/v), respectivamente. Las muestras (100 μ g de proteína) se diluyeron en tampón de carga 6x (0.35 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS, 10 % glicerol, conteniendo azul de bromofenol) en condiciones reductoras (40 μ M DTT), y se calentaron por 10 min a 90 °C

previo a ser sembradas. La corrida se realizó usando una solución tampón de corrida (Tris al 0.3 % (m/v), glicina al 1.44 % (m/v), SDS al 0.1 % (m/v)). La electroforesis se realizó en el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), aplicando entre 25-35 mA durante toda la corrida. Se utilizaron marcadores de peso molecular pre-teñidos de entre 20 y 120 kDa (Thermo Fischer Scientific). Luego, las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore-Merck, EEUU), utilizando el sistema de electrotransferencia húmeda (Bio-Rad) y una solución tampón de transferencia (Tris-base 50 mM, glicina 380 mM, SDS al 0.1 % (m/v), metanol al 20 % (v/v) durante toda la noche a voltaje constante de 56 V y 4 °C. Las membranas se bloquearon con PBS-BSA 0.5 % y se incubaron (durante toda la noche, con agitación continua a 4 °C) con el antisuero de conejo anti-rFABP4 (1:20000) o el anticuerpo IgG de conejo anti-tubulina humana (1:1000, Cell Signaling, EEUU) diluidos en PBS-Tween-BSA. Luego de tres lavados con PBS-T, se incubaron con el anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:2000, Calbiochem). El revelado se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Fischer Scientific) y se fotografió en un sistema de imagen (G:BOX, Syngene, India). La densitometría de las bandas se realizó con el software ImageJ ²¹⁹.

2.2.9 Métodos para evaluar la translocación nuclear de la FABP4

2.2.9.a Análisis por inmunofluorescencia

Para la puesta a punto se estudió la translocación nuclear de FABP4 en células THP-1 en vías de diferenciación a macrófagos, estimuladas con NO₂-CLA o CLA utilizando DMSO como control. En primer lugar, las células se estimularon por 10 h con PMA más 1 µM de NO₂-CLA, CLA o DMSO con el fin de obtener niveles detectables de FABP4. Luego las células se re-estimularon manteniendo el mismo tratamiento usado en la primer estimulación por 30, 60 o 240 min. Posteriormente, las células se tiñieron como se describió anteriormente. Para los ensayos de translocación las células fueron estimuladas con por 10 h con PMA más 1 µM de NO₂-FA usando DMSO como control. Luego se agregó Leptomicina B (10 ng/ml) por 30 min y se realizó una re-estimulación corta (30 o 60 min) con NO₂-FA, FA o Rosi (entre 1 y 10 µM). Las células se tiñeron como se describió anteriormente sumando al paso de tinción con DAPI la faloidina-rodamina (0.3 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, EEUU) para teñir el núcleo y citoplasma, respectivamente. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal LSM 800-AiryScan (Zeiss, Alemania) y se procesaron usando FIJI/ImageJ ²²⁰. La cuantificación se realizó en al menos 30 células por condición, en tres experimentos independientes. Los núcleos y toda la célula se delimitaron según la tinción con DAPI y faloidina-rodamina, respectivamente, y la densidad integrada (área seleccionada*valor promedio de la señal, DI) se midió para cada compartimento celular. La distribución de FABP4 se analizó determinando la relación núcleo/citoplasma, calculada como DI Nuclear/(DI Total – DI Nuclear) (N/T-N).

2.2.9.b Análisis mediante fraccionamiento celular seguido de Western blot

Se sembraron pre-monocitos THP-1 (2x10⁶ cel/pozo) en placas de 12 pozos, y se indujo la diferenciación a macrófago con PMA (50 ng/ml) en RPMI suplementado con 5 % SFd, en presencia de Rosi 2 µM o DMSO como control, por 16 h. Luego se realizó una re-estimulación con Rosi o DMSO por 1, 2, 3, 3.5, 3.75 h. Pasado este tiempo, se despegaron las células con PBS conteniendo NaN₃ 0.1 %, EDTA 3mM, glucosa 0.1 % y se separaron sus componentes citoplasmáticos y nucleares por centrifugación en un gradiente de densidad discontinuo preparado con Visipaque (densidad

1.369 g/ml a 20 °C, GE Healthcare Life Science) siguiendo la metodología descrita por Poglitsch *et al.*²²¹. Este gradiente utiliza varias soluciones de diferente densidad, que se colocan en frío cuidadosamente en un tubo para evitar que se mezclen. Esto forma diferentes capas de densidad que los autores que describen el método llamaron *floating layer*, *nuclei wash layer*, *lysis layer* y *wash layer*, de abajo hacia arriba. Se colocaron las células (2×10^6) resuspendidas en PBS en la parte superior del gradiente y se centrifugó a 1000 *g* y 4 °C por 10 min. Al finalizar se recogió la fracción citosólica (FC) como una fracción azul por debajo de la capa *wash layer*, y la fracción nuclear (FN) como una fracción azul debajo de la *nuclei wash layer*. A esta última fracción se le agregó el tampón de carga utilizado para el análisis por SDS-PAGE (6x) y se hirvió. Ambas fracciones se congelaron a -80 °C para su conservación. La calidad de las fracciones y la presencia de la FABP4 se analizaron por Western blot siguiendo el protocolo descrito en 2.2.8.b.2 con algunas modificaciones. Como este análisis requería de una mejor resolución de las proteínas de bajo peso molecular, se empleó el sistema Tris-Tricina SDS-PAGE, tal como se describió en²²². Para ello se utilizaron geles de poli(acrilamida) de 1.5 mm de espesor y concentraciones 4 %, 10 % y 16.5 % para las porciones concentradora, espaciadora y separadora, respectivamente. Las FC y FN se diluyeron con el tampón de carga (6x) en condiciones reductoras. La corrida se realizó usando una solución tampón de ánodo (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.9) y una de cátodo (Tris-HCl 0.1 M, Tricina 0.1 M, pH 8.25, SDS al 0.1 % (m/v)). En el análisis por Western blot, además de los anticuerpos anti-rFABP4, se incubó con anticuerpos de conejo IgG anti-Histona 3 humana (1:3000, Cell Signaling, EEUU) y anticuerpos de ratón IgM anti-GAPDH humana (1:1000, SIGMA-Aldrich, EEUU) para evaluar la presencia de contenido nuclear y citosólico en las muestras. El revelado se realizó con conjugados a peroxidasa anti-IgG de conejo o anti-IgM de ratón (1:2000, Calbiochem) y el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico.

2.2.10 Ensayos *in vitro* de unión a FABPs

2.2.10.a Ensayos de desplazamiento de sondas fluorescentes

Se estudió la unión de los NO₂-FA a las isoformas FABP1, FABP2 y FABP4 mediante ensayos de desplazamiento del ácido 8-Anilino-naftaleno-1-Sulfónico (ANS), el cual se comporta como una sonda fluorescente e hidrofóbica capaz de unirse a las FABPs²²³. Se incubó durante 5 min la FABP a ser analizada (3 μM) con la sonda ANS (10 μM en tampón 5 mM K₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄, 150 mM KCl, pH 7.4) en un volumen final de 1 ml. Usando el espectrofluorómetro Fluorolog-3 (Horiba-Yvon) se excitó la sonda a 400 nm (*slit* de excitación 1), y se registró el espectro de emisión entre 420-600 nm (*slit* de emisión 2) a 25 °C, usando el software FluorEssence™. A continuación, se agregaron progresivamente pequeñas cantidades de NO₂-FA y se registró el espectro de emisión 2 min después de cada adición hasta alcanzar la saturación. Se ensayaron los compuestos NO₂-CLA, NO₂-OA y NO₂-AA y sus correspondientes FA precursores (CLA, OA y AA, respectivamente). Cada experimento se realizó al menos por triplicado. Los datos obtenidos fueron ajustados a un modelo de decaimiento hiperbólico de tres parámetros ($r^2=0.99$) para FABP4 y FABP2, mientras que se ajustaron a un modelo sigmoideal de la ecuación de Hill de cuatro parámetros ($r^2=0.99$) para FABP1, usando el software SigmaPlot (versión 11.0, Systat Software, Inc., EEUU, www.systatsoftware.com). La constante aparente de disociación ($K_{d,app}$) fue calculada usando la ecuación $EC_{50ligando}/[ANS] = K_{d,ligando}/K_{d,ANS}$ como se describió previamente²²⁴. Para obtener la $K_{d,ANS}$, se tituló una solución de FABP (2 μM) con la sonda fluorescente hasta alcanzar la saturación. Las curvas se ajustaron al modelo de un sitio de unión a ligando en saturación usando SigmaPlot y la $K_{d,ANS}$ se calculó como

el promedio de las constantes de cuatro experimentos independientes. La $K_{d,ANS}$ para FABP2 no se obtuvo experimentalmente, en cambio se utilizó la reportada previamente por ²²⁵.

Con el fin de evaluar los efectos de la presencia de nucleófilos suaves sobre la unión de los NO₂-FAs a la FABP4, se realizaron ensayos similares a los descritos anteriormente agregando a la mezcla de rFABP4 cargada con ANS, distintas concentraciones de glutatión reducido (GSH, 300 μM – 7 mM concentración final). En estos ensayos se testeó el NO₂-OA, su FA precursor el OA y el NO₂-SA como control de un ácido graso nitrado, pero carente del motivo nitroalqueno que confiere la electrofilicidad a los NO₂-FAs.

2.2.10.b Análisis *in silico* de unión a FABP4

Los análisis *in silico* se realizaron como se detalla en ²²⁶. Brevemente, se utilizó la estructura cristalográfica de la FABP4 de ratón (mFABP4) unida a OA (PDB 1LID) ²²⁷ disponible en las bases de datos públicas, como punto de partida para construir los complejos 1:1 de mFABP4:FA o mFABP4:NO₂-FA en solución. Se realizaron las dinámicas moleculares (DM), corriendo simulaciones NPT a 310 K y 1 atm durante 1.2 μs usando AMBER 16 suite ²²⁸. El estudio incluyó el OA y el CLA, y sus correspondientes derivados nitrados contemplando los isómeros de posición (9- y 10-NO₂-OA y 9- y 12-NO₂-CLA) como ligandos de FABP4. Las estructuras aniónicas de los ligandos en solución fueron determinadas por cálculos de mecánica cuántica aplicando la Teoría Funcional de Densidad (DFT) ²²⁹ en un solvente continuo IEF-PCM ²³⁰ usando Gaussian09 ²³¹. Se obtuvieron estructuras representativas de cada uno de los 6 complejos estudiados por DM mediante un análisis de agrupamiento jerárquico aglomerativo. Con el fin de analizar eventuales cambios en la afinidad de unión relacionados con los distintos isómeros, se obtuvieron las energías libres de unión MM/PB(GB)SA ²³² en un única trayectoria, extrayendo 201 instantáneas separadas por 500 ns del total de los 1.2 μs de duración de la simulación DM (los primeros 200 ns se descartaron) utilizando el módulo mmpbsa.py ²³³ de AmberTools17 ²²⁸. Por otra parte, se monitoreó la translocación entre las conformaciones abierta/cerrada estudiando la distancia entre Phe57 (bucle βC-βD) y Thr29 (hélice αII) a lo largo de toda la trayectoria con cpptraj, y se tomaron valores menores a 8.5 Å como indicadores de la conformación cerrada. Es importante señalar que la idea de explorar *in silico* cómo interacciona la FABP4 con los NO₂-FA, si se une o no y qué uniones establece, surgió en nuestro grupo pero para llevarla adelante colaboramos con el grupo dirigido por la Dra. L Coitiño (Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Facultad de Ciencias, UdelAR). Los estudios fueron iniciados por la Dra. Alicia Merlino y posteriormente continuados por el Dr. Jenner Bonanata. Participé en las instancias de discusión que definieron qué estudios realizar y en todas aquellas donde se fueron discutiendo los resultados obtenidos.

2.2.11 Análisis de los datos

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces (n = 3) con cada condición por duplicado. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism (version 6, GraphPad Software, EEUU, www.graphpad.com). Cuando fue posible se analizó si la población de datos presentaba distribución normal (test Kolmogorov-Smirnov), para definir el uso de test paramétricos o no paramétricos. En la mayoría de los casos se utilizó el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para las comparaciones múltiples, con el post-test de Tukey, o el ANOVA de una vía con el post-test de Dunn como se indica en cada experimento. Para los ensayos de inmunofluorescencia donde se comparan dos grupos, se utilizó el t-test desapareado. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0.05$.

2.3 Resultados

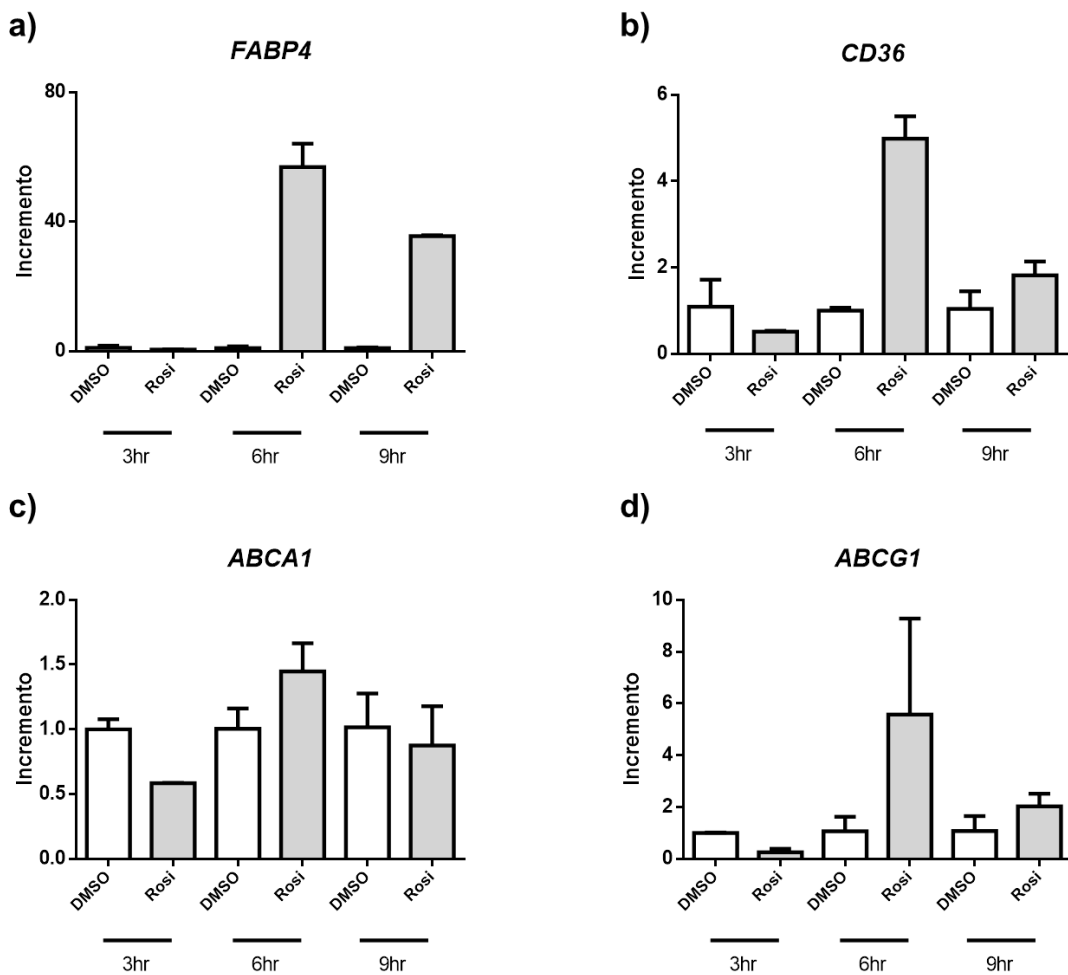
2.3.1 Estudio de la capacidad de los NO₂-FA de activar PPAR γ

2.3.1.a Análisis de la expresión de genes reporteros de PPAR γ en monocitos y macrófagos

Para estudiar la capacidad de los NO₂-FA de activar PPAR γ en monocitos y en macrófagos, se utilizó como modelo la línea celular humana de pre-monocitos THP-1, la cual mediante el tratamiento con esteres de forbol (PMA), puede diferenciarse a monocito o macrófago, dependiendo del tiempo del estímulo. Es así que generamos dos tipos de células con distintos estadios de diferenciación: los que llamamos monocitos en diferenciación, serían un modelo de los monocitos reclutados desde la sangre al tejido que comienzan su diferenciación a macrófagos sin llegar a diferenciarse por completo y que fueron obtenidos con 16 h de estimulación con PMA. Por otro lado los macrófagos, que representan a las células que una vez trasvasadas al tejido lograron diferenciarse completamente, se obtuvieron luego de 72 h con PMA. De este modo partiendo de las mismas células podemos comparar efectos en dos estadios distintos de la diferenciación de monocitos a macrófagos²⁰⁹.

En primer lugar se estudió la respuesta de los monocitos en diferenciación al tratamiento con Rosiglitazona (Rosi), un agonista fuerte de PPAR γ y se cuantificó mediante PCR en tiempo real la expresión de posibles genes reporteros a diferentes tiempos (Figura 2.1a-d). El gen *FABP4* resultó ser el más inducido en monocitos en diferenciación y en macrófagos, con un máximo de expresión a las 6 h post-estimulación (cerca de 20 y 3 veces más que el control, respectivamente, Figura 2.1e y f). La expresión de los genes *FABP5* y *CD36* se indujo en forma moderada por Rosi en ambos tipos celulares, resultando levemente mayor para *CD36* en monocitos que en macrófagos. En cuanto a los genes *ABCA1*, *ABCG1* y *CPT1A*, la estimulación con Rosi tuvo efectos de menor magnitud y disímiles entre los dos tipos celulares. En vista de estos resultados, se decidió utilizar la expresión de *FABP4*, *FABP5* y *CD36* como reporteras de la activación de PPAR γ por parte de los NO₂-FA. Para ello, se realizaron estudios donde se administraron concentraciones micromolares bajas de NO₂-FA, sus FA precursores no nitrados o Rosi. En primer lugar se comprobó que en las condiciones ensayadas ninguno de los tratamientos afectó significativamente la viabilidad celular (Figura 2.2). Se realizó un ensayo de MTT para monocitos y macrófagos y se utilizó un método adicional para monocitos que implicó el uso de una sonda de viabilidad conjugada a un fluorocromo, que arrojó el mismo resultado. Esta última estrategia no se utilizó para macrófagos, porque requiere despegar las células de la placa a la que se encuentran adheridas, lo que de por sí genera daño de las membranas e introduce mucho error en las medidas. Posteriormente, se observó que todos los NO₂-FA pero no sus FA precursores aumentaron los niveles de expresión de *FABP4* en monocitos en diferenciación (Figura 2.3a), mostrando incrementos significativos respecto al vehículo (DMSO) del orden de 7.5, 6 y 5 veces para NO₂-CLA, NO₂-OA y NO₂-AA, respectivamente. Por otro lado, los niveles de *FABP5* permanecieron constantes luego de todos los tratamientos ensayados (Figura 2.3b), mientras que sólo la estimulación con NO₂-CLA logró una inducción significativa de los niveles de *CD36* (incremento del 2.4, Figura 2.3c), sugiriendo que el NO₂-CLA fue el activador más potente de PPAR γ entre los NO₂-FA testeados en monocitos en

diferenciación. Continuando con los resultados en macrófagos, se observó nuevamente que todos los NO₂-FA, pero no sus FA precursores, provocaron un aumento en la expresión de *FABP4* aunque de menor magnitud que el observado en monocitos (incrementos significativos de 1.7, 2.2 y 2 veces para NO₂-CLA, NO₂-OA y NO₂-AA respectivamente, Figura 2.3e). Por el contrario, no se registraron cambios en la expresión de *FABP5* o *CD36* luego del tratamiento con ninguno de los NO₂-FA testeados, mientras que, como era de esperar, Rosi indujo un aumento en la expresión de ambos genes (incremento significativo de 2.77 y 1.7 veces, Figura 2.3f y g respectivamente). Finalmente, para evaluar en qué medida los efectos observados sobre *FABP4* y *CD36* inducidos por Rosi y los NO₂-FA son debido a cambios en la expresión del propio factor nuclear, se estudiaron los niveles de expresión del gen *PPARG* en las células luego de cada uno de los tratamientos, pero no se encontraron cambios significativos en ningún caso (Figura 2.3d y h). En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que los NO₂-FA podrían actuar como ligandos de PPAR γ en monocitos en diferenciación y en menor medida en macrófagos, induciendo la expresión de genes relacionados al metabolismo lipídico como *CD36* y *FABP4*, sin alterar la expresión del propio *PPARG*.



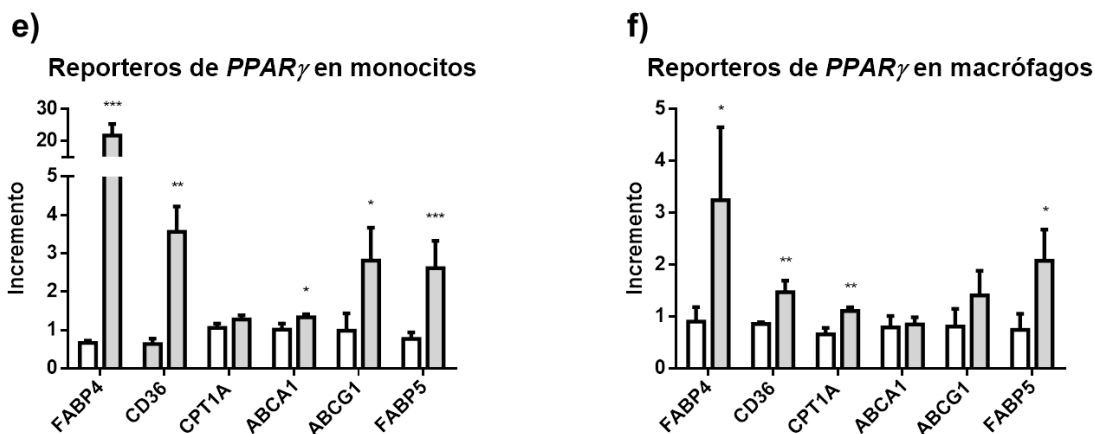


Figura 2.1: Análisis de la expresión de genes candidatos a reporteros de *PPAR* γ en monocitos THP-1 en vías de diferenciación a macrófagos y en macrófagos.

(a-d) Las células THP-1 se diferenciaron con PMA para generar monocitos en diferenciación o macrófagos, que se estimularon con Rosi (1 μ M) o DMSO como control negativo. Luego de 3, 6 y 9 h de estimulación, se purificó el ARNm total y la expresión de *FABP4*, *CD36*, *ABCA1* y *ABCG1* se cuantificó por RT-qPCR, usando *GAPDH* como gen constitutivo. Los resultados se presentan como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo DMSO, y corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm desvío estándar (SD, del inglés *standard deviation*). (e) y (f) Niveles de ARNm de varios genes asociados con la activación de *PPAR* γ luego de 6 h de estimulación con Rosi (barras grises) en relación al grupo vehículo. Las barras corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas con el control (t-test test despareado * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

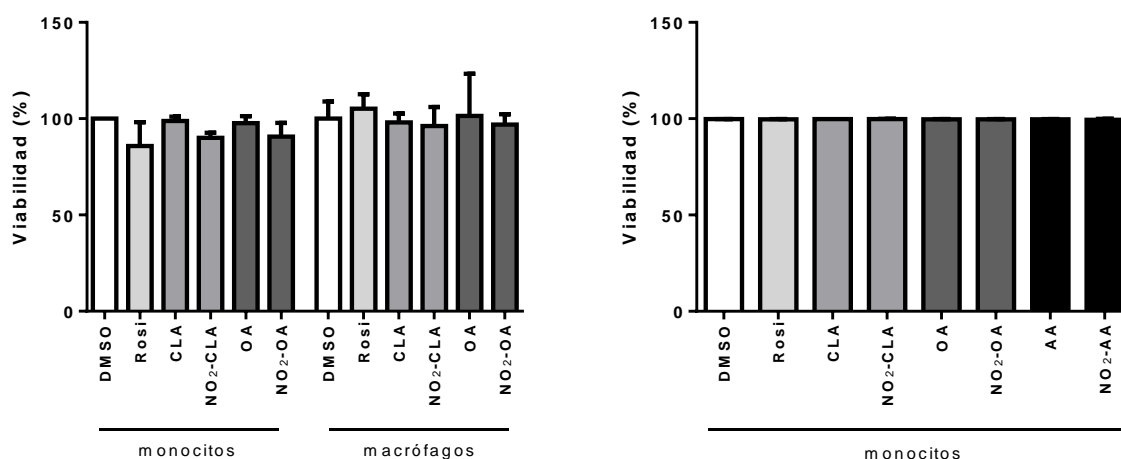


Figura 2.2: El tratamiento con NO_2 -FA no afectó la viabilidad de monocitos y macrófagos

Se estimularon monocitos en diferenciación y macrófagos THP-1, obtenidos por tratamiento con PMA, con 1 μ M de Rosi, NO_2 -FA o sus correspondientes FA precursores. En paralelo, las células se incubaron con DMSO como control. (a) Luego de 6 h de estimulación, se agregó MTT al cultivo por 3 h y se cuantificó la formación de formazán por medida de la Abs a 560 nm. Las gráficas representan el porcentaje de viabilidad celular en relación al DMSO, y muestran el promedio de 3-4 réplicas \pm SD. (b) Luego de 1 h de estimulación las células se tiñeron con una sonda para determinar viabilidad (Live/Dead) conjugada a FITC y se analizaron por citometría de flujo. Las gráficas representan el porcentaje de células viables luego de cada tratamiento y muestran el promedio de tres réplicas \pm SD.

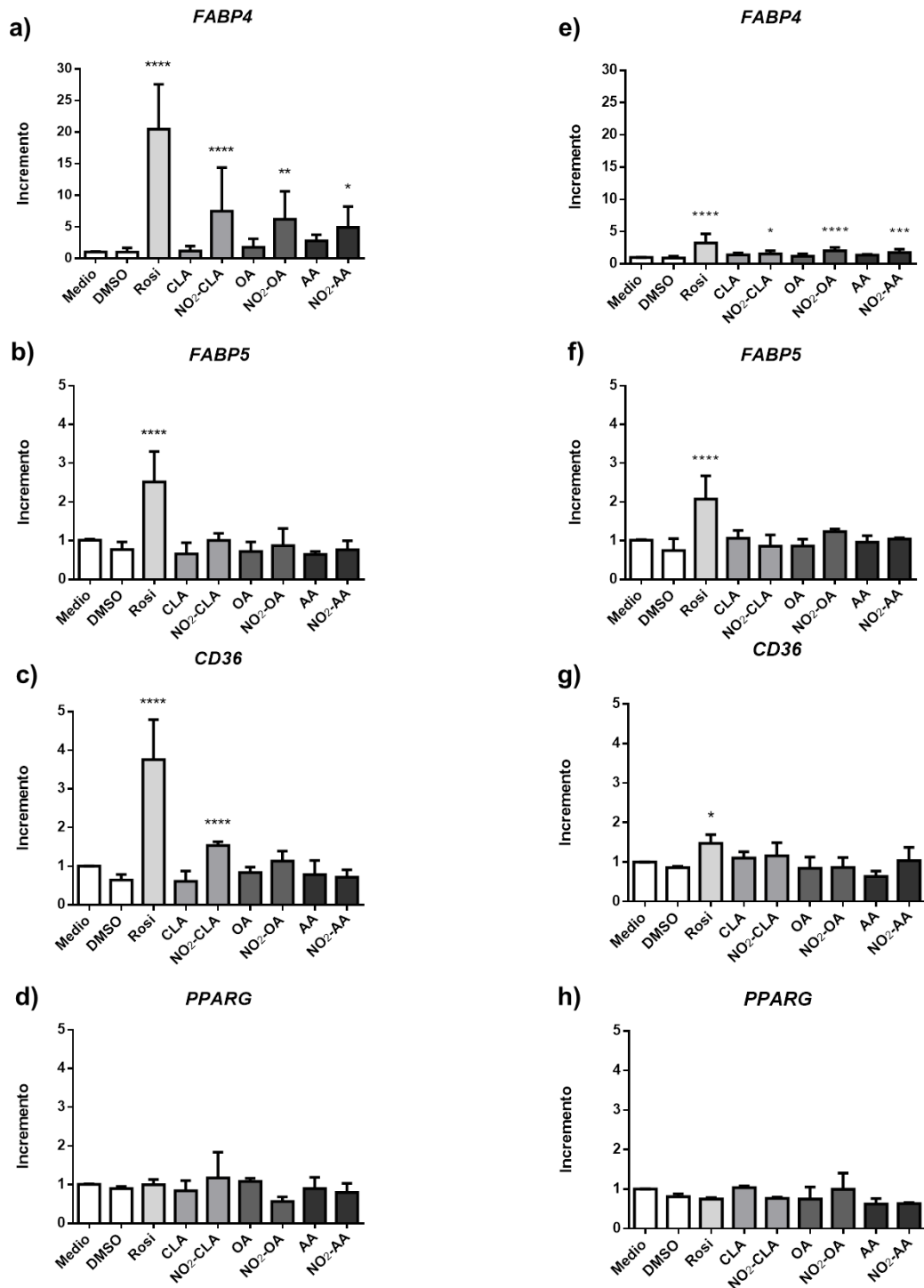


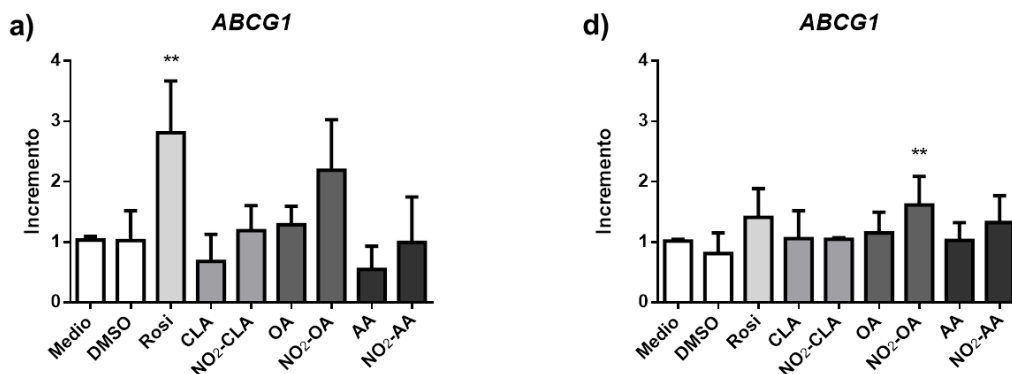
Figura 2.3: Los NO₂-FA indujeron la expresión de *FABP4* y *CD36* en monocitos en diferenciación y en menor medida en macrófagos.

Se estimularon monocitos en diferenciación (**a, b, c, d**) y macrófagos (**e, f, g, h**), obtenidos a partir del tratamiento de la línea celular THP-1 con PMA, con 1 μ M de Rosi, NO₂-FA o el correspondiente FA precursor. En paralelo, las células se incubaron con DMSO (vehículo) como control. Luego de 6 h de estimulación, las células se homogeneizaron para obtener el ARNm total, y los niveles de ARNm de *FABP4*, *FABP5*, *CD36* y *PPARG* se determinaron por RT-qPCR, normalizando contra el gen constitutivo *GAPDH*. Los resultados se presentan como el incremento relativo en los niveles de ARNm en relación a las células incubadas en medio, y corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes \pm SD. (*) Indica diferencias

estadísticamente significativas comparado con el DMSO (2ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

2.3.2 Análisis de la expresión de ABCA1, ABCG1 y CPT1A inducida por los NO₂-FA en monocitos y macrófagos

Al estudiar la expresión de los candidatos a genes reporteros de PPAR γ , se observó que Rosi tuvo efectos disímiles entre monocitos y macrófagos para el caso de *ABCA1*, *ABCG1* y *CPT1A*, por lo que se optó por utilizar como reporteros otros genes que tuvieron un comportamiento más uniforme entre ambos tipos celulares. De todos modos, se analizó la expresión de estos genes luego del tratamiento con Rosi y NO₂-FA. En primer lugar se observó que de los tres genes, Rosi pudo inducir únicamente la expresión de *ABCG1* en monocitos (Figura 2.4a), pero ninguno de los NO₂-FA pudo reproducir este efecto. En contraste con los resultados anteriormente obtenidos (Figura 2.1e), no se observó inducción de *ABCA1* por Rosi (Figura 2.4b), lo cual refleja que esta respuesta no es robusta y se pierde en el nivel de dispersión de los datos experimentales. Curiosamente el NO₂-OA logró una inducción significativa de *ABCA1* (Figura 2.4b). La expresión de *CPT1A* no se vió afectada por ninguno de los tratamientos (Figura 2.4c). En cuanto a los resultados en macrófagos, Rosi no logró aumentar la expresión de ninguno de los genes estudiados (Figura 2.4d-f), incluyendo *CPT1A*, único gen para el cual se había observado un aumento en los ensayos previos (Figura 2.1f), pero el efecto se perdió al considerar todas las condiciones con sus dispersiones asociadas. Por su parte, el NO₂-OA logró inducir un aumento significativo de la expresión de *ABCG1* y *ABCA1* (Figura 2.4d y e), mientras que no hubo efectos sobre *CPT1A* (Figura 2.4f). Estos resultados indican que en nuestro modelo de monocitos y macrófagos humanos los genes *ABCA1* y *CPT1A* no se comportan como reporteros de la expresión de PPAR γ , y *ABCG1* sólo reportaría activación de PPAR γ en monocitos. Respecto a los efectos del NO₂-OA sobre *ABCG1*, *ABCA1*, la falta de correlato con los efectos mediados por Rosi, sugiere que se trata de un efecto independiente de PPAR γ .



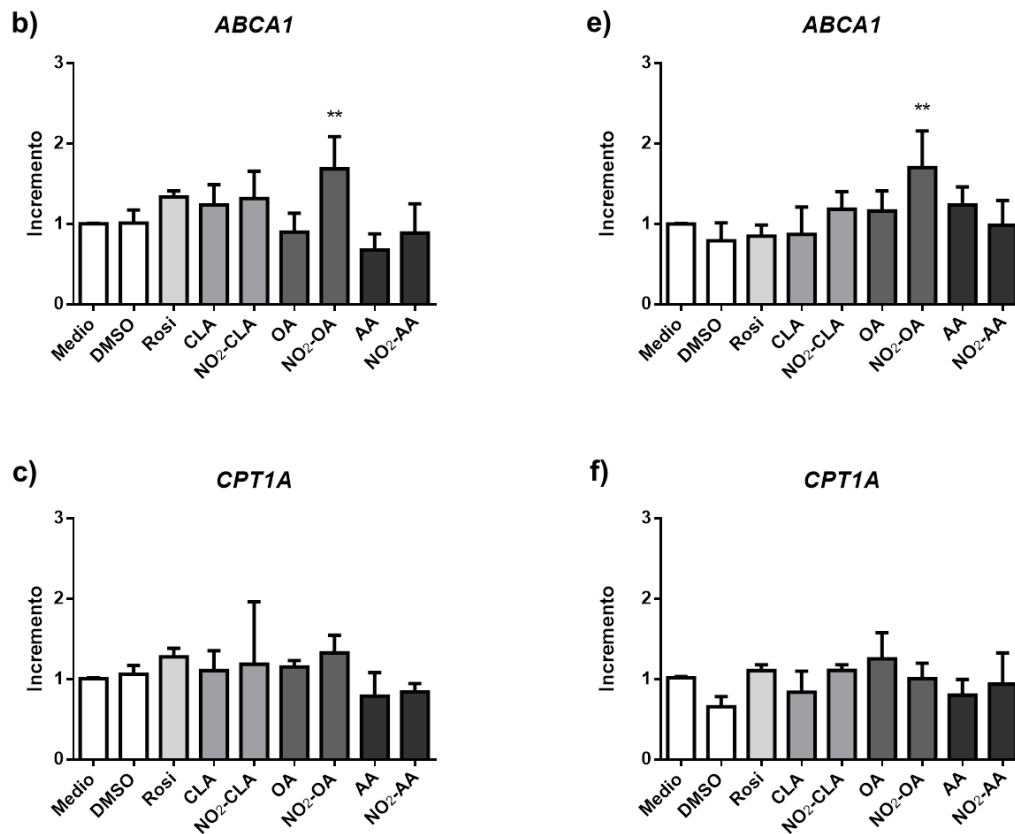


Figura 2.4: Análisis de la expresión de *ABCG1*, *ABCA1* y *CPT1A* en monocitos en diferenciación y macrófagos estimulados con NO₂-FA.

Monocitos en diferenciación THP-1 (**a, b, c**) y macrófagos THP-1 (**e, f, g**), obtenidos tras el tratamiento con PMA, fueron estimulados con 1 μ M de Rosi, NO₂-FA o el correspondiente FA precursor. En paralelo, células fueron incubadas con DMSO (vehículo) como control. Luego de 6 h de estimulación, las células fueron homogeneizadas para obtener el ARNm total, y los niveles de ARNm de *ABCG1*, *ABCA1* y *CPT1A* fueron determinados por RT-qPCR y normalizados contra *GAPDH* como gen constitutivo. Los resultados se presentan como el incremento en los niveles de ARNm en relación al grupo Medio, y corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el DMSO (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

2.3.3 Estudio de los niveles proteicos de genes reporteros de la activación de PPAR γ por NO₂-FA

2.3.3.a Producción de FABP4 recombinante y generación de anticuerpos anti-FABP4 como herramienta para el estudio de los efectos de los NO₂-FA sobre monocitos en diferenciación y macrófagos

Con el objetivo de evaluar si los cambios a nivel de ARNm se traducen en un aumento de la proteína de FABP4 en los monocitos y macrófagos humanos, se planteó estudiar los niveles proteicos por Western Blot e inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-FABP4. Si bien existen reactivos comerciales, surgió la idea de obtener la FABP4 de manera recombinante (rFABP4) para generar anticuerpos anti-rFABP4, aprovechando la infraestructura y experiencia de nuestro

laboratorio en esta área. En particular, se consiguió purificar la FABP4 murina, la cual nos permitió generar anticuerpos con reactividad cruzada por la FABP4 humana, debido a la alta similitud estructural entre ambas proteínas (91 % de similitud, Figura 2.5). Por otra parte, dada la naturaleza lipídica de los NO₂-FA, sería posible que la FABP4 se comportara como un transportador intracelular de estos ácidos grasos nitrados, modulando de algún modo los procesos de señalización asociados a sus propiedades anti-oxidativas y anti-inflamatorias. Por esa razón, producir la rFABP4 resultó atractivo ya que posibilitaría realizar ensayos *in vitro* que aportaran a evaluar esta nueva hipótesis. Para la preparación de la rFABP4, se concretó una pasantía en el laboratorio de la Dra. Betina Córscico, INIBIOLP, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata, que tuvo como primer objetivo la expresión y purificación de la FABP4 de ratón.

2.3.3.a.1 Obtención de FABP4 recombinante (rFABP4)

En el laboratorio de la Dra. Córscico contaban con bacterias BL21 transformadas con un plásmido pET11a conteniendo la secuencia del gen de la FABP4 murina (*Fabp4*). En primer lugar se expandió un cultivo de las bacterias y se indujo la expresión de la proteína con IPTG. Tras la inducción se lisó el cultivo y recuperó la fracción soluble. Posteriormente, para la purificación de la FABP4, se siguió un procedimiento utilizado para otros miembros de la familia FABP²³⁴, basado en un paso de precipitación salina con (NH₄)₂SO₄ del cual se recuperó el sobrenadante (SN1). A continuación, se agregó palmitato marcado con ¹⁴C al SN1, que por unirse específicamente a las FABPs, permite monitorear su presencia a lo largo de un procedimiento de purificación. El SN1 marcado con ¹⁴C-palmitato se fraccionó entonces por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-50 lo cual permitió sobre todo eliminar gran parte de los componentes de peso molecular (PM) mayor a 30 kDa. En la Figura 2.6a, se muestran los resultados de este fraccionamiento, en cuya elución se detectó la radioactividad (emisión β correspondiente al ¹⁴C) en un hombro del pico de mayor Abs a 280 nm, indicando que se logró separar a la proteína cargada con el ácido graso radiactivo de gran parte de los componentes de la mezcla. Para comprobar la presencia de la FABP recombinante (rFABP4) en dichas fracciones se realizó un SDS-PAGE (Figura 2.6b), donde se observó una banda de PM aparente de 15 kDa en todas las muestras, compatible con la presencia de la rFABP4. Se juntaron las fracciones conteniendo la rFABP4 y se realizó una cromatografía de intercambio aniónico, para descartar entre otros componentes, los ácidos nucleicos contaminantes. El gráfico de la Figura 2.6c muestra como la Abs a 260 proveniente de ácidos nucleicos se redujo luego de la cromatografía, quedando más pura la fracción correspondiente a la rFABP4. A continuación se procedió a delipidizar la proteína mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina ávida por lípidos en general (Lipidex 5000), capaz de extraer del bolsillo hidrofóbico de la rFABP4 el ¹⁴C-palmitato y otros ligandos que puedan encontrarse ocupándolo. Este paso resultó particularmente importante pensando en la realización de ensayos de unión de los NO₂-FA a la proteína, donde se precisa que el bolsillo hidrofóbico se encuentre disponible para la unión de potenciales ligandos. Se siguió la elución de la rFABP4 de la columna Lipidex por medida de la Abs a 280 nm. Se comprobó que la radioactividad disminuyó en las fracciones obtenidas en la elución respecto a la muestra de partida (43 vs. 173 DPM), indicando que la matriz fue capaz de competir por el ¹⁴C-palmitato con la rFABP4, extrayéndolo del sitio de unión a la proteína. Finalmente se concentró la proteína y se corroboró su calidad por Abs a 280 nm y SDS-PAGE (Figura 2.6d y e, respectivamente). Como resultado se obtuvo un espectro característico con un pico de Abs a 280 nm, mientras que en el SDS-PAGE se observó la banda correspondiente a la rFABP4 ubicada a la altura de 15 kDa (indicada con una flecha, Figura 2.6e). Además se vio una banda minoritaria que

coincide con el doble del peso de la FABP4 indicando un posible dímero. Como resultado final se obtuvo un rendimiento de 23 mg totales de rFABP4 por litro de cultivo de bacterias transformadas.

a) SP|P15090|FABP4_HUMAN MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKVEVGVGFATRQVAGMAKPNMIIISVNGDVITIKSESTFKN 60
 SP|P04117|FABP4_MOUSE MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKVEVGVGFATRQVAGMAKPNMIIISVNGDLVIRSESTFKN 60
 *****:.*:*****

SP|P15090|FABP4_HUMAN TEISFILGQEFDEVTADDRKVKSTITLDGGVLVHVQKWDGKSTTIKRKREDDKLVVECV 120
 SP|P04117|FABP4_MOUSE TEISFKLGVEFDEITADDRKVKSIITLDGGALVQVQKWDGKSTTIKRKRDGDKLVVECV 120
 ***** * * * * : * * * * * * * * * * . * : * * * * * * * * * * . * * * * * * * * * * *

SP|P15090|FABP4_HUMAN KGV TSTRVYERA 132
 SP|P04117|FABP4_MOUSE KGV TSTRVYERA 132

b)

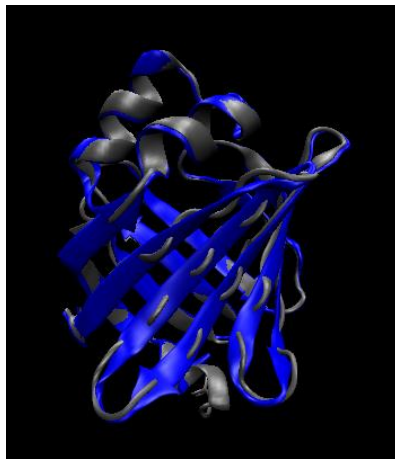


Figura 2.5: Las FABP4 humana y murina muestran una gran similitud estructural

En (a) se muestra el alineamiento de las secuencias de FABP4 humana y FABP4 murina obtenido utilizando *CLUSTALO multiple sequence alignment* (sitio web <http://www.uniprot.org/align/>). El análisis muestra que ambas proteínas poseen 121 aminoácidos idénticos (indicados con *) y 8 aminoácidos similares (indicados con : o .), arrojando un porcentaje de identidad de 91.67%. En (b) se observa el alineamiento de las estructuras de FABP4 humana (gris, 10.2210/pdb3RZY/pdb) y FABP4 murina (azul, 10.2210/pdb1LIB/pdb), creado usando el software VMD²³⁵.

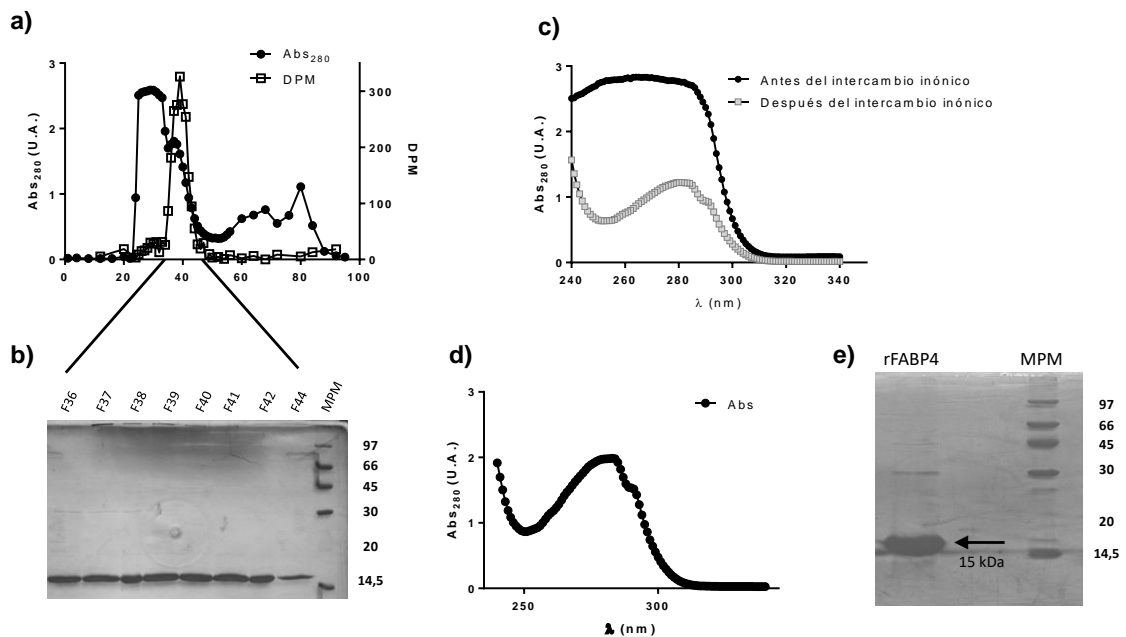


Figura 2.6: Expresión y purificación de la forma recombinante de la FABP4 murina

Se indujo con IPTG la expresión de la rFABP4 en *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pET11a conteniendo la secuencia del gen correspondiente a la FABP4 murina, *Fabp4*. Las bacterias obtenidas se lisaron y el sobrenadante recuperado fue sometido a precipitación salina, luego de la cual se recuperó el

sobrenadante (SN1). En **(a)** se muestra el fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-50 del SN1, previamente incubado con ^{14}C -palmitato. El gráfico muestra el registro a lo largo de la elución (fracciones de 15 ml) de la Abs a 280 nm (eje izquierdo), y la emisión de radiactividad (emisión β , eje derecho en unidades de decaimiento por minuto, DPM). En **(b)** se muestra el análisis por SDS-PAGE (12.5%, condiciones reductoras, tinción con azul de Coomassie) de las fracciones correspondientes al pico de radioactividad detectado en la elución y al marcador de peso molecular (MPM). Las fracciones correspondientes al pico de radioactividad (F36 a F44) se mezclaron (*pool*) y utilizaron para continuar con la purificación. En **(c)** se muestra el espectro de absorción entre 240-340 nm del *pool* antes (círculos negros) y después (cuadrados grises) de su fraccionamiento por intercambio aniónico; nótese la reducción en el pico de Abs a 260 nm que muestra la remoción de los ácidos nucleicos contaminantes. Posteriormente la fracción conteniendo la proteína fue delipidada mediante la resina Lipidex5000, y la pérdida del ^{14}C -palmitato se verificó midiendo la emisión de radiactividad comparándola con la emitida por la muestra previo a la delipidación. En **(d)** se muestra el espectro de absorción entre 240-340 nm y en **(e)** el gel teñido con Coomassie, del producto final de la purificación de rFABP4 (indicada con una flecha).

2.3.3.a.2 Obtención de anticuerpos de conejo policlonales anti-rFABP4

Con el fin de obtener anticuerpos específicos anti-FABP4 que nos permitieran detectar la FABP4 en los monocitos y macrófagos, se procedió a inmunizar un conejo con rFABP4 siguiendo protocolos convencionales. Previo a la inmunización y a lo largo de la misma se obtuvieron muestras de sangre para evaluar por ELISA el título y la avidéz de los anticuerpos anti-FABP4 generados. Como se describe en Materiales y Métodos, se administró un refuerzo (segunda dosis) cuando el título disminuyó notoriamente, con el objetivo de inducir una respuesta específica de alto título y avidéz. Como se muestra en la

Figura 2.7a, el pico en el título de las IgG anti-FABP4 a los 39 días post-inmunización (D39) y la administración del refuerzo (día 287) provocó un aumento en el título de 32 veces (Figura 2.7a eje izquierdo). Similarmente, la avidéz analizada a partir del D39 aumentó 2 veces luego del refuerzo (Figura 2.7a eje derecho). Por otra parte, se caracterizaron los antisueros obtenidos por Western Blot utilizando muestras de monocitos en diferenciación tratados con Rosi o DMSO. En primer lugar se observó que las inmunoglobulinas del antisuero obtenido al D39 reconocieron una banda de PM aparente 16 kDa (Figura 2.7b, indicada con una flecha), que disminuyó su intensidad en muestras de monocitos estimulados con Rosi en presencia del inhibidor de PPAR γ , GW9662 (

Figura 2.7b), lo cual es compatible con el reconocimiento por el antisuero D39 de la FABP4 humana. Cabe notar que además de esta banda, el antisuero D39 mostró reactividad con otros componentes de los monocitos. Esta fue otra razón para extender el protocolo de inmunización en el tiempo buscando mejorar la calidad de los anticuerpos obtenidos, sobre todo pensando en su aplicación en ensayos de inmunofluorescencia donde a diferencia del Western blot no es posible identificar fácilmente el ligando reconocido por el antígeno. En comparación, el antisuero colectado al punto final (D357) mostró un reconocimiento específico por FABP4, desapareciendo por completo el reconocimiento de otras bandas (Figura 2.7c). Una vez obtenido un antisuero de buen título y avidéz (D357), se purificaron los anticuerpos anti-rFABP4 por afinidad a una matriz de Sefarosa acoplada covalentemente a rFABP4. Esto permitió disponer de un anticuerpo de mayor calidad para utilizarlo en ensayos de detección de la FABP4 por microscopia de fluorescencia. En paralelo se prepararon anticuerpos controles, correspondientes a las fracciones del suero del día 0 (control) y del antisuero obtenido al día final (día 357) que se unieron a Sefarosa sin acoplar a rFABP4. Como se muestra en la Figura 2.7d el antisuero obtenido al día 357 y las IgG purificadas por afinidad sobre Sefarosa-rFABP4 reconocieron una banda de 15 kDa en los lisados de monocitos

en diferenciación tratados con Rosi, mientras que los controles no mostraron señal. Tomando estos resultados en su conjunto, se concluyó que se generó un suero hiperinmune anti-rFABP4, de alto título y avidéz posible de ser usado como reactivo en sí mismo, y a partir del cual se obtuvieron anticuerpos anti-rFABP4 purificados por afinidad por su antígeno.

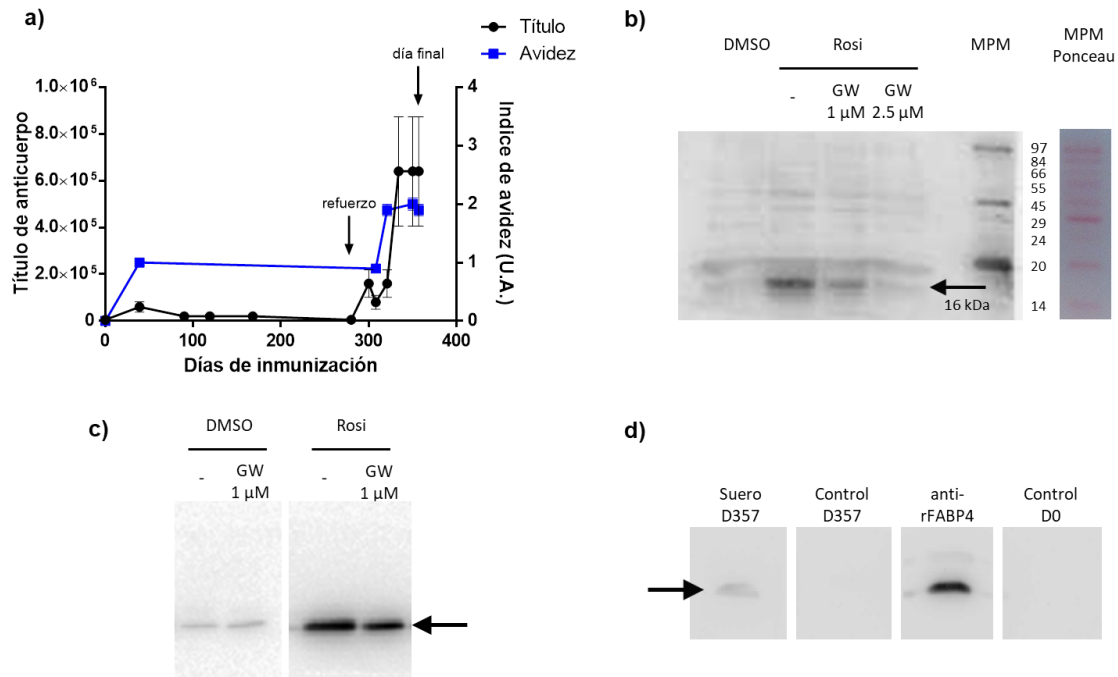


Figura 2.7: Obtención, caracterización y purificación de anticuerpos de conejo anti-rFABP4.

Se inmunizó un conejo con rFABP4 siguiendo protocolos convencionales. Se obtuvieron muestras de sangre periódicas para hacer el seguimiento del título y la avidéz de los anticuerpos anti-rFABP4 mediante la técnica de ELISA. En (a) se muestra el título de anticuerpos (eje izquierdo) obtenido a lo largo de los días de inmunización. Para definir el título se fijó un umbral arbitrario de absorbancia = 0.1, siendo el título igual al inverso de la dilución de la muestra que presenta dicha absorbancia. Se indica el día del refuerzo (día 287) y el día final en el que se realizó la eutanasia del animal (D357). En el eje derecho se grafica la evolución de la avidéz a partir del D39 y hasta el día final. Los valores de avidéz corresponden a la concentración de agente caotrópico necesario para disociar el 50 % de los complejos inmunes. En (b) se muestra el Western Blot correspondiente al análisis del perfil de reconocimiento del antisero D39 utilizando lisados de monocitos en diferenciación tratados con Rosi o DMSO como control, en presencia o ausencia de GW9662 (1 o 2.5 μM). A la derecha se muestra el marcador de peso molecular (MPM) teñido con Ponceau como referencia. La flecha indica una banda de 16 kDa compatible con la FABP4 humana. En (c) se muestra el perfil de reconocimiento del antisero del D357, utilizando lisados de monocitos en diferenciación tratados con Rosi o DMSO en presencia o ausencia de GW9662 (1 μM). En (d) Se separaron por SDS-PAGE lisados de THP-1 estimuladas con $\text{NO}_2\text{-CLA}$ por 16 h para asegurar la presencia de la FABP4. Las proteínas se transfirieron a una membrana y se analizaron por Western Blot utilizando para cada carril un anticuerpo distinto. El carril 1 se incubó con el antisero D357 (dilución 1:30000), mientras que los carriles siguientes se incubaron con diluciones 1:1000 de los anticuerpos del antisero D357 que se unieron a la matriz de Sefarosa sin acoplar (control D357), los anticuerpos anti-rFABP4 purificados por afinidad a Sefarosa conjugada a rFABP4, y los anticuerpos del suero del día 0 purificados por afinidad a la Sefarosa control (control D0), respectivamente. La unión de los anticuerpos se reveló con inmunoglobulinas de cabra anti-IgG de conejo conjugadas a peroxidasa.

2.3.3.b Análisis de los niveles proteicos de FABP4 y CD36 en monocitos y macrófagos

Para evaluar en qué medida los efectos inducidos por los NO₂-FA a nivel transcripcional sobre la expresión de *FABP4* y *CD36* (Figura 2.3) se traducen en un aumento en los niveles proteicos, se estudió la presencia de la FABP4 por microscopía de epifluorescencia en monocitos en diferenciación y macrófagos. La unión de los anticuerpos de conejo anti-rFABP4 purificados por afinidad fue revelada con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a un fluorocromo que emite en el canal verde (Alexa Fluor 488). Para estos estudios se analizó la respuesta a las 12 h post-estimulación, tiempo en el cual se determinó por Western blot que la inducción de la FABP4 por Rosi alcanzó su mayor nivel. En monocitos en diferenciación se verificó que los anticuerpos anti-rFABP4 reconocieran a la proteína, pero que en ausencia del anticuerpo primario, el anticuerpo conjugado no presentara reactividad por la proteína (

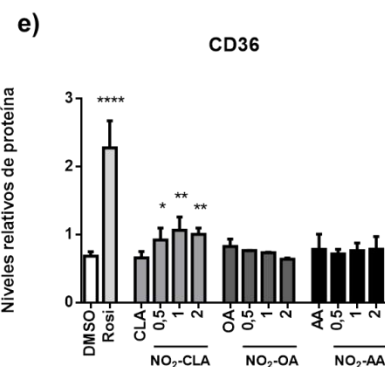
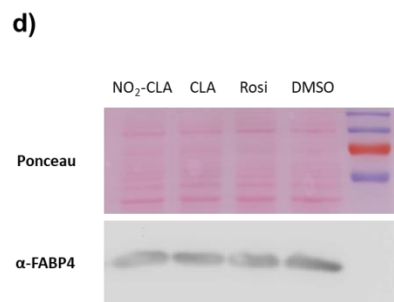
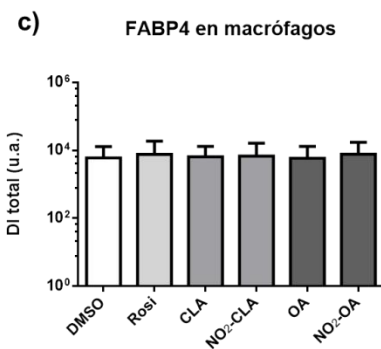
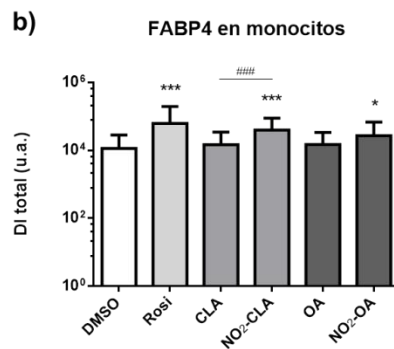
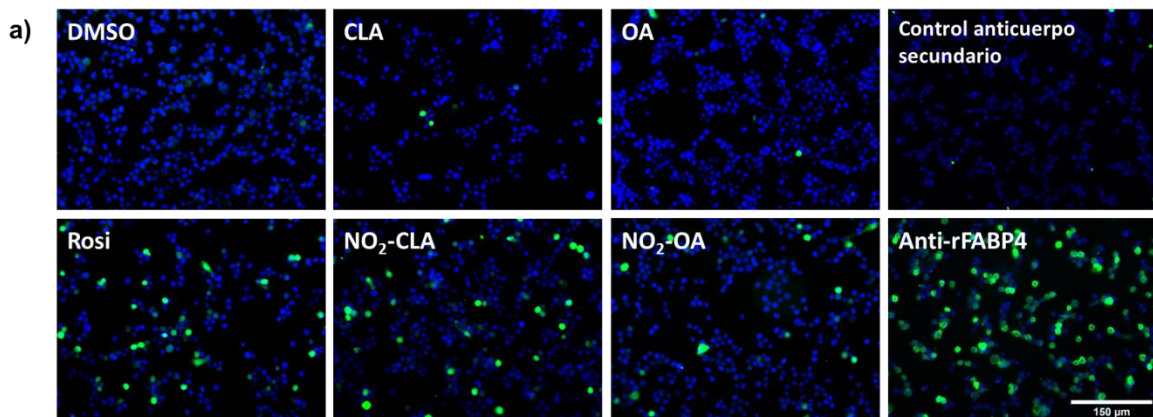


Figura 2.8a, paneles de la derecha). Además, se verificó que el tratamiento con Rosi y NO₂-FA pero no con los FA precursores aumentó significativamente el contenido de FABP4 (

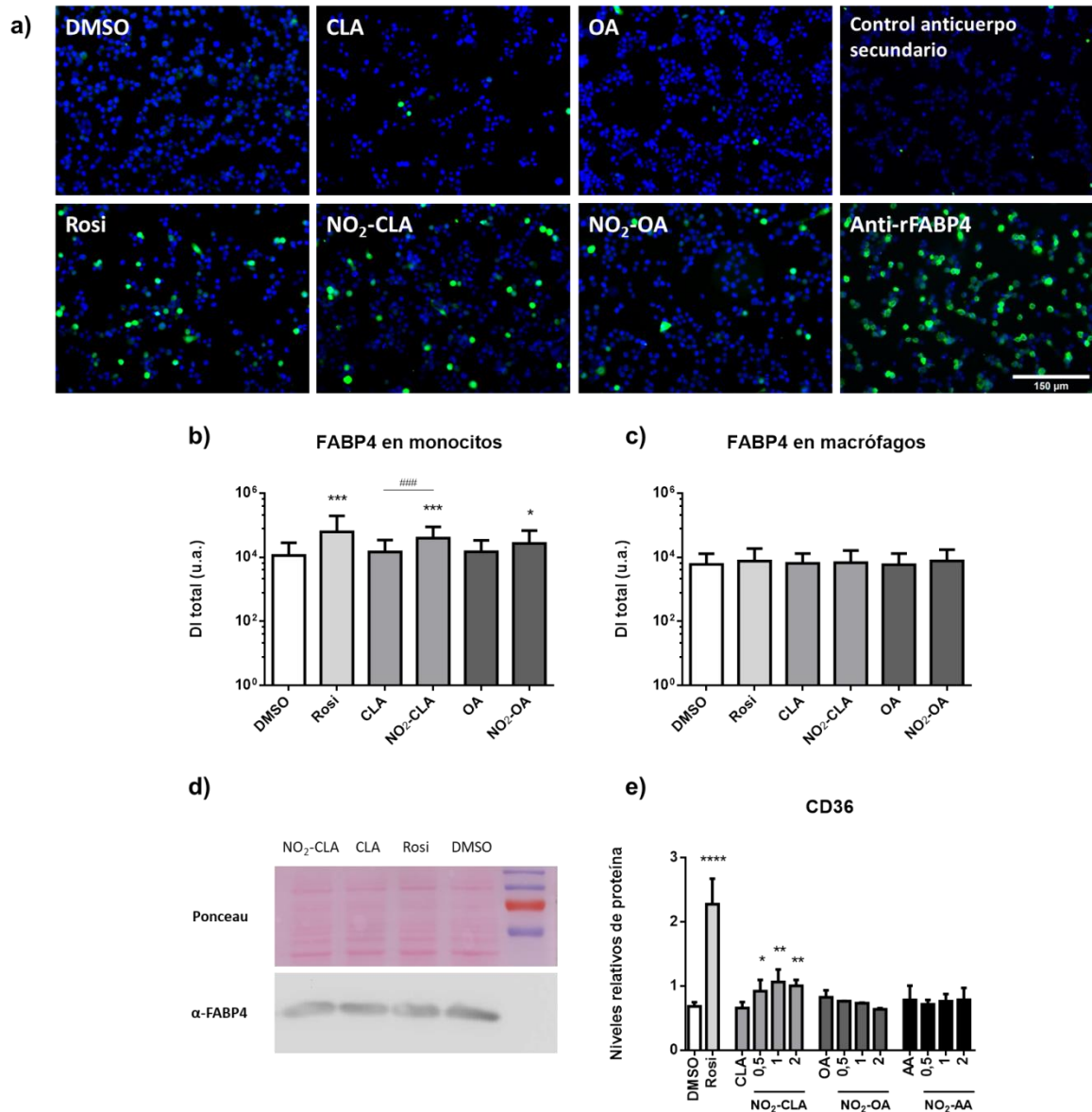


Figura 2.8a y b), evidenciado por un aumento en la señal del canal verde. Por otro lado, dada la similitud de secuencia y estructura que presentan la FABP4 y FABP5 (Figura 2.9), podría sospecharse que los anticuerpos de conejo anti-rFABP4 presentaran reactividad cruzada con la FABP5. Sin embargo, los resultados en monocitos en diferenciación indican que los NO₂-FA no inducen la expresión de FABP5 a nivel transcripcional (Figura 2.3b), por lo que se deduce que la señal detectada proviene de la FABP4. Por otro lado, en macrófagos no se registraron cambios en los niveles proteicos de FABP4 luego de los tratamientos con los NO₂-FA. Incluso el tratamiento con Rosi que había inducido significativamente la expresión del ARNm de FABP4 no alcanzó a

traducirse en un aumento en los niveles de proteína (

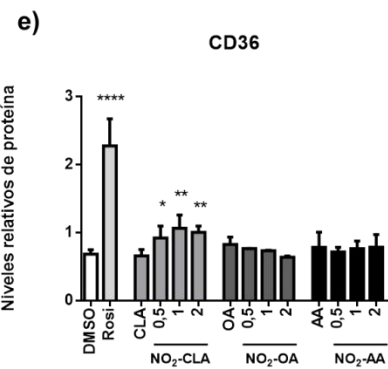
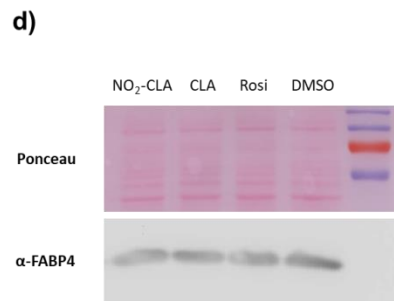
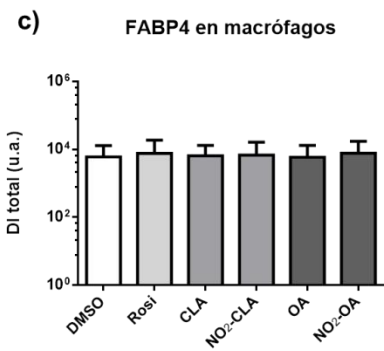
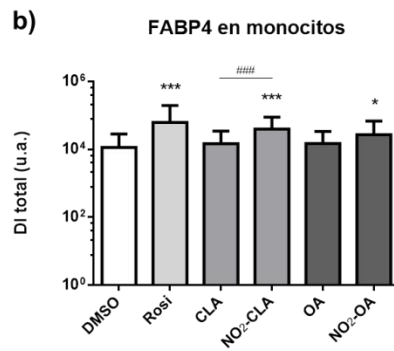
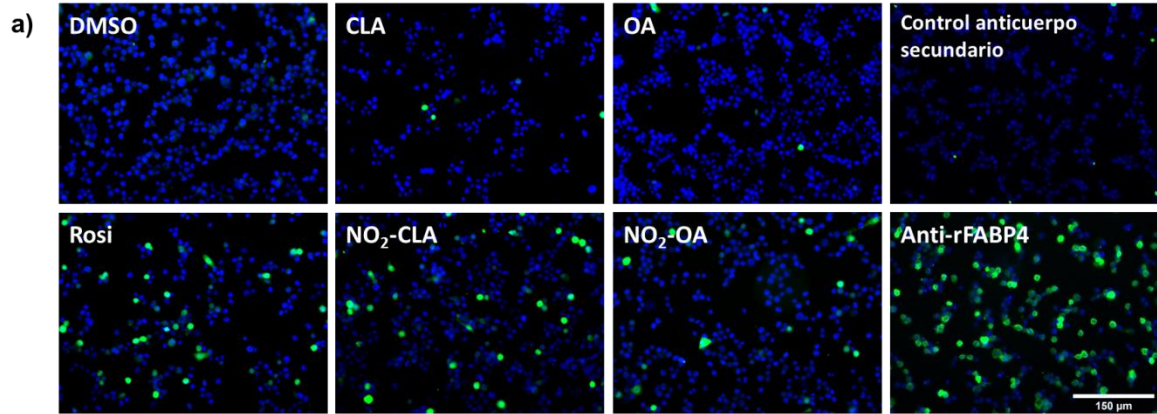


Figura 2.8c). Estos resultados coinciden con resultados obtenidos por Western blot (

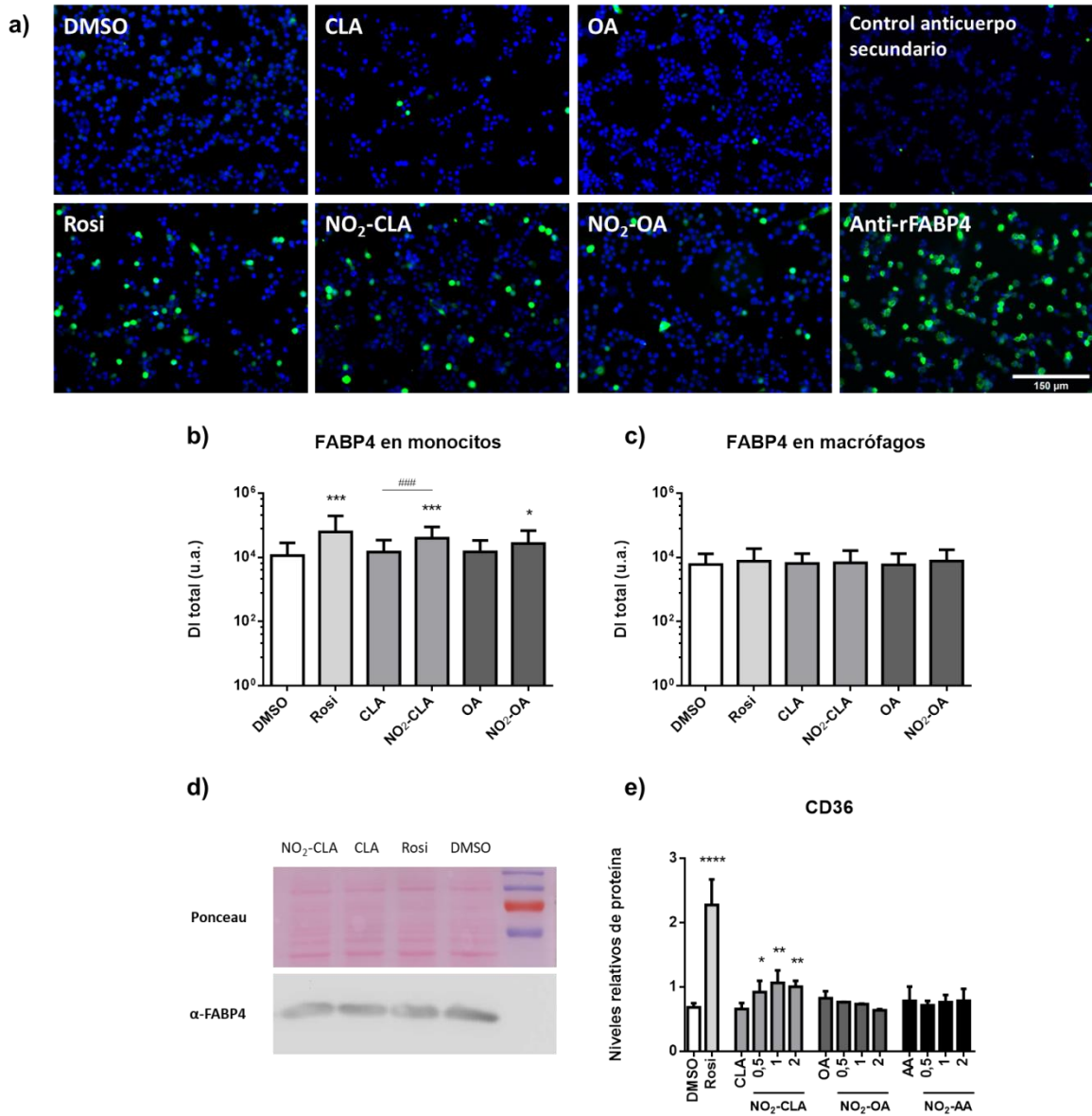


Figura 2.8d) donde se ve que en macrófagos el contenido basal de FABP4 correspondiente al grupo tratado con DMSO es alto. Estas observaciones sugieren la existencia de diferencias notorias en la activación de PPAR γ y/o en la regulación de la expresión de la FABP4 entre monocitos y macrófagos y evidencian que los NO₂-FAs ensayados son capaces de inducir un aumento en los niveles proteicos de FABP4 en monocitos en diferenciación, pero no así en macrófagos

En segundo lugar, se estudiaron los niveles de CD36 expresados en la membrana celular de monocitos en diferenciación por citometría de flujo, utilizando anticuerpos comerciales. Entre los

NO₂-FA testados, solo el NO₂-CLA logró aumentar significativamente el nivel de CD36 (

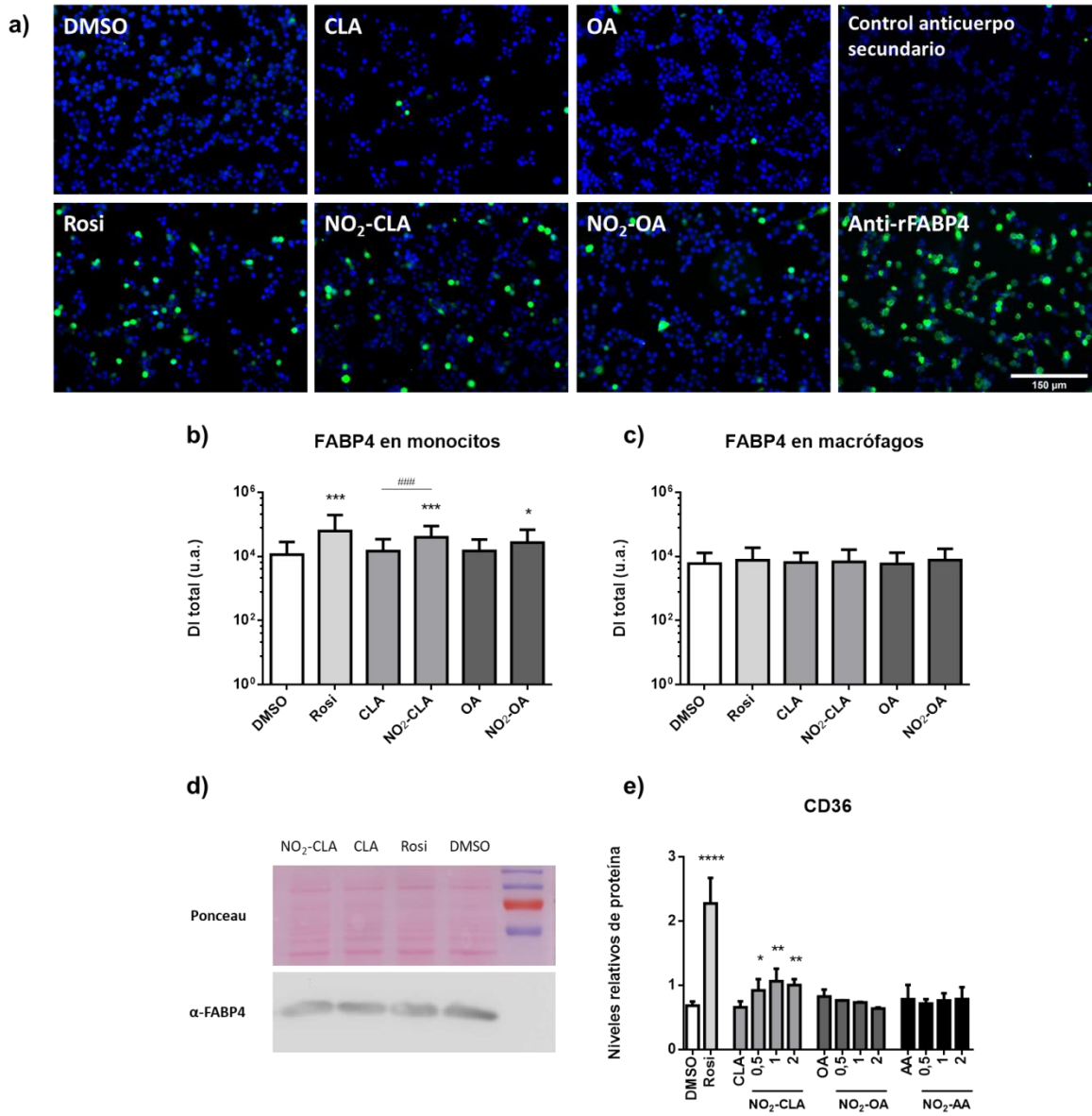


Figura 2.8e), siendo este aumento menor al inducido por Rosi (1 vs. 2.3 veces, respectivamente), de manera concordante con lo visto a nivel transcripcional.

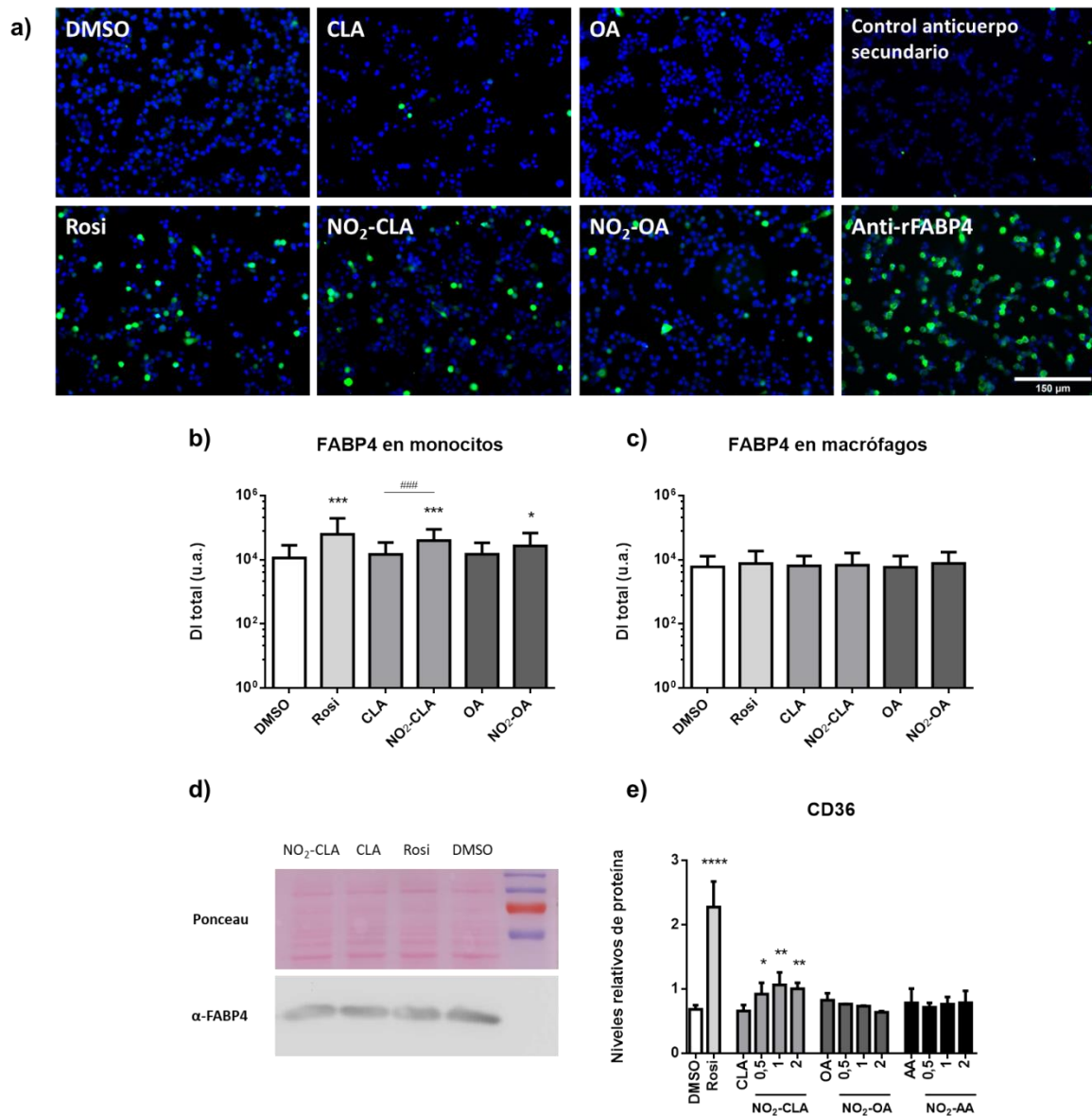


Figura 2.8: Los NO₂-FA indujeron un aumento en la síntesis proteica de FABP4 en monocitos en diferenciación, pero no en macrófagos

Monocitos en diferenciación THP-1 (**a**, **b**, **e**) y macrófagos THP-1 (**c** y **d**), obtenidos tras el tratamiento con PMA, se estimularon con 1 μM de Rosi, NO₂-FA o los correspondiente FA precursores. En paralelo las células se trataron con DMSO (vehículo) como control. Luego de 12 h de estimulación, las células fueron lavadas y teñidas usando anticuerpos de conejo anti-rFABP4 purificados por afinidad y anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a Alexa Fluor 488 para el revelado. Los paneles de la derecha resultan del tratamiento de monocitos en diferenciación con Rosi y se utilizaron como controles de la tinción. El panel superior derecho corresponde al control del conjugado, teñido en ausencia de anticuerpos anti-rFABP4. El panel inferior derecho se generó en paralelo y se tiñó del mismo modo que el resto de los paneles. Para todos los casos los núcleos se tiñeron con DAPI. Las células se observaron y contaron usando microscopía de epifluorescencia. Las imágenes se analizaron usando el software Image J. En (**a**), los paneles muestran imágenes representativas de monocitos en diferenciación luego de la estimulación con el tratamiento indicado o el control. Las gráficas en (**b**) y (**c**) corresponden a la cuantificación de los niveles de proteína FABP4 en monocitos en diferenciación o macrófagos, respectivamente. Las barras corresponden a la Densidad Integrada (DI, en unidades arbitrarias) de al menos 70 células por tratamiento ± SD. Los * y # indican diferencias estadísticamente significativas comparado con el control con DMSO o su precursor no nitrado, respectivamente (ANOVA de una vía, Test de Dunn de comparaciones múltiples */# $p < 0.05$, ***/### $p < 0.001$). En (**d**) se trataron macrófagos por 16 h con

Rosi, NO₂-FA o FA (1 μM). Finalizado el tiempo se lisaron las células y se analizó por SDS-PAGE y Western Blot el contenido de FABP4, utilizando un suero hiper inmune anti-rFABP4 (suero D357) y la tinción con rojo Ponceau como control de carga (d). En (e) monocitos en diferenciación se trataron por 16 h con Rosi y FA a 1 μM o NO₂-FA a las concentraciones indicadas. Finalizado el tiempo se recogieron las células y los niveles de CD36 se determinaron por citometría de flujo usando un anticuerpo IgM de ratón anti-CD36 humano y anti-IgM de ratón conjugado a ficoeritrina para el revelado. Los resultados se presentan como niveles relativos de proteína en relación al grupo Medio (no mostrado), y corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± SD. (*) Indica diferencias significativas comparado con el DMSO (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

a)

```

CAG33184.1 FABP4_HUMAN --MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRKRKVGMAKPNMIISVNGDVITIKSESTF 58
SP|Q01469| FABP5_HUMAN MATVQQLLEGRWRLVDSKGFDEYMKELGVGIALRKMGMAMAKPDCIITCDGKNLTIKTESTL 60
      :  : * *:**.*.**:****:***:* **:.****: **: :*. :****:***:
      :  : * *:**.*.**:****:***:* **:.****: **: :*. :****:***:

CAG33184.1 FABP4_HUMAN KNTEISFILGQEFDEVTADDRKVKSTITLDGGVLVHVQKWDGKSTTIKRKREDDKLVVEC 118
SP|Q01469| FABP5_HUMAN KTTQFSCITLGEKFEETADGRKTQTVCNFTDGLVQHQEWGKESTITRKLKDKGLVVEC 120
      *.:*: * **:.*:*.****.***.:. .: .*.**: *:****.:**.* :*.*****
      *.:*: * **:.*:*.****.***.:. .: .*.**: *:****.:**.* :*.*****

CAG33184.1 FABP4_HUMAN VMKGVSTSTRVYERA- 132
SP|Q01469| FABP5_HUMAN VMNNTCTRIYEKVE 135
      **:.*.**:**:*:..
  
```

b)

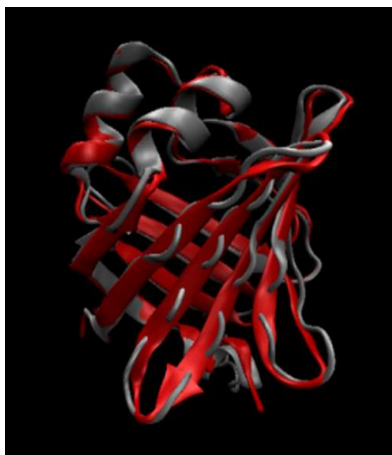


Figura 2.9: La FABP4 y FABP5 humana tienen un alto grado de similitud estructural

En (a) se muestra el alineamiento de las secuencias de FABP4 y FABP5 humanas, obtenido utilizando *CLUSTALO multiple sequence alignment* (sitio web <http://www.uniprot.org/align/>). El análisis muestra que ambas proteínas poseen 69 aminoácidos idénticos (indicados con *) y 40 aminoácidos similares (indicados con : o .), arrojando un porcentaje de identidad del 51.11%. En (b) se muestra el alineamiento estructural de las proteínas humanas FABP4 (en gris, 10.2210/pdb3RZY/pdb) y FABP5 (en rojo, 10.2210/pdb4LKP/pdb), creado usando el software VMD²³⁵.

2.3.4 Dependencia de la activación de PPAR γ en los efectos mediados por los NO₂-FA en monocitos en diferenciación

2.3.4.a Efecto de la inhibición de PPAR γ en la inducción de FABP4 y CD36

Considerando la robustez de los efectos de los NO₂-FA observados en los monocitos en diferenciación tanto a nivel transcripcional como a nivel proteico, los ensayos subsiguientes se realizaron en dichas células. Con el fin de evaluar si la inducción de *FABP4* y *CD36* mediada por los NO₂-FA era dependiente de la activación de PPAR γ , se realizaron experimentos similares a los descritos anteriormente pero en presencia de un inhibidor irreversible y específico de PPAR γ , el GW9662 (290 citas del artículo original en el que lo describieron^{26,43,215}). De este modo se comprobó que el GW9662, inhibió de manera significativa la expresión de *FABP4* y *CD36* inducida por Rosi y los NO₂-FA (Figura 2.10a y b). Mientras que sobre los NO₂-FA en general la inhibición fue total, con excepción de la expresión de CD36 inducida por NO₂-CLA, Rosi presentó una actividad remanente incluso en presencia de GW9662. Asimismo, se observó la inhibición de la síntesis de FABP4 en lisados celulares analizados por Western blot (Figura 2.10c), donde se cuantificó una

reducción en los niveles de la proteína inducidos por Rosi (80% de inhibición) y por los NO₂-FA (entre 72 y 89%, Figura 2.10d) en presencia de GW9662. Teniendo en cuenta todos los resultados, se puede decir que los NO₂-FA fueron capaces de activar PPAR γ en monocitos en diferenciación. Además, la expresión de FABP4 y CD36, inducida por los NO₂-FA analizada tanto a nivel transcripcional como del producto proteico, fue siempre menor que la provocada por la Rosi, lo cual correlaciona con el hecho que el inhibidor GW9662 abolió por completo los efectos de los NO₂-FA pero no así los de Rosi. En conjunto, estos resultados apoyan estudios previos usando otros modelos celulares que sugirieron que los NO₂-FA se comportan como ligandos parciales de PPAR γ ²³⁶.

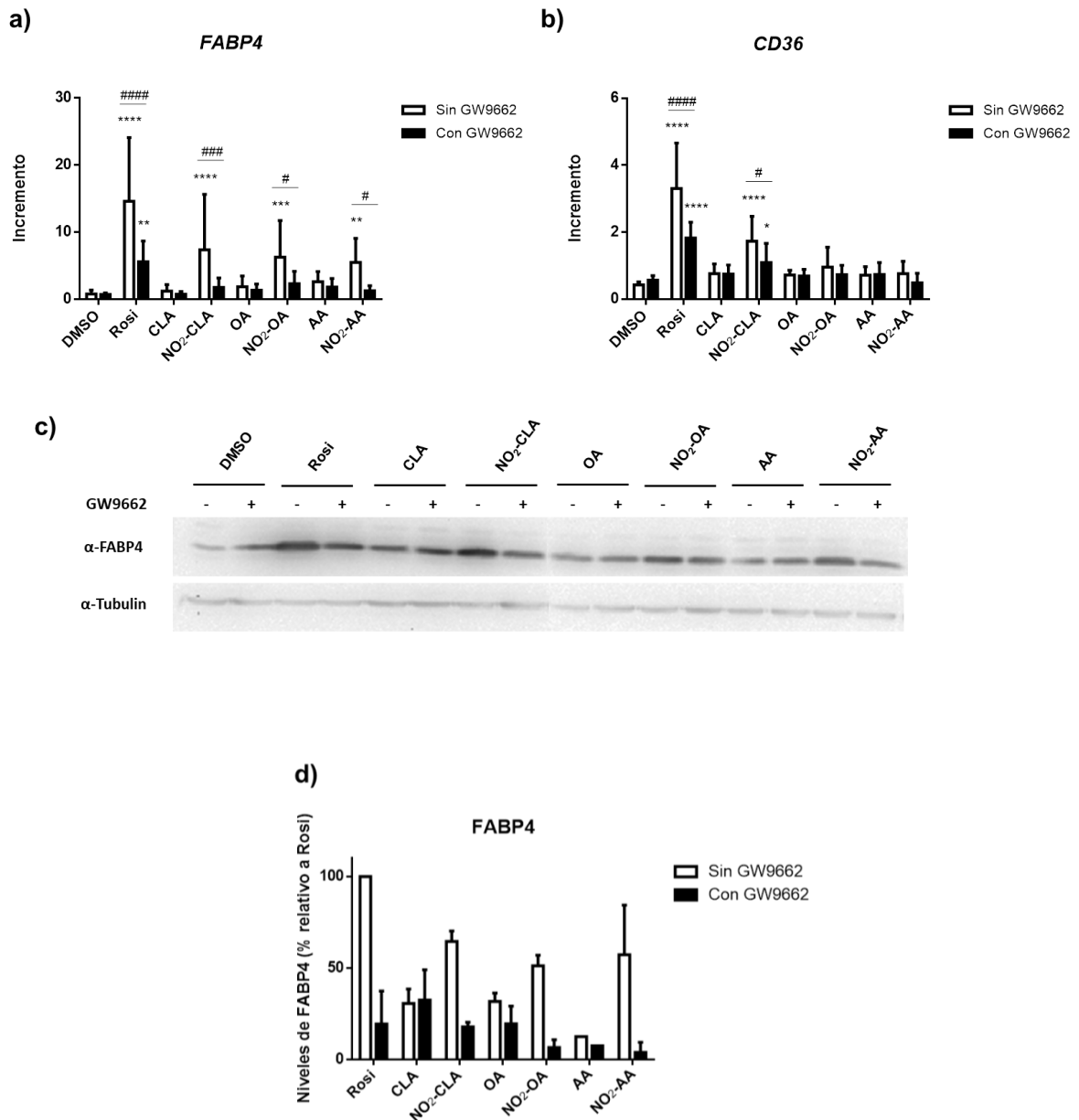


Figura 2.10: La inducción de la expresión de FABP4 y CD36 por los NO₂-FA es dependiente de PPAR γ .

Se trataron monocitos en diferenciación con el inhibidor específico de PPAR γ GW9662 (1 μ M) por 30 min y luego se cultivaron en presencia de una concentración 1 μ M de Rosi, NO₂-FA o sus FA precursores, o con DMSO como control del vehículo. Los niveles de ARNm de FABP4 y CD36 se midieron a las 6 h post-

estimulación por RT-qPCR tomando como gen constitutivo *GAPDH* para la normalización. Se representa el aumento en la expresión de *FABP4* (a) y *CD36* (b) en relación al grupo Medio (no mostrado); los valores corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm SD. (*) y (#) indican diferencias estadísticamente significativas con DMSO o con GW9662, respectivamente (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples */# $p < 0.05$, **/## $p < 0.01$, ***/### $p < 0.001$, ****/#### $p < 0.001$). Se evaluó el efecto de GW9662 (2.5 μ M) sobre el nivel de FABP4 por Western blot, usando tubulina como control de carga. Se muestra un resultado representativo del Western Blot (c) y los niveles de FABP4 relativos al contenido en las muestras tratadas con Rosi (100%), cuantificados por densitometría a partir de las bandas obtenidas y expresados como el promedio \pm SD de tres experimentos independientes (d).

2.3.5 Estudios *in vitro* e *in silico* de la interacción FABP4-NO₂-FA

Como se mencionó en la introducción, la FABP4 es la principal isoforma de la familia de las FABPs expresada en monocitos y macrófagos, y su principal función consiste en transportar los FA dentro de la célula. Por tanto, una hipótesis que surgió de los resultados obtenidos fue que la inducción de la FABP4 por los NO₂-FA influenciaría el transporte de los NO₂-FA dentro de la célula así como la señalización en monocitos y macrófagos. Hasta el momento no hay reportes sobre la interacción entre los NO₂-FA y la FABP4. Si bien los ácidos grasos insaturados se comportan como ligandos de la FABP4¹⁴⁰, no se puede descartar que la presencia del grupo nitro modifique de algún modo la interacción que se establece entre la FABP4 y el FA. Por lo tanto, en primer lugar nos planteamos examinar usando ensayos *in vitro* y herramientas *in silico* si los NO₂-FA pueden unirse a la FABP4.

2.3.5.a Estudio de la capacidad de los NO₂-FA de unirse a FABP

2.3.5.a.1 Análisis *in vitro* de la unión FABP4 - NO₂-FA

Para este estudio utilizamos como modelo la rFABP4 de ratón obtenida previamente (Figura 2.6), que como ya se comentó, presenta una gran similitud de secuencia y estructura con la FABP4 humana (Figura 2.5). En primer lugar estudiamos *in vitro* la posible unión de los NO₂-FA a la rFABP4, a partir de ensayos de desplazamiento de una sonda fluorescente hidrofóbica (ANS) previamente unida a la FABP4; se trabajó en condiciones de saturación de la proteína, aplicando una relación molar 1:3 rFABP4:ANS. El agregado de NO₂-FA a la rFABP4 cargada con ANS, produjo una disminución de la fluorescencia emitida por la sonda, reflejando el desplazamiento del ANS desde el bolsillo hidrofóbico al medio acuoso. Las curvas de desplazamiento pudieron ajustarse al modelo de decaimiento hiperbólico, sugiriendo una estequiometría 1:1 rFABP4:NO₂-FA como se había reportado anteriormente^{127,237} y permitieron el cálculo de las constantes de disociación aparente (K_{dapp}). La comparación de las K_{dapp} reveló diferencias de afinidad entre los NO₂-FA. Mientras que NO₂-OA parece comportarse como un ligando de alta afinidad, NO₂-CLA y NO₂-AA mostraron ser ligandos débiles²²⁴, ya que en condiciones de saturación de la proteína desplazaron cerca del 84 %, 58 % y 46 % del ANS unido, respectivamente (

Figura 2.11). Esto se correlaciona directamente con el hecho de que el NO₂-OA mostró la menor K_{dapp} (Tabla 2.2, indicado con *). Por otro lado, de acuerdo con las K_{dapp} calculadas, la nitración del OA, CLA y AA causó una reducción en la afinidad por rFABP4 (Tabla 2.2, indicado con #).

Gracias a la colaboración establecida con el grupo de la Dra. Laura Coitiño (Laboratorio de Química Teórica Computacional, Facultad de Ciencias, UdelaR), se logró obtener información acerca de la energía libre de unión para cada complejo FABP4:NO₂-FA (resultados obtenidos por el Dr. Jenner Bonanata). Estos resultados mostraron un aumento de los valores de ΔG como consecuencia

de la nitración de los FA precursores, indicando una tendencia a la disminución de la afinidad de las especies nitradas por la proteína. Aunque estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística, la tendencia se observó para los tres NO₂-FA (Tabla 2.2). A pesar de estas variaciones, la nitración de la cadena hidrocarbonada no interfirió completamente con la unión de los FA a la rFABP4, sugiriendo que la FABP4 podría participar en el transporte intracelular de los NO₂-FA. De todos modos, la comparación de las K_{dapp} entre los distintos NO₂-FA y FA indica que en las células la unión de los NO₂-FA a la FABP4 dependerá de varios factores, incluyendo la concentración de la FABP4, de los NO₂-FA, y de otros FA y lípidos competidores presentes en el medio intracelular.

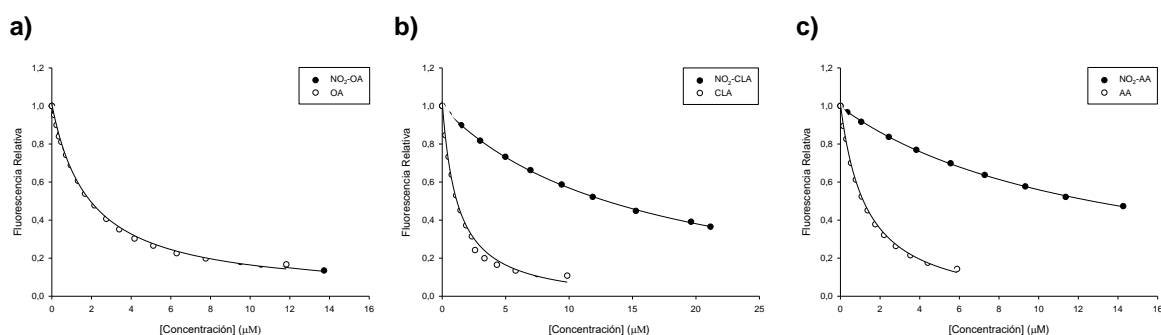


Figura 2.11: Los NO₂-FA desplazaron el ANS unido a la FABP4.

Se cargó la rFABP4 con la sonda fluorescente ANS y se agregó progresivamente el ligando de interés (FA o NO₂-FA), registrando el espectro de emisión del ANS luego de cada adición. El aumento en la concentración de FA o NO₂-FA produce una disminución en la intensidad de fluorescencia emitida por el ANS. Cada punto corresponde a la integral del espectro de emisión del ANS a la concentración de ligando indicada, y la línea representa el ajuste al modelo de decaimiento hiperbólico. Se muestra el desplazamiento del ANS inducido por los FA (círculos blancos) o los NO₂-FA (círculos negros) para OA/NO₂-OA (**a**), CLA/NO₂-CLA (**b**) y AA/NO₂-AA (**c**). Las curvas son representativas de tres experimentos independientes.

Tabla 2.2: K_{dapp} de los complejos 1:1 rFABP4:FA y rFABP4:NO₂-FA

<i>In vitro</i> (rFABP4)		
Ligando	K _{dapp} (μM) ^{a, b}	ΔG _{unión} (kcal mol ⁻¹) ^c
OA	0.59 ± 0.20	-8.49 ± 0.34
NO ₂ -OA	0.93 ± 0.16 [#]	-8.22 ± 0.17
CLA	0.28 ± 0.03	-8.90 ± 0.11
NO ₂ -CLA	3.03 ± 0.01 ^{****/#####}	-7.524 ± 0.003
AA	0.25 ± 0.02	-9.00 ± 0.08
NO ₂ -AA	3.02 ± 0.08 ^{****/#####}	-7.53 ± 0.03

^a Los valores corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± SD, determinados por desplazamiento del ANS con cada NO₂-FA o su correspondiente FA precursor. ^b El (#) y (*) indican diferencias significativas con respecto a su correspondiente FA precursor o NO₂-OA, respectivamente (ANOVA de una vía, Test de Tukey de comparaciones múltiples */# p<0.05, **/## p<0.01, ***/### p<0.001). ^c G_{unión} = -RTlnK_{dapp} a T = 298 K.

2.3.5.a.2 Análisis *in silico* de la unión FABP4 - NO₂-FA

Buscando complementar los resultados obtenidos *in vitro*, y profundizando en la colaboración con el grupo dirigido por la Dra. Laura Coitiño, se evaluó la interacción FABP4-NO₂-FA mediante dinámica molecular, utilizando como estructura de partida la cristalografía de la FABP4 de ratón unida a OA (PDB 1LID). En esta instancia se pudieron evaluar por separado los isómeros

posicionales 9-NO₂-OA y 10-NO₂-OA, así como el 9-NO₂-CLA y 12-NO₂-CLA, que forman parte de las mezclas utilizadas en los experimentos *in vitro*. En cambio no se estudiaron los isómeros del NO₂-AA debido a que son varios y no se caracterizó la composición de la mezcla utilizada, haciendo imposible prever cuál sería el isómero más relevante para este estudio. Los resultados mostraron que los complejos FABP4:NO₂-FA se mantuvieron termodinámicamente estables a lo largo de los 1.2 μ s de duración de la simulación, de manera similar a los complejos con los FA. Las energías libres extraídas de los cálculos MM/GB(PB)SA (Tabla 2.3), que se desprenden de la dinámica molecular, no mostraron cambios significativos entre la formación de complejos con NO₂-FA o con sus FA precursores, así como tampoco entre aquellos formados con distintos isómeros del mismo NO₂-FA. Todos los valores obtenidos se superponen al considerar los errores. Los resultados *in silico* indican que la nitración no compromete la unión de los NO₂-FA a la FABP4, apoyando la idea de que ésta sucede de manera similar a la unión a los FA.

Tabla 2.3: $\Delta G_{\text{unión}}$ de los complejos 1:1 rFABP4:FA y rFABP4:NO₂-FA

Ligando	<i>In silico</i> rFABP4 $\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal mol ⁻¹)	
	MMGBSA	MMPBSA
OA	-41 \pm 5	-41 \pm 9
9-NO ₂ -OA	-48 \pm 5	-49 \pm 8
10-NO ₂ -OA	-49 \pm 5	-49 \pm 9
CLA	-42 \pm 6	-44 \pm 7
9-NO ₂ -CLA	-49 \pm 5	-49 \pm 7
12-NO ₂ -CLA	-45 \pm 5	-46 \pm 8

2.3.5.b Estudio del efecto del glutatión sobre la unión FABP4 - NO₂-FA

Otro punto importante a considerar en la unión de los NO₂-FA a la FABP4, es que puede ser afectada por la aducción de los NO₂-FA a nucleófilos suaves presentes en el medio intracelular. El glutatión (GSH) es uno de los nucleófilos suaves más abundantes, que puede alcanzar concentraciones del orden mM en los compartimentos celulares (revisado por ^{238,239}). Para evaluar el efecto del GSH en la unión de los NO₂-FA a la FABP4 *in vitro*, realizamos experimentos similares a los descritos anteriormente pero en presencia de concentraciones crecientes de GSH desde 0.3 mM a 7 mM, correspondiéndose éste último con un valor próximo a las concentraciones máximas que podría alcanzar en el medio intracelular. En estos ensayos se trabajó únicamente con el NO₂-OA porque fue el ligando que mostró mayor afinidad entre los NO₂-FA testeados. Los resultados mostraron que a medida que aumentaron las concentraciones de GSH, el NO₂-OA disminuyó progresivamente su capacidad de competir con el ANS por la unión a la rFABP4, desplazando cantidades menores de ANS en comparación con el control sin GSH; concretamente a una concentración 10 μ M del NO₂-OA el desplazamiento disminuyó desde un 70 % a un 40 % en presencia de 7 mM de GSH, Figura 2.12a). Posteriormente, se repitió este análisis examinando el efecto de una única concentración de GSH (7 mM) sobre el desplazamiento del ANS mediado por la unión del NO₂-OA, y de ácidos grasos no electrófilicos como el OA y el ácido nitro esteárico (NO₂-SA). Los resultados mostraron que la presencia del GSH afectó en forma similar la capacidad de estos ácidos grasos de disociar la unión rFABP4-ANS, registrándose un descenso en el desplazamiento del ANS causado por concentraciones 10 μ M de NO₂-OA, OA y NO₂-SA de 80% a 30%, 90% a 50% y 60% a 30%, respectivamente (Figura 2.12b-d, líneas punteadas). Por lo tanto, los

estudios *in vitro* indican que los niveles fisiológicos más altos de GSH afectaron la interacción de la FABP4 con sus ligandos, tal vez por alguna modificación en la estructura de la proteína, que dificulte la entrada y/o salida de los ligandos al bolsillo hidrofóbico. Por otro lado, la menor capacidad del NO₂-OA de unirse a la FABP4 en presencia de GSH, no puede atribuirse sólo a la formación de aductos GSH-NO₂-OA incapaces de desplazar al ANS, ya que el GSH afectó también la unión del NO₂-SA, un nitrolípido no electrófilo incapaz de formar aductos con el GSH. Finalmente, el pobre desplazamiento del ANS inducido por el NO₂-OA a los niveles más altos de GSH, sugiere que en estas condiciones la capacidad de unión a la FABP4 del NO₂-OA, en su forma libre o aductado a GSH, se ve muy disminuida.

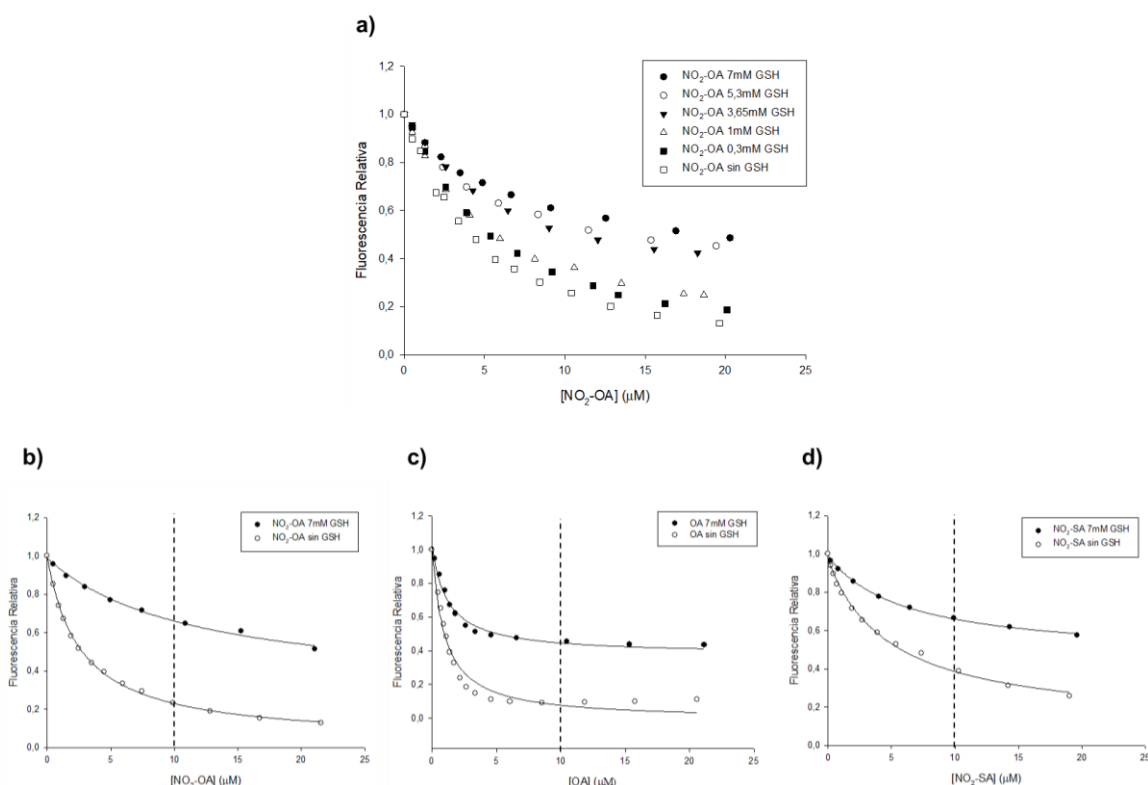


Figura 2.12: El GSH interfirió con la unión del NO₂-OA y de otros FA no electrófilos a la rFABP4

Se cargó la rFABP4 con la sonda fluorescente ANS en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de GSH (entre 0.3 y 7 mM). Los ligandos se agregaron en forma progresiva y se registró el espectro de emisión del ANS luego de cada adición. El aumento en la concentración del ligando, indujo una disminución en la intensidad de fluorescencia del ANS. Cada punto corresponde a la integral del espectro de emisión del ANS a la concentración de ligando indicada y la línea representa el ajuste al modelo de decaimiento hiperbólico. Se muestra el desplazamiento del ANS inducido por NO₂-OA a concentraciones variables de GSH (a) o el desplazamiento inducido por NO₂-OA (b), OA (c) o NO₂-SA (d) en presencia de una concentración 7 mM de GSH, donde la línea punteada indica la fluorescencia relativa alcanzada a 10 μM del ligando correspondiente. Las curvas son representativas de tres experimentos independientes.

2.3.5.c Análisis de la capacidad de los NO₂-FA de unirse a FABP1 y FABP2

Una vez comprobada la interacción entre los NO₂-FA y la rFABP4, surgió la interrogante de si estos lípidos podrían interactuar con otras isoformas de la familia de las FABPs. Es así que estudiamos la interacción de los NO₂-FA con la FABP1 principalmente expresada en hepatocitos y la FABP2 expresada en hepatocitos y enterocitos. La interacción de los NO₂-FA con estas isoformas cobra

mayor relevancia, cuando se piensa en los NO₂-FA como lípidos moduladores de la inflamación y del metabolismo lipídico, que podrían suministrarse exógenamente. En este contexto, resulta lógico cuestionarse si las FABPs podrían mediar su transporte, influenciando el destino de estos mediadores, tanto en el epitelio intestinal como en los hepatocitos. Los resultados obtenidos mostraron que la unión de los NO₂-FA a la FABP1 presentó una estequiometría 2:1, como era de esperar ya que la FABP1 presenta dos sitios de unión para el ligando²⁴⁰. Por esta razón el cálculo de las K_{dapp} difiere levemente del utilizado para FABP4, y se informa una K_{dapp Hill} que resulta del ajuste de la curva de desplazamiento del ANS al modelo sigmoidal de la ecuación de Hill. Por su parte la interacción con la FABP2 mostró una estequiometría 1:1. Analizando las constantes comprobamos que todos los NO₂-FA fueron capaces de unirse a FABP1 y FABP2, siendo el NO₂-OA el de mayor afinidad. El NO₂-CLA y NO₂-AA mostraron una afinidad significativamente menor que el NO₂-OA por la FABP2, mientras que sólo el NO₂-CLA mostró una reducción significativa de la afinidad al compararlo con el NO₂-OA en la FABP1. Nuevamente se observa que la nitración redujo de manera significativa la afinidad del CLA por ambas proteínas, así como la afinidad del AA únicamente por la FABP2 (Tabla 2.4, indicado con #). Por su parte la nitración del OA no indujo cambios significativos en la afinidad por la FABP1 o FABP2. Tomados en conjunto, estos resultados plantean también la posibilidad de que en hepatocitos y enterocitos, los NO₂-FA sean transportados por FABP1 y FABP2, de manera análoga a lo que sucedería en monocitos y macrófagos a través de la FABP4.

Tabla 2.4: K_{dapp} de los complejos 1:1 rFABP1/rFABP2:FA y rFABP1/rFABP2:NO₂-FA

Ligando	<i>In vitro</i> (rFABP1)	<i>In vitro</i> (rFABP2)
	K _{dapp Hill} (μM) ^{a, b, c}	K _{dapp} (μM) ^{a, b, d}
OA	0.15 ± 0.07	0.05 ± 0.01
NO ₂ -OA	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02
CLA	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.05
NO ₂ -CLA	0.33 ± 0.13 ^{**/#}	0.64 ± 0.10 ^{***/###}
AA	0.020 ± 0.002	0.021 ± 0.004
NO ₂ -AA	0.13 ± 0.02	0.47 ± 0.21 ^{**/#}

^a Los valores corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± SD, determinados por desplazamiento de ANS con cada NO₂-FA o su correspondiente FA precursor. ^b Los símbolos # y * indican diferencias significativas con respecto a su correspondiente FA precursor o NO₂-OA, respectivamente (ANOVA de una vía, Test de Tukey de comparaciones múltiples */# *p*<0.05, **/## *p*<0.01, ***/### *p*<0.001). ^c Las K_{dapp} fueron calculadas por ajuste de la curva al modelo sigmoidal de la ecuación de Hill de 4 parámetros. ^d Las K_{dapp} fueron calculadas por ajuste de la curva al modelo de decaimiento hiperbólico de 3 parámetros. Para los cálculos se utilizó la K_{dANS} informada previamente por²²⁵.

2.3.6 Estudio del efecto de los NO₂-FA sobre la localización celular de la FABP4

2.3.6.a Evaluación de la metodología basada en el fraccionamiento subcelular y Western blot para el análisis de la translocación de la FABP4 al núcleo

Se describió que agonistas sintéticos de PPARγ de la familia de las tiazolidinedionas inducen la translocación de FABP4 al núcleo en modelos celulares donde se expresó la FABP4 ectópicamente

^{116,118}. Resultó interesante examinar si la estimulación de monocitos humanos en diferenciación con los NO₂-FA provocó cambios en la localización celular de la FABP4 ya que se trata de una célula donde ambas proteínas son expresadas. Como primer abordaje se realizaron estudios mediante el fraccionamiento subcelular, buscando evaluar la distribución celular de la FABP4 en base a su cuantificación en las fracciones citosólica (FC) y nuclear (FN) por Western blot con los anticuerpos anti-rFABP4 obtenidos. Para el fraccionamiento subcelular se utilizó un gradiente de densidad siguiendo el procedimiento descrito por Poglitsch y colaboradores ²²¹. En primer lugar se ajustó la cantidad de células de partida necesaria para obtener una buena señal de la FABP4 en la FC. Este ajuste implicó una estimulación de las células (por 16 h) con el ligando fuerte de PPAR γ , Rosi, porque como ya se mostró, la FABP4 no se expresa en forma constitutiva en los monocitos humanos

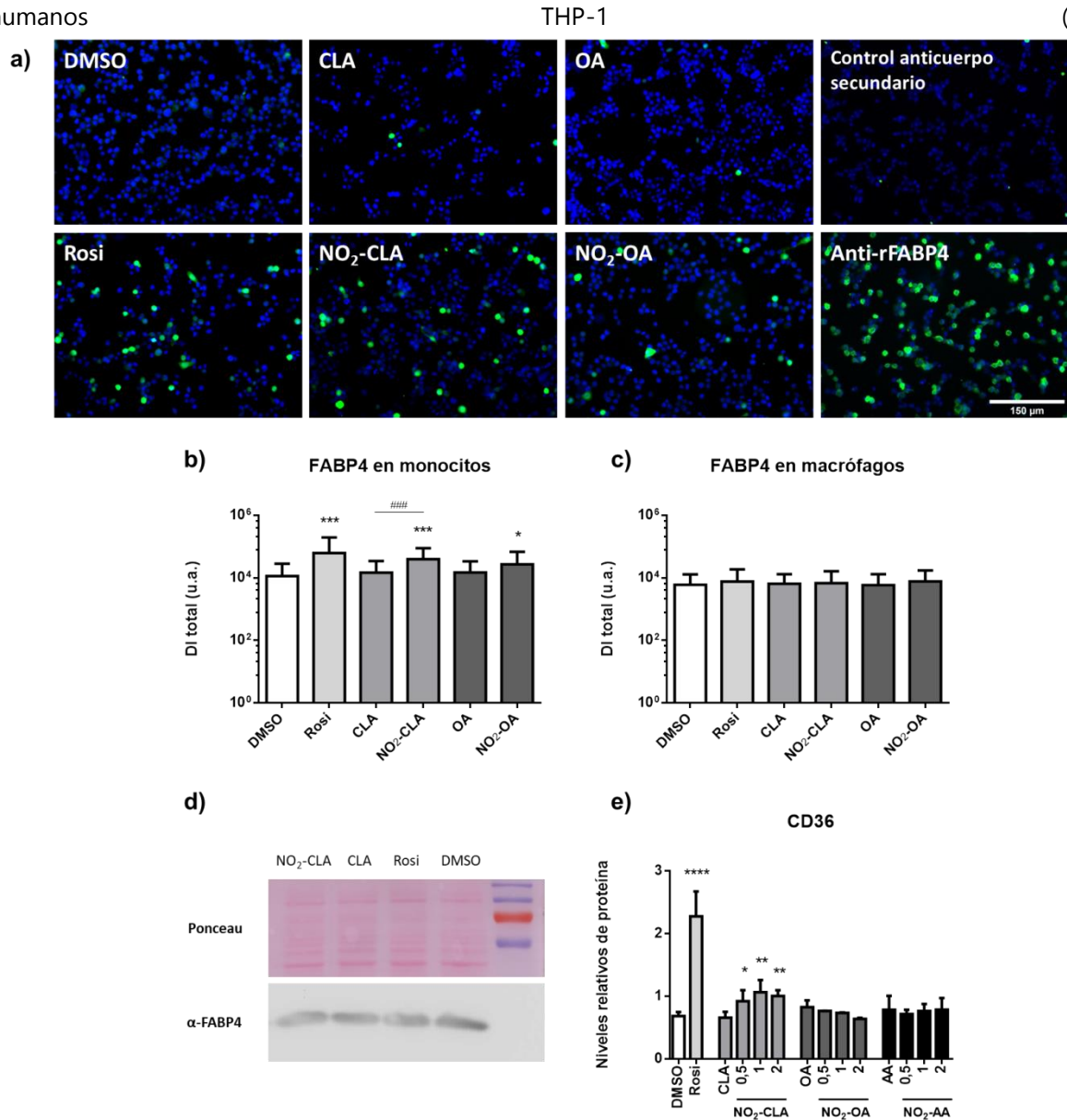


Figura 2.8). Además, en estos ensayos se probó realizar una re-estimulación con Rosi por 60 min, apuntando a que la movilización de la FABP4 es un evento que se da rápidamente y podría perderse luego de 16 h. Los resultados mostraron que en las condiciones experimentales utilizadas resultó necesario partir de al menos 1.5 millones de células para inducir la expresión y síntesis de

cantidades detectables de FABP4 en el FC. Sin embargo, en ninguna condición se logró detectar la FABP4 en la FN (Figura 2.13a). Dado que el tiempo de 60 min podría no ser el adecuado para detectar la movilización de la FABP4 al núcleo, se utilizó una única concentración de células (2 millones) y se ensayaron tiempos de 0, 15, 30, 60, 120, o 240 min. Nuevamente se observó que el tratamiento con Rosi aumentó los niveles de la FABP4 (Figura 2.13b), pero ésta se detectó únicamente en la FC. La calidad de las FC y FN se controló en base a la presencia de GAPDH e Histona H3, proteínas constitutivas del citosol y núcleo, respectivamente. La señal proveniente de la GAPDH permitió verificar su presencia en la FC y ausencia en la FN, sugiriendo que esta última se obtuvo con un buen grado de pureza (Figura 2.13a y b). En cambio, la Histona H3 se detectó, aunque como una banda tenue, en la FC, indicando cierto grado de contaminación de la FC con componentes nucleares (Figura 2.13a y b). En conjunto, los resultados no permitieron evidenciar movilización de la FABP4 al núcleo tras la estimulación de los monocitos en diferenciación con Rosi. Como en la práctica no resultó sencillo utilizar mayor número de células pensando en aumentar la sensibilidad del ensayo, y la pureza de la FC podría ser dudosa, se decidió cambiar el abordaje experimental.

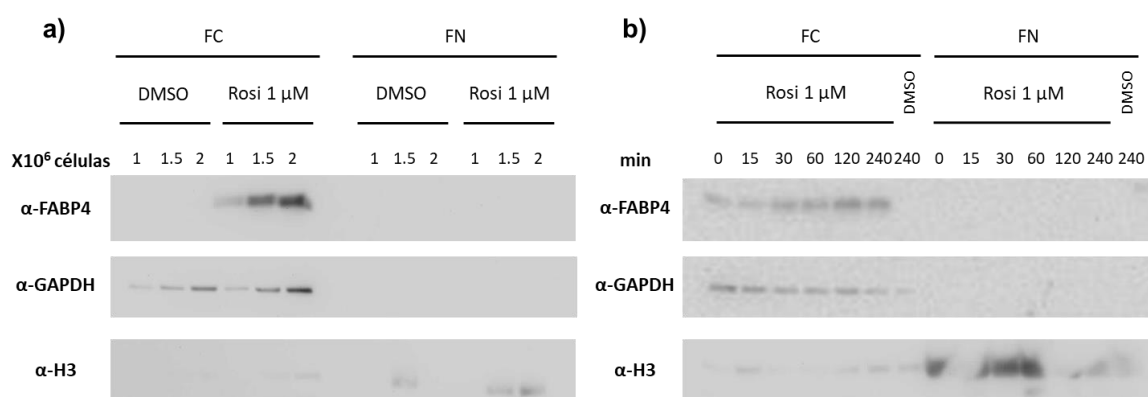


Figura 2.13: Evaluación de la translocación al núcleo de la FABP4 mediante fraccionamiento subcelular seguido de análisis por Western Blot.

Se obtuvieron monocitos en diferenciación THP-1 por tratamiento con PMA y al mismo tiempo se estimularon con Rosi 1 μM o DMSO como control por 16 h. Luego se re-estimularon con Rosi o DMSO y se purificaron las fracciones citosólica (FC) y nuclear (FN) mediante gradiente de densidad. Se muestra el análisis de las fracciones obtenidas por Western Blot utilizando anticuerpos anti-rFABP4, anti-GAPDH (proteína citosólica constitutiva), y anti-Histona H3 (proteína nuclear constitutiva). Para el Western Blot las muestras se analizaron por electroforesis desnaturalizante (tricina-SDS-PAGE, con geles de 10 % y 16.5 % para las porciones separadora y corredora, respectivamente) de las muestras. En **(a)** se partió de distinta cantidad de células: 1, 1.5 y 2 millones de células y se re-estimuló con Rosi por 60 min. En **(b)** se partió de 2 millones de células y se re-estimuló por 0, 15, 30, 60, 120, o 240 min con Rosi 1 μM, o con DMSO únicamente al tiempo 240 min.

2.3.6.b Aplicación de la microscopía confocal para el estudio de la translocación de la FABP4

Como ya se mencionó, existen varios trabajos que describen la capacidad de algunos agonistas de PPARγ de inducir la translocación de la FABP4 al núcleo; en estos trabajos el análisis se realizó por microscopía confocal y se usaron modelos celulares de expresión ectópica donde se sobreexpresó la FABP4¹⁶⁰ o la proteína fusionada a GFP^{118,120}. En particular, en estos últimos modelos, la unión a la GFP podría interferir en la habilidad de la FABP4 de difundir libremente a

través de la membrana nuclear^{116,118,120}, alterando el conjunto de eventos que se darían en condiciones fisiológicas. Para evitar esta interferencia, se realizaron estudios de inmunofluorescencia usando microscopía confocal y el anticuerpo anti-rFABP4 producido en el laboratorio. Siguiendo la misma lógica empleada para los estudios basados en el fraccionamiento subcelular, se buscó primero establecer el tiempo óptimo para analizar la translocación de la FABP4. Para ello se utilizaron monocitos en diferenciación a los que se les indujo un nivel detectable de FABP4 mediante la incubación por 10 h con NO₂-CLA y luego se los re-estimuló con el NO₂-FA por diferentes tiempos: 0, 30 y 240 min. En paralelo algunas células se trataron durante toda la noche con DMSO o CLA y se las re-estimuló con el mismo tratamiento únicamente por 240 min como control. Los resultados mostraron que la re-estimulación con NO₂-CLA por 240 min disminuyó la relación N/T-N de manera significativa (Figura 2.14a). Este efecto probablemente se debió al aumento de los niveles totales de FABP4 observados a 240 min (indicado con *, Figura 2.14b). Por otra parte, a los 30 min de re-estimulación no se observaron cambios en la relación N/T-N en comparación con el control, así como tampoco se detectaron alteraciones en los niveles totales de FABP4. Cabe destacar que se pudo evidenciar claramente niveles nucleares y citoplasmáticos comparables en la mayoría de las células, lo que contrasta con los resultados obtenidos por fraccionamiento subcelular, donde no fue posible detectar a la FABP4 en el núcleo, sugiriendo que nos encontrábamos por debajo del límite de sensibilidad de la técnica. Por otra parte, el resultado negativo obtenido por microscopía planteó la posibilidad de que la FABP4 permaneciera muy poco tiempo en el núcleo, existiendo un mayor tránsito pero que no se reflejara en acumulación de la proteína en dicho compartimiento celular. Buscando hacer evidente la translocación nuclear en caso que ocurra, se probó el tratamiento con un inhibidor de la exportación nuclear, Leptomomicina B (LMB)²⁴¹. Se observó que en presencia de LMB aumentó significativamente el contenido de FABP4 en el núcleo de los monocitos en diferenciación, lo cual se reflejó en valores mayores del cociente N/T-N (Figura 2.14c).

En función de los resultados previos consideramos adecuado estudiar la translocación luego de una re-estimulación corta de 30 min (que evite una alteración del contenido total de FABP4 en la célula por la estimulación con el NO₂-FA), pero utilizando un mayor rango de concentraciones de NO₂-FA y LMB. Además, este tiempo está de acuerdo con los protocolos usados en los trabajos citados anteriormente¹¹⁸. Los resultados mostraron que en todos los casos los niveles de FABP4 fueron variables en la población de monocitos en diferenciación, con células mostrando niveles indetectables y otras con muy alta expresión. En las células control que expresaron FABP4, la proteína se distribuyó en forma relativamente homogénea en toda la célula, con una relación núcleo citoplasma (N/T-N) cercana a 1 (Figura 2.15a). La re-estimulación con un rango de concentraciones entre 1 y 10 μM de Rosi, NO₂-FA o FA no modificó la distribución celular de la FABP4 en los monocitos en diferenciación, lo cual se reflejó en una relación invariable del cociente N/T-N luego del tratamiento con los ligandos (Figura 2.15b-g). A su vez, los niveles totales de FABP4 entre las células control y las tratadas fueron comparables, confirmando que a los 30 min la re-estimulación no aumentó los niveles de proteína, lo cual podría haber contribuido a aumentar la señal citoplasmática de FABP4 y enmascarado una posible translocación al núcleo (Figura 2.15h). Tomando estos datos en su conjunto concluimos que en las condiciones ensayadas no se pudo detectar aumento en la translocación de FABP4 al núcleo inducido por la estimulación con los NO₂-FA.

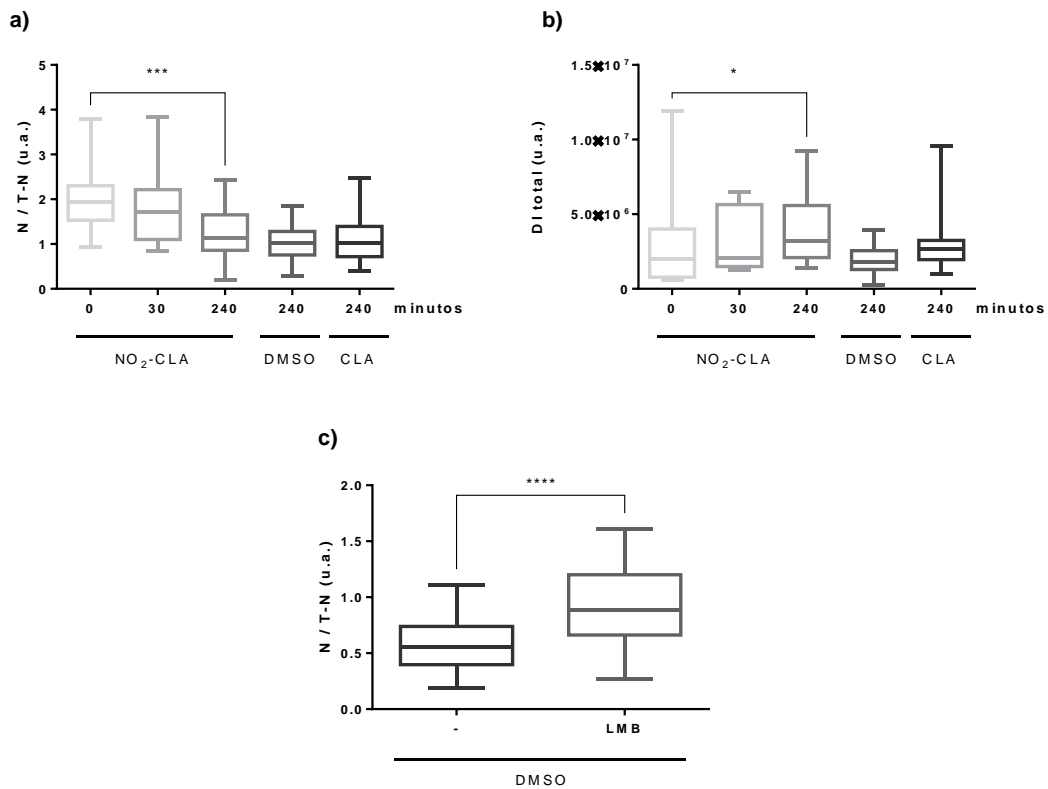


Figura 2.14: Análisis de la translocación nuclear de la FABP4 utilizando microscopía confocal: ajuste de las condiciones experimentales.

(a y b) Monocitos en diferenciación de la línea celular THP-1, obtenidos a partir del cultivo por 10 h con PMA y 1 μ M de NO₂-CLA, se re-estimularon con NO₂-CLA por diferentes tiempos: 0, 30 o 240 min. En paralelo se cultivaron y re-estimularon células control, utilizando 1 μ M CLA o DMSO (vehículo). Posteriormente las células se lavaron y tiñeron con anticuerpos de conejo anti-rFABP4 purificados por afinidad, y se reveló la reacción con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a Alexa Fluor 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las células se observaron usando microscopía confocal, y las imágenes se analizaron mediante el software Image J. **(c)** Se prepararon monocitos en diferenciación por tratamiento con PMA y 1 μ M de NO₂-CLA por 10 h. Previo a la re-estimulación se incubaron por 30 min con LMB (10 ng/ml) y se re-estimularon con DMSO por 30 min. Luego las células se trataron como se describió anteriormente. Se representan la distribución intracelular de la FABP4, como el cociente DI Nuclear/(DI Total-DI Nuclear) (N/T-N), expresado como la mediana \pm rango **(a y c)** y el contenido total de la FABP4 como el valor de DI total, expresado como la mediana \pm rango **(b)**. Los gráficos muestran los valores correspondientes a la cuantificación de al menos 15 células por condición.

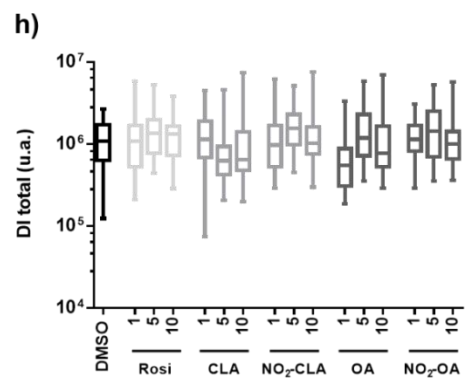
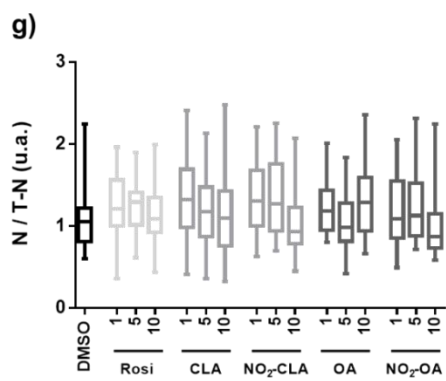
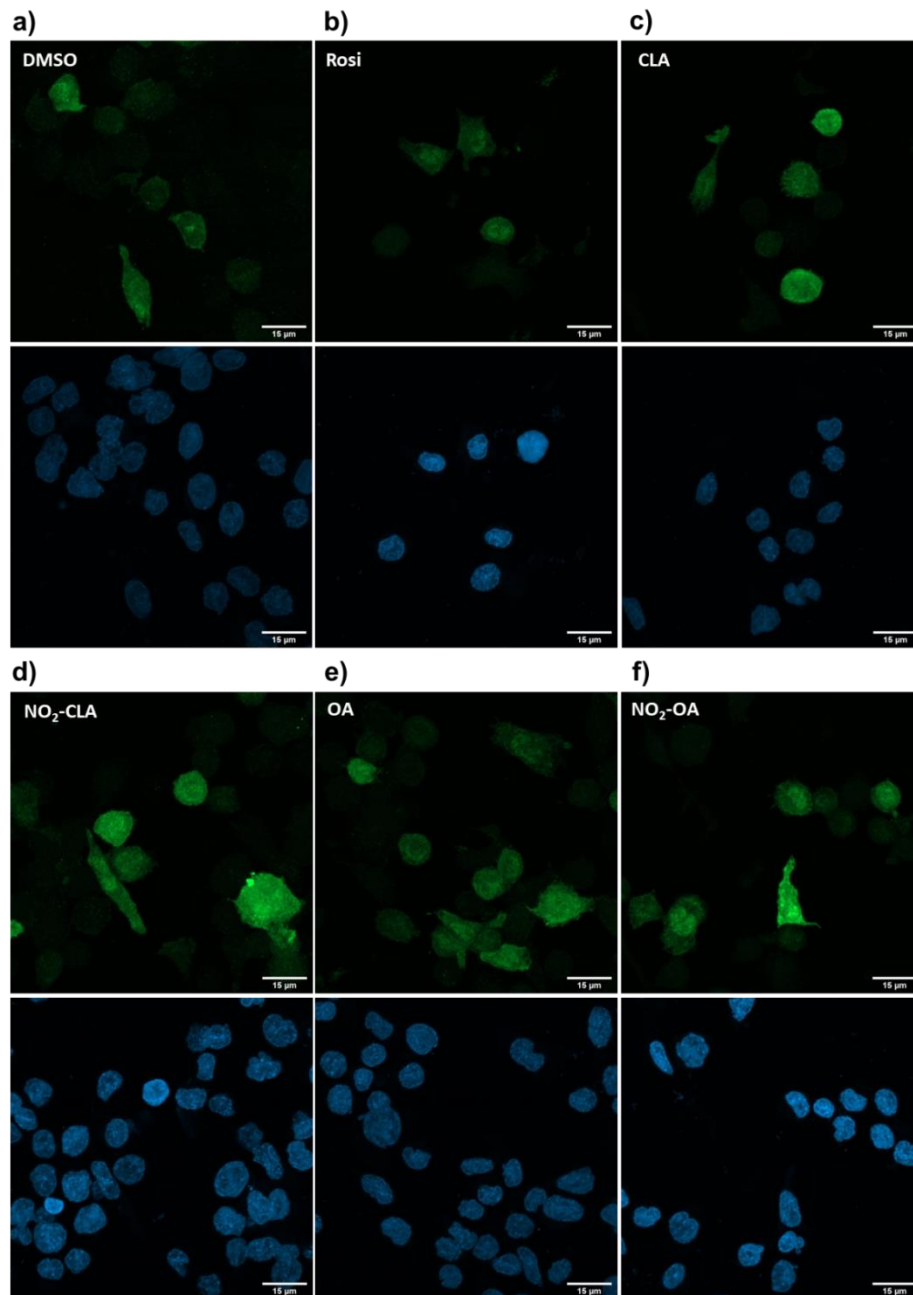


Figura 2.15: Los NO₂-FA no promueven la translocación de FABP4 al núcleo en monocitos en diferenciación

(a-h) Monocitos en diferenciación de la línea celular THP-1, obtenidos a partir del cultivo por 10 h con PMA y 1 μ M de NO₂-FA, se re-estimularon con Rosi, NO₂-FA o el FA precursor correspondiente en un rango de concentraciones de 1-10 μ M, en presencia de LMB (10 ng/ml). En paralelo, algunas células fueron re-estimuladas con DMSO (vehículo) como control. Luego de 30 min de re-estimulación, las células fueron lavadas y teñidas usando anticuerpos de conejo anti-rFABP4 purificados por afinidad y revelados con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados a Alexa Fluor 488. Los núcleos se teñieron con DAPI. Las células fueron adquiridas por microscopía confocal, y las imágenes se analizaron mediante el software Image J. Los paneles muestran imágenes representativas obtenidas a 63x de células tratadas con DMSO (a), Rosi (b), CLA (c), NO₂-CLA (d), OA (e) o NO₂-OA (f). Se representan la distribución intracelular de la FABP4, como el cociente DI Nuclear/(DI Total-DI Nuclear) (N/T-N), expresado como la mediana \pm rango (g) y el contenido total de la FABP4 como el valor de DI total, expresado como la mediana \pm rango (h) luego de 30 min de re-estimulación. Los gráficos muestran el rango de valores obtenidos correspondiente a la cuantificación de al menos 30 células por condición. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

2.3.7 Estudio de la exposición de la señal de localización nuclear de FABP4 inducida por la unión de NO₂-FA

Como se mencionó en la introducción, la FABP4 posee una señal de localización nuclear (SLN) no convencional, que se expone luego de la unión de un ligando activador y promueve su translocación al núcleo. La exposición de la SLN se da como consecuencia del movimiento de la Phe57 hacia su posición cerrada, quedando cercana a la Thr29, e induciendo en la FABP4 la llamada conformación de portal cerrado. Debido a que no fue posible detectar la translocación de FABP4 luego del tratamiento de las células con los NO₂-FA, decidimos estudiar por dinámica molecular en qué medida los NO₂-FA inducen la exposición de la SLN, evaluando el movimiento de la Phe57. Para este caso se pudo realizar el estudio por separado de los isómeros posicionales del NO₂-CLA y NO₂-OA, considerando que la posición del grupo nitro podría afectar la interacción con la FABP4. Se obtuvieron las distintas conformaciones adoptadas por los complejos FABP4:NO₂-FA a lo largo de las simulaciones y se midió la distancia entre la Phe57 y la Thr29, considerando como posición cerrada aquellas menores a 8.5 Å. Este análisis permitió calcular el porcentaje de moléculas que presentan la conformación cerrada dentro de la totalidad de conformaciones adoptadas por la FABP4 luego de la unión del ligando. Los resultados mostraron que en ausencia de ligando la población de moléculas presenta ambas conformaciones, abierta y cerrada, con la mayoría de las moléculas en la posición cerrada (76%, Tabla 2.5), lo que coincide con reportes anteriores²⁴², y con la presencia de FABP4 en el núcleo incluso en ausencia de ligando (Figura 2.15a). De manera similar todos los complejos FABP4:FA o FABP4:NO₂-FA visitaron ambas conformaciones, con alguna diferencia en los porcentajes correspondientes a la conformación cerrada. La unión de OA y CLA a la FABP4 promovió la redistribución de la población inicial, favoreciendo la posición cerrada que expone la SLN (87% y 91% respectivamente, Tabla 2.5). Por otra parte, la unión de los NO₂-FA mostró efectos disímiles. El 10-NO₂-OA, pero no el 9-NO₂-OA, aumentó la predominancia de la Phe57 en su posición cerrada, similar a lo observado para el OA. Por el contrario, la unión del 9- y 12-NO₂-CLA no aumentó la predominancia de la conformación cerrada, contrastando con el efecto mediado por el CLA y el 10-NO₂-OA. Globalmente estos resultados indican que los NO₂-FA no son mejores inductores de la conformación cerrada que sus FA precursores, lo que va en línea con los resultados de translocación nuclear obtenidos anteriormente.

Tabla 2.5: Peso relativo de la conformación cerrada (expresada en porcentaje) de los complejos FABP4:FA y FABP4:NO₂-FA durante simulaciones de dinámica molecular de 1.2 μ s.

Ligando	Complejos FABP4:ligando (1:1) Conformación cerrada (%) ^a
OA	87
9-NO ₂ -OA	71
10-NO ₂ -OA	87
CLA	91
9-NO ₂ -CLA	71
12-NO ₂ -CLA	66
Sin ligando	76

^a Resultados obtenidos por J. Bonanata, trabajo en colaboración con el Laboratorio de Química Computacional, Facultad de Ciencias, UdelAR

2.3.8 Estudio del papel de la FABP4 en la señalización mediada por los NO₂-FA

2.3.8.a Efectos de la inhibición de FABP4 sobre la activación de PPAR γ , Keap1/Nrf2 y HSF1 por NO₂-FA

Para evaluar la participación de la FABP4 en la señalización mediada por los NO₂-FA en monocitos en diferenciación se utilizaron dos inhibidores comerciales de FABP4, llamados BMS y HTS, los cuales poseen mayor afinidad por la proteína que los NO₂-FA^{164,216}. Los monocitos se diferenciaron en presencia de los inhibidores de FABP4, luego se estimularon con NO₂-FA o FA como control, y la expresión de *FABP4* y *CD36* se usó como indicador de la activación de PPAR γ . Es importante hacer notar que en las condiciones ensayadas los inhibidores no afectaron los niveles basales de FABP4 por microscopía de fluorescencia ni por PCR en tiempo real (Figura 2.16), lo que permitió una comparación directa entre las células con y sin inhibidor. Se observó que el tratamiento con BMS causó una reducción en la expresión de *FABP4* inducida por los NO₂-FA (cerca al 50 %) y abolió la inducción de *CD36* mediada por NO₂-CLA (Figura 2.17a y b, respectivamente). Estos resultados fueron reproducidos por HTS, que inhibió fuertemente la expresión de *FABP4* y *CD36* por los NO₂-FA (100 % de inhibición, Figura 2.17c y d). Posteriormente, se estudiaron los efectos de los inhibidores de FABP4 en la inducción de la expresión de *HMOX1*, *GCLM* y *HSP70* mediada por NO₂-FA. Los resultados mostraron que el tratamiento con BMS afectó de manera diferente a la señalización por NO₂-OA y NO₂-CLA. En el caso de NO₂-OA, se observó una inducción significativa de la expresión de *HMOX1* y *GCLM* que fue parcial o completamente inhibida por BMS, respectivamente (Figura 2.18a y b). En cambio, el NO₂-CLA por un lado indujo pobremente la expresión de *HMOX1*, pero no la de *GCLM*, y la presencia del BMS no inhibió los efectos sobre *HMOX1* e incluso favoreció la expresión de *GCLM* (Figura 2.18a). Por su parte, la habilidad de los NO₂-FA de activar la vía de HSF1 mostró que el NO₂-OA pero no el NO₂-CLA, aumentó la expresión de *HSP70*, que fue reducida significativamente por el tratamiento con BMS (Figura 2.18c). Curiosamente, cuando se estudiaron los efectos de HTS sobre los genes reporteros de las vías Keap1/Nrf2 y HSF1, se observaron aumentos significativos de los niveles de ARNm de los genes reporteros en todas las condiciones a causa del tratamiento con el inhibidor, lo que impidió hacer una comparación directa entre las células tratadas con HTS y las control. Sin embargo, al normalizar la expresión génica por los correspondientes valores basales se evidenció

una inhibición por el HTS de la activación de Keap1/Nrf2 inducida por los NO₂-FA, comparable a la provocada por BMS (Figura 2.19). De hecho, se observó que el tratamiento con HTS disminuyó considerablemente el efecto del NO₂-OA en la inducción de *HMOX1* y en menor medida el efecto mediado por el NO₂-CLA, mientras que anuló por completo la inducción de *GCLM* mediada por el NO₂-OA. En relación a la vía de HSF1, el tratamiento con HTS no alteró la expresión de *HSP70* inducida por NO₂-OA.

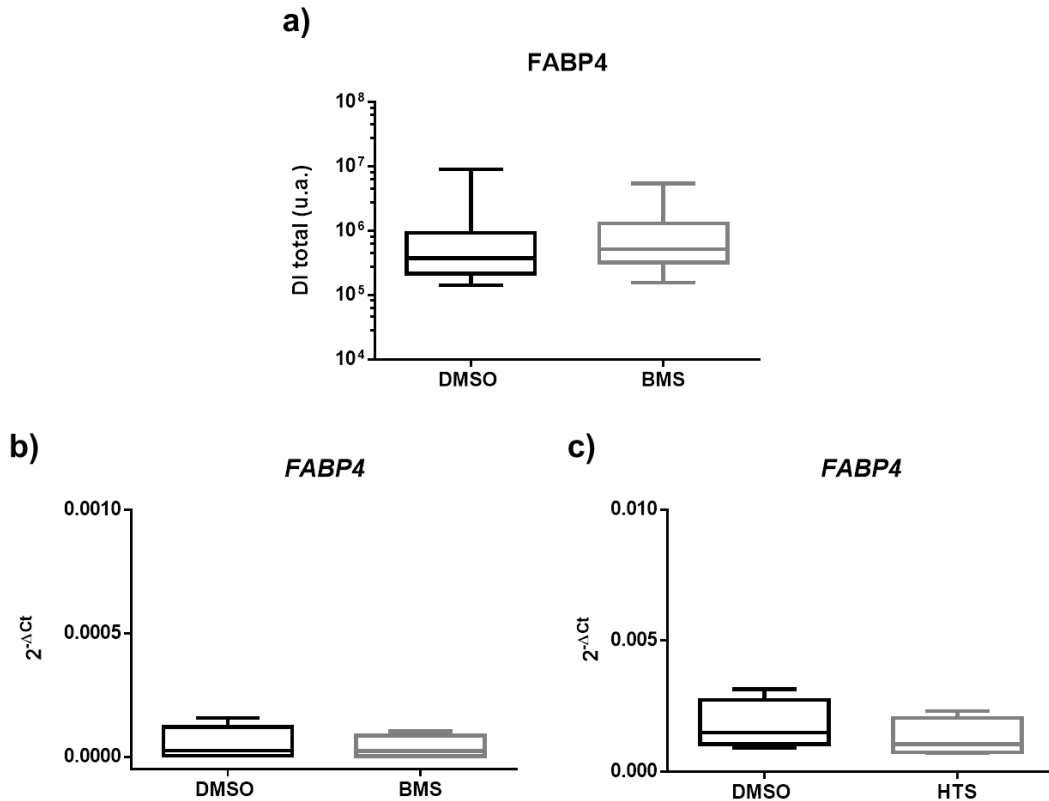


Figura 2.16: El tratamiento con BMS y HTS no modificó la expresión o síntesis de FABP4 comparado con la condición basal

(a) Análisis del nivel de FABP4 por inmunofluorescencia en monocitos diferenciados en presencia de los inhibidores sintéticos de FABP4. Se diferenciaron monocitos THP-1 con PMA y 1 μM de NO₂-FA por 10 h y luego se trataron con BMS (25 μM) o DMSO como control. Luego de 1.5 h, se agregó LMB (10 ng/ml) y se re-estimuló por 30 min con DMSO como control, posteriormente las células se lavaron y tiñeron usando anticuerpos anti-rFABP4 purificados por afinidad, y anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488 para el revelado. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las células se observaron por microscopía confocal y las imágenes se analizaron usando el software Image J. Los gráficos muestran el rango de valores obtenido de DI total correspondiente a la cuantificación de al menos 30 células por condición. (b y c) Análisis a nivel de la expresión de ARNm de *FABP4*. Se diferenciaron células THP-1 con PMA tal como se describió en a) en presencia de BMS (b) o HTS (c), utilizando DMSO como control. Se purificó el ARNm total y se midió la expresión de *FABP4* por PCR cuantitativa normalizándola contra el gen *18S* o *GAPDH*, respectivamente. Los gráficos representan los niveles de ARNm como 2^{-ΔCt} y corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes ± SD.

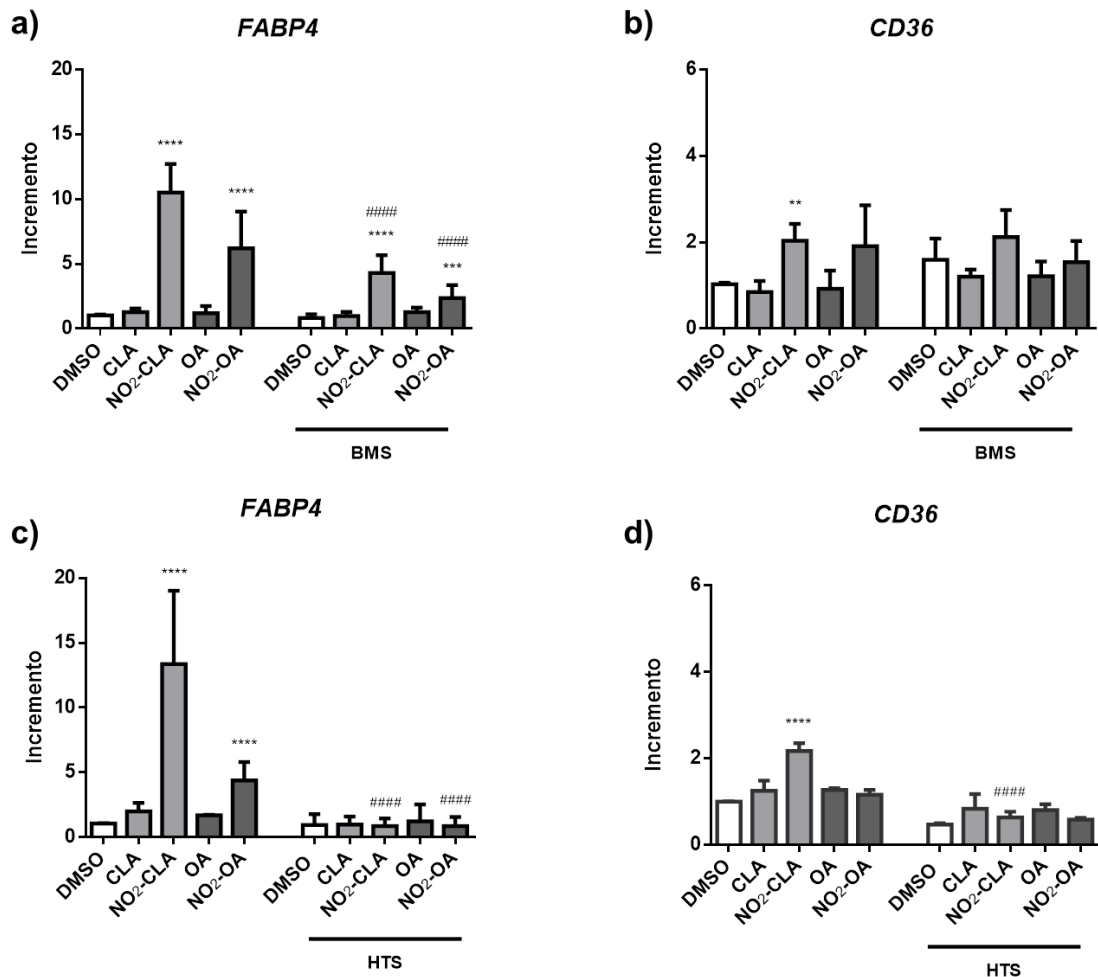


Figura 2.17: El bloqueo de la actividad de la FABP4 afectó la señalización de los NO₂-FA a través de PPAR γ en monocitos en diferenciación

Se diferenciaron células THP-1 con PMA en presencia de los inhibidores de la FABP4 BMS (25 μ M) o HTS (15 μ M), o de DMSO como control, por 2 h. Luego, se agregaron los FA (1 μ M), NO₂-FA (1 μ M) o DMSO por 6 h. Para estudiar la señalización inducida por los NO₂-FA, se purificó el ARNm total y la expresión de *FABP4* (a) y (c) o *CD36* (b) y (d) se midió por RT-qPCR. Los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo control DMSO y corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas con el control correspondiente DMSO o DMSO+BMS/DMSO+HTS, (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). (#) Indica diferencias estadísticamente significativas con el mismo tratamiento sin inhibidor (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$).

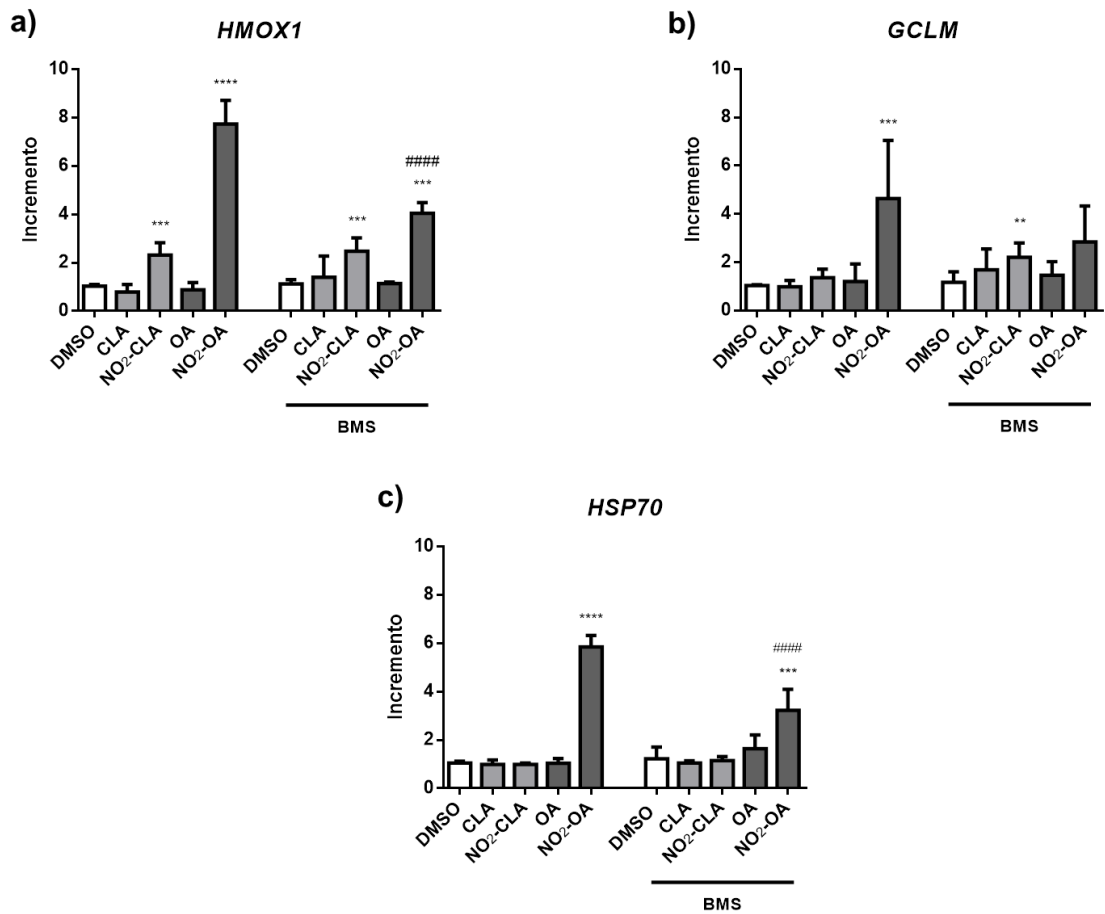


Figura 2.18: El bloqueo de la actividad de la FABP4 alteró la capacidad de los NO₂-FA de activar las vías de Keap1/Nrf2 y HSF1 en monocitos en diferenciación

Se diferenciaron células THP-1 con PMA en presencia del inhibidor de FABP4 BMS (25 μM) o DMSO (control) por 2 h. Luego, se agregaron por 6 h los FA (1 μM), NO₂-FA (1 μM) o DMSO como control. Para estudiar las acciones señalizadoras de los NO₂-FA, se purificó el ARNm total y la expresión de *HMOX1* (a), *GCLM* (b), o *HSP70* (c) se midió por RT-qPCR normalizando contra la expresión de *18S* como *housekeeping*. Los resultados se muestran como el incremento en el nivel de ARNm relativo al grupo DMSO y corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes ± SD. (*) Indica diferencias significativas con el control correspondiente DMSO o DMSO+BMS, (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$). (#) Indica diferencias significativas con el mismo tratamiento sin inhibidor (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.001$).

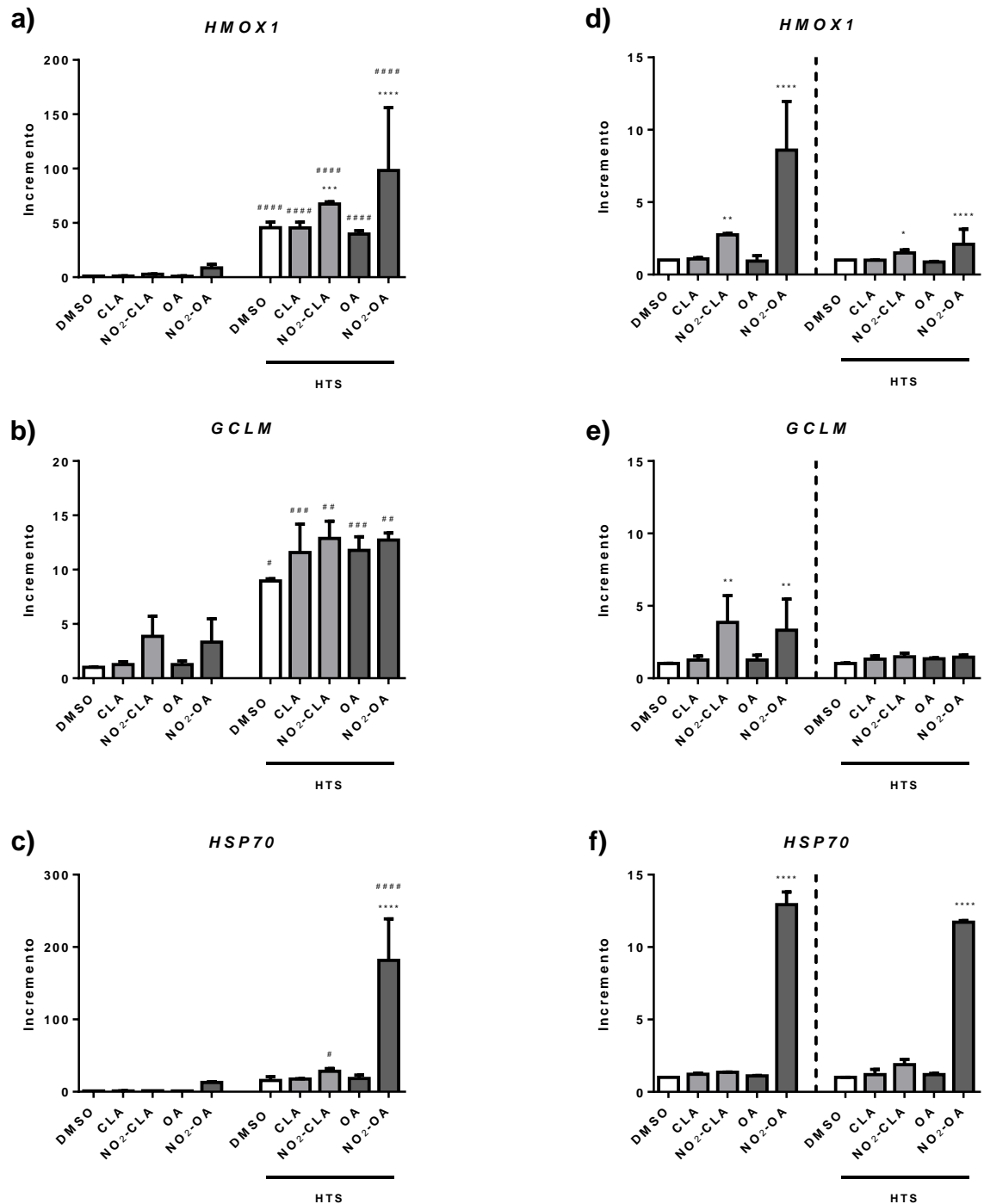


Figura 2.19: El bloqueo de la actividad de la FABP4 con HTS alteró la capacidad de los NO₂-FA de activar las vías de Keap1/Nrf2 y HSF1 en monocitos en diferenciación.

Células THP-1 fueron incubadas con el inhibidor de FABP4 HTS (15 μM) o DMSO (control) por 24 h. Se indujo la diferenciación a monocitos con PMA, y luego de 2 h se agregaron los FA (1 μM), NO₂-FA (1 μM) o DMSO por 6 h. Para estudiar las acciones señalizadoras de los NO₂-FA, se purificó el ARNm total y la expresión de *HMOX1* (a) y (d), *GCLM* (b) y (e) y *HSP70* (c) y (f) se midió por PCR en tiempo real normalizando contra la expresión de *GAPDH* como gen constitutivo. En (a-c) los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo DMSO. En (d-f) los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación a su control correspondiente DMSO o DMSO+HTS, (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$). (#) Indica diferencias

estadísticamente significativas con el mismo tratamiento sin inhibidor (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.001$).

2.3.9 Efectos de la inhibición de FABP4 sobre las respuestas anti-inflamatorias disparadas por NO₂-FA

Los NO₂-FA han sido postulados como mediadores anti-inflamatorios y sus efectos en relación a esta actividad se encuentran ampliamente descriptos en la literatura (¹³ y revisado por ²⁴³). Por otro lado, PPAR γ se ha reportado como un factor capaz de regular en cierto punto la respuesta inflamatoria. Dados estos antecedentes se decidió investigar en qué medida la activación de PPAR γ y la actividad de la FABP4 participan de efectos anti-inflamatorios de los NO₂-FA sobre los monocitos en diferenciación.

Estaba reportado que los NO₂-FA inhibieron la expresión de la metalo proteinasa 9 (MMP-9) ²⁰, una enzima necesaria para la remodelación de la matriz extracelular y la migración de células hacia el sitio dañado, que actúa en las primeras etapas de la inflamación pero que debe regularse para evitar un daño excesivo en el tejido. Utilizando THP-1, los autores comprobaron que la activación con PMA indujo la expresión de MMP-9 la cual fue inhibida por el tratamiento con los NO₂-FA, por un mecanismo dependiente de PPAR γ ²⁰. Lamentablemente, en las condiciones de nuestros ensayos en donde previamente comprobamos que los NO₂-FA activaron a PPAR γ evidenciado por el aumento de FABP4, no logramos ver la inducción de la MMP-9 por el PMA, lo que imposibilitó explorar el efecto modulador de los NO₂-FA y la FABP4 sobre la expresión de esta enzima.

Por otra parte, dado que existen numerosos antecedentes sobre las acciones anti-inflamatorias de los NO₂-FA, se quiso explorar la relevancia de FABP4 y PPAR γ en estos efectos, para lo cual se estudió la expresión de dos citoquinas pro-inflamatorias, *MCP1* e *IL1B*, en presencia o ausencia de BMS y GW9662, en monocitos en diferenciación luego del tratamiento con los NO₂-FA. En este sistema la expresión de citoquinas inflamatorias está desencadenada por el tratamiento con PMA, que induce en última instancia la activación de vías inflamatorias como NF- κ B ²⁴⁴. Los resultados mostraron que el NO₂-OA inhibió la expresión de los genes *MCP1* e *IL1B*, mientras que NO₂-CLA tuvo un efecto marginal sobre *MCP1* (Figura 2.20a y d). Además, el GW9662 revirtió levemente los efectos del NO₂-OA, lo que sugiere la participación de otra vía además de PPAR γ en estas acciones anti-inflamatorias (Figura 2.20c y f). Por su parte, el bloqueo de la FABP4 por BMS revirtió la inhibición mediada por NO₂-OA en *MCP1* e *IL1B* en un 87 % y 44 % respectivamente, y del NO₂-CLA en *MCP-1* por completo (Figura 2.20b y e). Estos resultados indican que el transporte mediado por la FABP4 es importante en los efectos anti-inflamatorios de los NO₂-FA, donde parece participar PPAR γ entre otras vías no exploradas en nuestros ensayos.

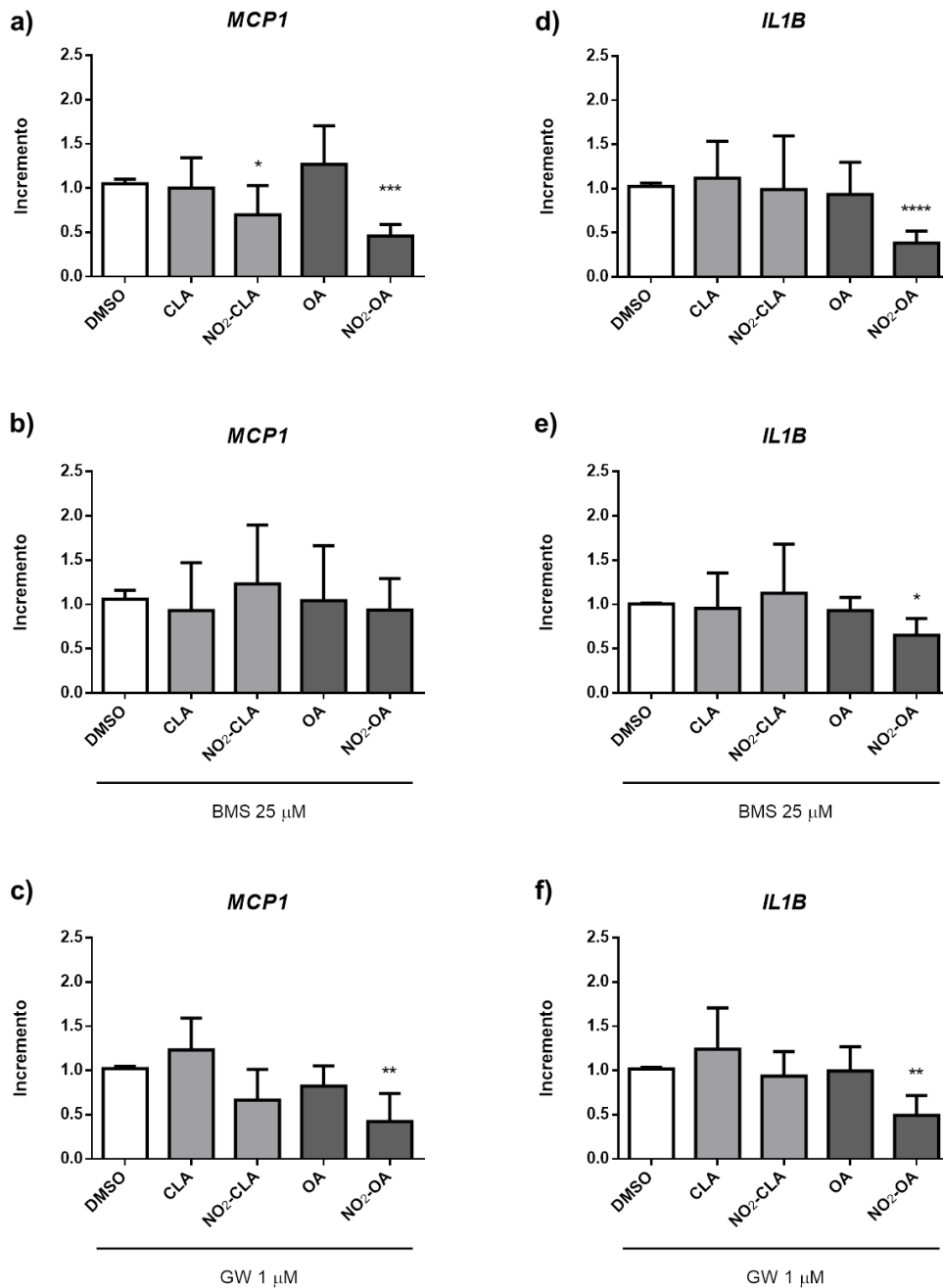


Figura 2.20: FABP4 participa en la modulación de la expresión de citoquinas por NO₂-FA

Monocitos en diferenciación se estimularon con 1 μ M de Rosi, NO₂-FA o su correspondiente FA precursor. En paralelo, se realizaron controles por incubación de las células con DMSO (vehículo). Luego de 6 h de estimulación, las células se homogeneizaron para obtener el ARNm total y los niveles de ARNm de *MCP1* e *IL1B* se determinaron por RT-qPCR y normalizaron contra el gen *GAPDH* (**a, c, d y f**) o *18S* (**b y e**). En los experimentos con BMS, las células se incubaron con dicho inhibidor (25 μ M) 2 h previo al tratamiento con NO₂-FA (**b**) y (**e**). En los experimentos con GW9662, las células se diferenciaron en presencia de GW9662 (1 μ M) por 30 min previo al tratamiento con NO₂-FA (**c**) y (**f**). La expresión de *MCP1* (**a-c**) e *IL1B* (**d-f**) se representa como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al control (DMSO), y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm SD. El (*) indica diferencias significativas con los tratamientos DMSO/DMSO+BMS/DMSO+GW9662 según corresponda (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$).

Capítulo 3

**Los NO₂-FA potencian la activación
alternativa de los macrófagos por
un mecanismo dependiente de la
FABP4**

3.1 Introducción

Existen múltiples reportes que muestran la capacidad de los NO₂-FA de inhibir la activación clásica de los macrófagos, pero poco se sabe acerca de sus efectos sobre la activación alternativa. Se postula que PPAR γ participa en la señalización inducida por la IL4 para la adquisición del fenotipo alternativo de los macrófagos^{163,204,206}. En el capítulo anterior demostramos que los NO₂-FA son capaces de activar PPAR γ en monocitos en diferenciación y en macrófagos humanos. Por lo tanto, resultó interesante estudiar sus efectos sobre la activación de los macrófagos inducida por IL4, explorando además el eventual papel de la FABP4.

Se consideró en primer lugar continuar los estudios en el modelo de monocitos humanos pero, lamentablemente, en nuestro grupo hemos tenido dificultades para inducir la diferenciación alternativa en la línea celular THP-1 con las citoquinas IL4 e IL13 (formas recombinantes comerciales). En ensayos de estimulación con dichas citoquinas la inducción de la expresión del receptor de manosa y de la arginasa 1 (medida en función de la actividad arginasa) fueron muy pobres o indetectables. Por tanto, dado que en el marco de esta tesis no resultó posible trabajar con concentrados de células sanguíneas humanas (*buffy coats*), que permitieran purificar monocitos en cantidad suficiente para estos ensayos, se decidió cambiar de modelo. Se optó por realizar estos estudios en células de ratón tomando ventaja de que en nuestro laboratorio se contaba con experiencia en el trabajo con macrófagos murinos, en particular aquellos derivados de progenitores de médula ósea (BMDM). Estas células se consideran un buen modelo de macrófagos derivados de la extravasación de monocitos sanguíneos, más que de macrófagos residentes. Teniendo en cuenta que la activación de PPAR γ resultó más notoria en monocitos en diferenciación que en macrófagos, administramos los NO₂-FA durante la diferenciación de precursores de médula ósea con M-CSF (BMDM condicionados). Además, expandimos los estudios utilizando macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato, que constituyen una población heterogénea de células en distintos momentos de su diferenciación a macrófago.

Para abordar el trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinar si el condicionamiento de los macrófagos con NO₂-FA durante su diferenciación a partir de progenitores de médula ósea (BMDM condicionados) modifica el fenotipo de los macrófagos obtenidos, particularmente a nivel de la expresión de la *Fabp4*.
- 2) Estudiar *in vitro* cómo responden los BMDM condicionados a la estimulación con LPS o IL4, y el eventual papel de la FABP4 en la modulación de los NO₂-FA sobre estas respuestas.
- 3) Estudiar la capacidad de los NO₂-FA de modular los efectos de IL4 *in vivo*, evaluando si contribuyen a la activación alternativa de los macrófagos.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Reactivos químicos

El origen de los reactivos químicos y biológicos que son comunes a los estudios descritos en el Capítulo 2 se describieron en dicho capítulo. Los reactivos bioquímicos específicos de los ensayos utilizados en este capítulo se detallan dentro de la descripción de las metodologías.

3.2.2 Animales de experimentación

Los ratones de la cepa Balb/c utilizados para la generación de BMDM condicionados se criaron en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos de Experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo. Los ratones de la cepa Balb/c, C57Bl/6 LysCre x PPAR γ ^{+/+}, LysCre x PPAR γ ^{+/-} y LysCre x PPAR γ ^{fllox/-} utilizados para generar macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato y realizar los experimentos de potenciación del fenotipo alternativo se adquirieron de la Unidad de Animales Ann Walker, School of Biological Sciences, University of Edinburgh. Todos los protocolos empleados obtuvieron la aprobación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, UdelaR) o del Servicio encargado de autorizar estos protocolos de la Universidad de Edimburgo.

3.2.3 Preparación de sobrenadante de cultivo de L929

Las células L929 (ATCC, EEUU) se cultivaron a 37 °C y en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ en medio DMEM (suplementado con 10 mM HEPES, 3.7 g/L bicarbonato de sodio, 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomicina y 250 ng/ml anfotericina B) conteniendo 10 % de suero bovino fetal (SFB, GIBCO, EEUU). Para expandir la línea, las células se subcultivaron cada vez que alcanzaron la confluencia. Para la producción del sobrenadante de L929 como fuente de M-CSF, se sembraron varios frascos de cultivo T75 en paralelo y cada 3 días se recuperó el sobrenadante y se agregó medio fresco. El sobrenadante, se centrifugó 5 min a 350 *g* para descartar restos celulares y la fracción soluble se conservó a -80°C. Se repitió este procedimiento hasta que comenzó a despegarse la monocapa de células. En ese punto, se mezclaron todos los sobrenadantes obtenidos, se filtraron con filtros de 0.22 μ m y se titularon. La titulación consistió en la producción de BMDM (ver más adelante) en presencia de distintos porcentajes de sobrenadante de L929: 5, 10, 15 o 20 %, con el fin de determinar la concentración óptima de uso como aquella que permitió obtener la mayor cantidad de BMDM (mayor rendimiento). Posteriormente, el sobrenadante se alicuotó y mantuvo a -80°C hasta su uso.

3.2.4 Preparación y estimulación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) condicionados con NO₂-FA

3.2.4.a Preparación de los BMDM condicionados

Se emplearon hembras de la cepa Balb/c (de 8 a 12 semanas). Los ratones se sacrificaron mediante el anestésico inhalatorio isoflurano (Cristalina). Se practicó una disección de sus patas para recuperar las tibias y los fémures. Los huesos se limpiaron con etanol 70 % (v/v) utilizando papel absorbente y se colocaron en una placa de Petri con medio DMEM bajo cámara de flujo laminar. Para extraer la médula ósea se cortaron las epífisis de los huesos y se perfundió el canal medular de cada hueso con 3 ml de medio DMEM, utilizando una jeringa estéril con aguja 24G. Se rompieron los agregados celulares mediante pipeteo suave y la suspensión obtenida se centrifugó

por 10 min a 350 *g* y 18 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 ml de DMEM para contarlas en cámara de Neubauer usando Trypan blue. Se plaquearon 0.3×10^6 células por pozo en placas de 24 pozos, en 1 ml de medio DMEM conteniendo 10 % (v/v) de SFB y 15% (v/v) de sobrenadante de cultivo de L929. Al mismo tiempo se estimularon con NO₂-FA, FA o Rosi a distintas concentraciones (1, 5 y 10 μM), utilizando DMSO como control. Al quinto día se realizó el cambio de medio y se volvieron a agregar los estímulos. Al séptimo día se lisaron las células y se preparó el ARNm para estudiar la expresión génica. Alternativamente se descartó el sobrenadante y los macrófagos se despegaron mecánicamente mediante pipeteo utilizando PBS conteniendo 3 mM EDTA y 0.1 % glucosa, para evaluar la presencia de marcadores de superficie por citometría de flujo.

Para los experimentos en donde se evaluó la activación de PPARγ en los BMDM condicionados, se prepararon las células como se describió anteriormente, pero se realizó una pre-incubación de 30 min con GW9662 (5 o 10 μM) previo al agregado de los NO₂-FA que se repitió en el quinto día al realizar el cambio de medio. Al séptimo día se lisaron las células y se preparó el ARNm para estudiar la expresión génica.

Para los experimentos en donde se evaluó el contenido de FABP4 por Western blot en los BMDM condicionados, los progenitores se sembraron a razón de 0.4×10^6 células por pozo, en placas de 24 pozos, conteniendo 1 ml de DMEM suplementado con 10 % SFB y 15 % sobrenadante de L929. Los días 0 y 5 las células se incubaron con GW9662 5 μM por 30 min previo al tratamiento con NO₂-FA, FA o Rosi (10 μM) o con el vehículo (DMSO) como control. Luego del séptimo día se lisaron las células utilizando un tampón de lisis hipotónico (ver más adelante).

3.2.4.b Ensayos de estimulación de BMDM condicionados

Para los experimentos de estimulación con LPS (Sigma) o IL4 (PeproTech), se condicionaron los BMDM como se describió anteriormente y al séptimo día se descartó el medio, se lavaron las células con medio sin SFB y se agregaron los estímulos en DMEM conteniendo 1 % SFB. En el caso del LPS, se utilizaron concentraciones 1, 10 o 100 ng/ml y la incubación se realizó por 3 h. En el caso de la IL4, se utilizaron concentraciones de 0.5 o 1 ng/ml y la incubación se realizó por 6 h. En ambos casos, al finalizar la estimulación se lisaron las células con Trizol para conservar los ARNm y estudiar la expresión génica.

Para el estudio de la actividad arginasa, la incubación con IL4 (1 o 10 ng/ml) se realizó en medio DMEM conteniendo 1 % de SF delipidado por 24 h y al finalizar el tiempo las células se lavaron, lisaron y conservaron -80 °C hasta su uso (ver más adelante).

3.2.5 Obtención y estimulación de macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato

3.2.5.a Obtención de macrófagos peritoneales

Se utilizaron hembras Balb/c de 8 semanas de edad. Al día 0 se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con 800 μl de medio tioglicolato estéril al 4 % (BD). Tres días después de la inyección, los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂ y se recuperaron las células reclutadas en el peritoneo, mediante dos lavados de 5 ml cada uno con RPMI suplementado con 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomina y 250 ng/ml anfotericina B. Las células se centrifugaron durante 5 min a 350 *g*, y luego de descartar el sobrenadante se contaron en un contador de células (Cellometer, Nexcelom Bioscience, USA) usando Trypan blue.

3.2.5.b Ensayos de estimulación de macrófagos peritoneales

Se sembraron 0.5×10^6 células por pozo, en placas de 24 pozos, conteniendo 1 ml de RPMI y se estimularon con NO_2 -FA o FA a distintas concentraciones 1, 2.5, 5 y 10 μM o con Rosi a 1 μM por 6 h. Se utilizó DMSO como control del vehículo. Para algunos experimentos se realizó en simultáneo una estimulación con IL4 0.5 ng/ml. Al finalizar el tiempo se lisaron las células y se preparó el ARNm para estudiar la expresión génica.

Los ensayos con células deficientes para PPAR γ , se realizaron con hembras C57Bl/6 LysCre x PPAR $\gamma^{+/+}$ (wt), LysCre x PPAR $\gamma^{+/-}$ (heterocigotas) y LysCre x PPAR $\gamma^{\text{fllox/-}}$ (deficientes) de entre 10-15 semanas. La obtención de macrófagos de tioglicolato y el sembrado en la placa de cultivo se realizó como se describió anteriormente. Las células fueron estimuladas con CLA o NO_2 -CLA a 2.5 μM u OA, NO_2 -OA o Rosi a 1 μM y se utilizó DMSO como control. La estimulación se hizo por incubación en ausencia o presencia de 0.5 o 5 ng/ml de IL4 durante 6 h. Al finalizar el tiempo se lisaron las células y se preparó el ARNm para estudiar la expresión génica.

3.2.6 Ensayos de evaluación del fenotipo alternativo en macrófagos peritoneales

Para el estudio del fenotipo alternativo en macrófagos peritoneales de ratones *naive*, hembras Balb/c de 8 semanas de edad se inyectaron por vía i.p. con una única dosis de IL4 complejo [IL4c, 1 μg de IL4 recombinante (Miltenyi) más 5 μg de anti-IL4, 11B11, BioXcell] en 100 μl de PBS. A continuación se les suministró por vía i.p. 0.035 μmoles de Rosi en 100 μl de PBS o DMSO como control. Los ratones se dividieron en dos grupos, unos se sacrificaron en cámara de CO_2 a las 24 h y otros a las 48 h post-inyección. Tres horas antes del sacrificio, todos los animales recibieron una dosis sub cutánea de 1 mg de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU, Sigma) en 100 μl de PBS. Luego de la eutanasia, se recuperaron las células de la cavidad peritoneal mediante dos lavados con 5 ml de RPMI suplementado. Se centrifugaron durante 5 min a 350 g , se contaron y se plaquearon 0.5×10^6 células por pozo en una placa de 96 pozos fondo en V para realizar la tinción de marcadores de superficie e intracelulares.

Para el estudio del fenotipo alternativo en macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato, hembras Balb/c de 6 semanas de edad fueron inyectadas por vía i.p. con 800 μl de medio tioglicolato estéril al 4 %. Luego de tres días todos los animales recibieron una única dosis de IL4c i.p. y a continuación se dividieron en cuatro grupos que recibieron por vía i.p. 0.175 μmoles de NO_2 -OA, OA o Rosi en 100 μl de PBS, o DMSO como control. 21 h después de la inyección de IL4c, los animales recibieron un pulso de BrdU y a las 24 h fueron sacrificados por cámara de CO_2 . Las células se recuperaron y procesaron como se explicó anteriormente.

3.2.7 Determinación de la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo

Las células en estudio se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo en V, en el entorno de 0.25 - 0.5×10^6 células por pozo, dependiendo del experimento. Todas las incubaciones se realizaron protegiendo las células de la luz y manteniéndolas en frío a no ser se indique lo contrario. Una vez distribuidas las células en la placa, se tiñeron con la sonda de viabilidad Live/Dead (Invitrogen) diluida en PBS, 10 μl p/pozo, durante 10 min a 25 °C. Se continuó con el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos, como ser los receptores Fc, mediante el agregado de suero

normal de rata 10 % en tampón FACS (PBS, BSA 0.1 %, EDTA 2 mM) 15 μ l p/pozo, durante 20 min. Sin descartar el sobrenadante, se realizó la tinción de marcadores de superficie, con los anticuerpos diluidos en FACS, 25 μ l p/pozo durante 30 min. Pasado el tiempo se lavaron las células dos veces con FACS. Cada lavado consistió en centrifugar las células 5 min a 350 *g*, descartar el sobrenadante, mezclar bien las suspensiones en un mezclador tipo vortex para disgregar el pellet de células, agregar 150 μ l por pozo del tampón de lavado y repetir el procedimiento. En algunos casos se realizó una segunda tinción de superficie, con anticuerpos conjugados a fluorocromos en 50 μ l de FACS durante 30 min y luego se lavaron las células. Para el caso de las BMDM condicionadas, se realizó únicamente tinción de marcadores de superficie, por lo que luego de los lavados las células se resuspendieron en 70 μ l de FACS para analizarlas en el citómetro de flujo.

En todos los experimentos las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) de ocho detectores. Cada muestra se tomó durante 1 min y se grabaron al menos 10000 eventos. El análisis posterior se realizó utilizando el software FlowJo v7.6 (TreeStar) y diseñando estrategias de selección particulares para cada tinción. En la mayoría de los ensayos, la expresión de cada marcador se informó relativa a su control denominado FMO (del inglés, *fluorescence minus one*). Este control se realiza en paralelo con la tinción de las muestras, y consiste en agregar todos los anticuerpos conjugados a fluorocromos empleados en el panel de tinción menos uno, de manera de poder medir la intensidad de fluorescencia basal que causa la combinación de los fluorocromos en un canal en particular. De este modo se fija el umbral de fluorescencia a partir del cual la señal de la muestra se considera positiva. En otros casos la expresión de los marcadores se informó relativa al control isotópico, que consiste en un anticuerpo del mismo isotipo y conjugado al mismo fluorocromo que el anticuerpo de interés, pero que reconoce un epítipo ausente en la muestra, de modo que la señal que emita corresponderá con interacciones inespecíficas y al igual que el FMO permite fijar el umbral de fluorescencia a partir del cual la señal de la muestra se considera positiva. Los resultados se informaron como el porcentaje de células positivas para el marcador en estudio, o el nivel de expresión del marcador en estudio representado como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia. Los gráficos se realizaron expresando el promedio \pm desvío estándar de experimentos independientes o individuos independientes según corresponda.

3.2.7.a Estrategia de selección de las poblaciones celulares hematopoyéticas obtenidas luego del condicionamiento de BMDM

En la Figura 3.1 se muestra la estrategia de selección utilizada para analizar la presencia de diferentes poblaciones hematopoyéticas en la preparación de células de médula ósea diferenciadas con M-CSF y condicionadas con los NO₂-FA o sus controles. En primer lugar, se seleccionaron aquellos eventos considerados células íntegras, dejando por fuera a los eventos de menor tamaño y granularidad que son usualmente desechos celulares (Figura 3.1a). Dentro de la región de células íntegras se seleccionaron las células vivas (Figura 3.1b) y luego los singuletes (Figura 3.1c, lo cual descarta aquellos eventos asociados a la señal generada por dos o más células que atraviesan a la vez el haz de luz). Luego, dentro de la región de singuletes se definieron las poblaciones de LB (CD19⁺) y LT (CD3⁺) y se seleccionó la población doble negativa (CD19⁻CD3⁻, Figura 3.1d). Posteriormente se definieron las células CD11b⁺ (Figura 3.1e) y dentro de éstas los neutrófilos (Ly6G⁺, Figura 3.1f). Cabe señalar que los monocitos y macrófagos se diferenciaron por la alta expresión en F4/80 y ausencia de Ly6C que presentan los macrófagos (F4/80^{alto}Ly6C⁻) y la expresión baja y variable de F4/80 y Ly6C en monocitos (F4/80^{bajo}Ly6C⁺) (Figura 3.1). Finalmente, cuando se

visualizaron los macrófagos seleccionados en un gráfico de puntos IF_{F4/80} vs FSC, se observó la presencia de dos grupos definidos de células que denominamos macrófagos grandes (F4/80⁺FSC^{alto}) y chicos (F4/80⁺FSC^{bajo}, Figura 3.1h).

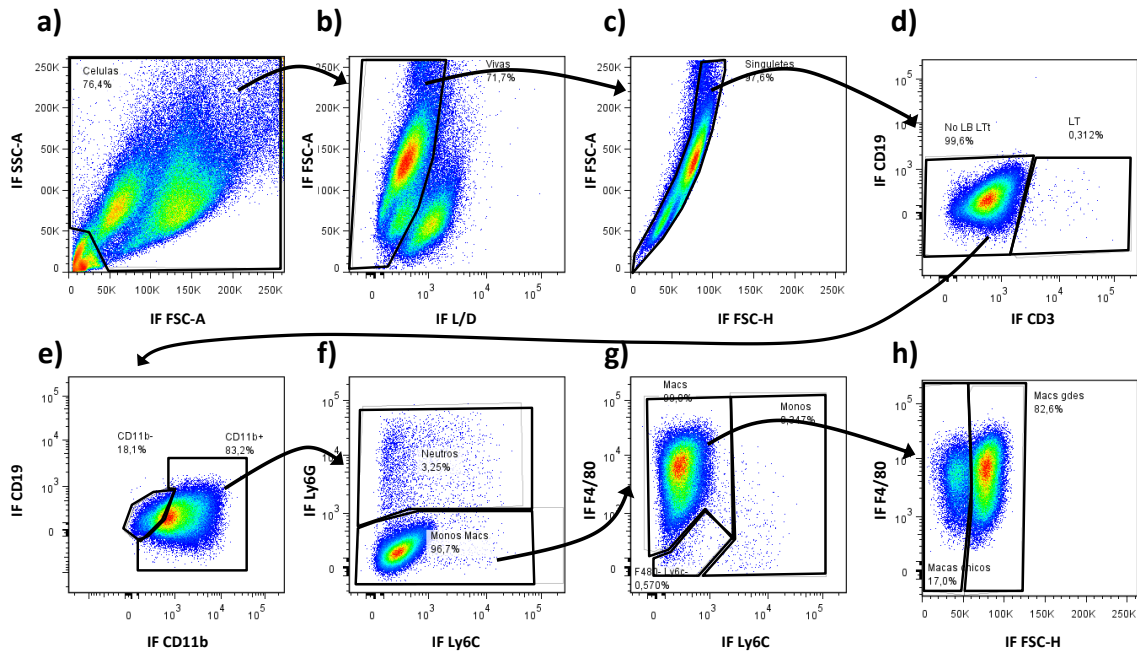


Figura 3.1: Estrategia de análisis y selección de las poblaciones celulares hematopoyéticas obtenidas al condicionar precursores de médula ósea durante su diferenciación

Los progenitores de médula ósea condicionados durante su diferenciación se tiñeron con anticuerpos específicos para diferentes marcadores fenotípicos conjugados a diferentes fluorocromos. Las células se analizaron por citometría de flujo y los datos obtenidos se procesaron con el software FlowJo. Se utilizaron gráficos de puntos donde se representan las dispersiones de la luz en la misma dirección que el haz láser (FSC, del inglés *forward scatter*) y a 90 grados de este haz (SSC, del inglés *side scatter*), y la intensidad de fluorescencia (IF) correspondiente a cada fluorocromo, indicando a qué marcador celular corresponde. Se muestra con flechas la secuencia de regiones que se fueron seleccionando en el análisis para identificar y separar las poblaciones de interés. De acuerdo con eso las regiones indicadas corresponden a células íntegras (a), células vivas (b), singuletes (c), células CD19⁺CD3⁻, que descartaría a los LB y LT maduros (d), células inflamatorias (CD11b⁺, panel e), neutrófilos (Ly6G⁺, panel f), macrófagos (F4/80^{alto}/Ly6C⁻, panel g), macrófagos grandes (F4/80⁺FSC^{alto}, panel h) y chicos (F4/80⁺FSC^{bajo}, panel h).

3.2.7.b Estrategia de selección para analizar los marcadores de superficie en las BMDM condicionadas

En la Figura 3.2 se muestra la estrategia de selección utilizada para analizar la presencia en membrana de marcadores de superficie en la preparación de células de médula ósea diferenciadas con M-CSF y condicionadas con los NO₂-FA o sus controles. En primer lugar, se seleccionaron aquellos eventos considerados células íntegras (Figura 3.2a). Dentro de la región de células íntegras se seleccionaron las células vivas (Figura 3.2b) y luego los singuletes (Figura 3.2c). Continuando, dentro de la región de singuletes se definieron dos poblaciones según su tamaño en el detector FSC-H, a las que llamamos células grandes y células chicas (Figura 3.2d). Posteriormente dentro de las células grandes se definieron las células F4/80⁺, para lo cual se utilizó el control FMO correspondiente, que permitió fijar el umbral a partir del cual la señal se consideró positiva (Figura

3.2e). El análisis del resto de los marcadores MHCII, CD36, CD80 y CD86 se realizó dentro de la población F4/80⁺ y se utilizaron como controles los FMO correspondientes en cada caso.

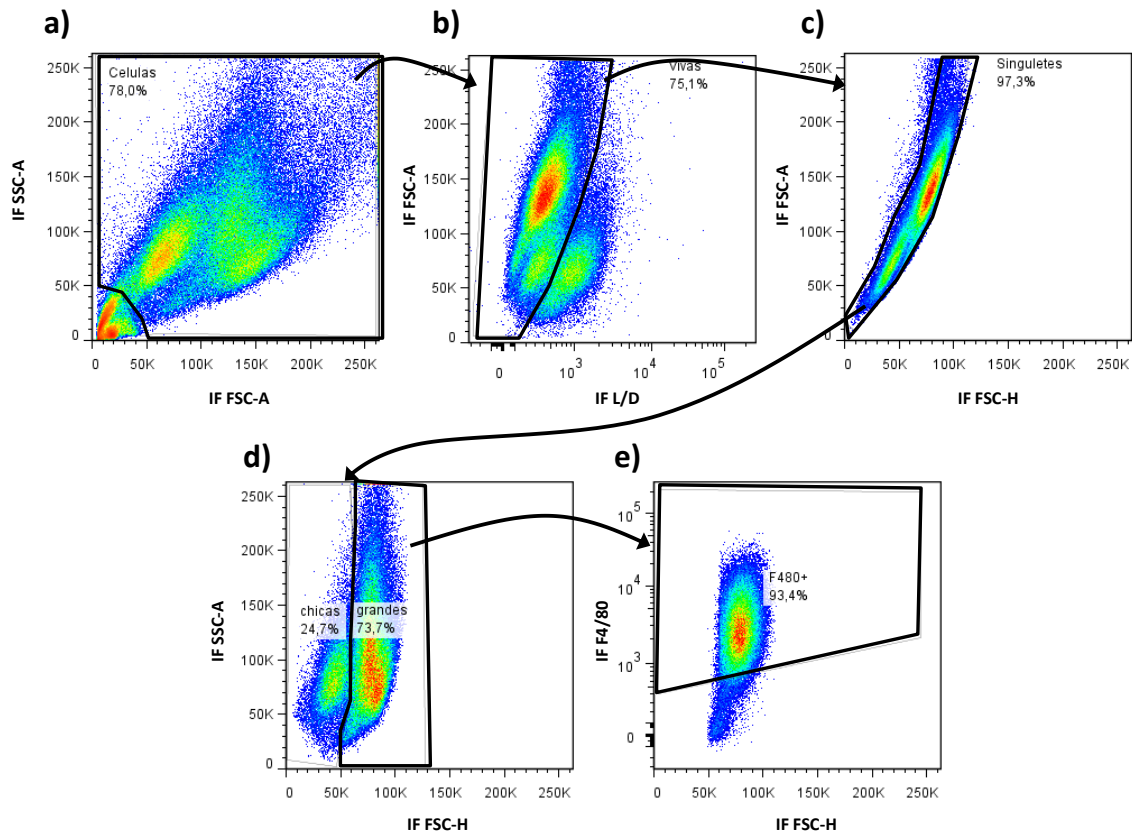


Figura 3.2: Estrategia de selección de los macrófagos BMDM para analizar la presencia en membrana de marcadores de superficie.

Las BMDM obtenidas se tiñeron con anticuerpos específicos para analizar la presencia de distintos marcadores de superficie por citometría de flujo tal como se describe en el punto 3.2.7. Se utilizaron gráficos de puntos donde se representan las dispersiones de la luz en la misma dirección que el haz láser (FSC, del inglés *forward scatter*) y a 90 grados de este haz (SSC, del inglés *side scatter*), y la intensidad de fluorescencia (IF) correspondiente a cada fluorocromo, indicando a qué marcador celular corresponde. La estrategia de selección de la población de macrófagos se muestra con flechas que vinculan las regiones seleccionadas en los paneles desde a hasta e. Se seleccionaron las células íntegras (a), luego las células vivas (b) y los singletes (c). Posteriormente dentro de esta última región se definieron las poblaciones de células, las grandes (FSC^{alto}, panel d) y las chicas (FSC^{bajo}, panel n). Finalmente, dentro de la población de células grandes se definieron las células F4/80⁺ con ayuda del control FMO para F4/80. Posteriormente, se analizó la fluorescencia correspondiente al marcador de interés en la población de células F4/80⁺.

3.2.8 Determinación de la expresión de marcadores intracelulares por citometría de flujo

Después de la tinción de marcadores de superficie descrita en el punto 3.2.7, se continuó el procesamiento de las muestras con el fin de teñir marcadores intracelulares. Para ello, a las células previamente dispuestas en la placa de 96 pozos se le realizaron lavados con FACS y posteriormente se fijaron y permeabilizaron con tampón permeabilizante (TPerm, eBioscience, 100 µl por pozo), durante toda la noche (para la tinción de Ki67, BrdU y Arg1). Alternativamente las células se fijaron

con paraformaldehído 2 % durante 20 min y luego permeabilizaron con TPerm durante toda la noche (para la tinción de Relm α). Posteriormente las células se lavaron dos veces con el TPerm, bloquearon con 20 μ l de suero normal de rata 10 % en TPerm durante 20 min y se realizó la tinción intracelular con los anticuerpos diluidos en TPerm (50 μ l por pozo durante 30 min). Cuando fue necesario se realizó una segunda tinción intracelular con anticuerpos conjugados a fluorocromos, 50 μ l por pozo, durante 45 min. En el caso de la tinción para BrdU, luego de la permeabilización fue necesario realizar un tratamiento con DNAsa por 30 min a 37 °C, para después proceder a la tinción intracelular. Algunas células no se trataron con DNAsa como control. Finalizadas las tinciones intracelulares, las células se lavaron dos veces con TPerm y se resuspendieron en 70 μ l de FACS para ser analizadas en el citómetro de flujo.

3.2.8.a Estrategia de selección para analizar la expresión de marcadores de diferenciación alternativa y proliferación en macrófagos de la cavidad peritoneal

En la Figura 3.3 se muestra la estrategia de selección empleada para definir los macrófagos peritoneales y evaluar los marcadores de diferenciación alternativa y proliferación celular. En primer lugar se seleccionan las células vivas (a), luego los singuletes (b) y posteriormente se hizo una selección de varias poblaciones marcadas con el mismo fluorocromo para eliminarlas del análisis. Aquí se incluyeron los LB (CD19⁺), LT (TCRb⁺), eosinófilos (SiglecF⁺) y neutrófilos (Ly6G⁺) (c). Luego se descartaron las células MHCII⁺F4/80⁻ (d), y se seleccionaron los macrófagos como CD115⁺ y F4/80 medio y alto (e). Posteriormente, se diferenciaron las poblaciones de macrófagos en residentes y recientemente reclutados, según la expresión de F4/80 y MHCII siendo los primeros F4/80^{alto}MHCII^{med}, y los segundos F4/80^{med}MHCII^{alto} (f). Finalmente dentro de ambas poblaciones de macrófagos, se evaluaron los marcadores alternativos y de proliferación, haciendo uso del control FMO correspondiente, que permitió fijar el umbral a partir del cual la señal de cada muestra se consideró positiva.

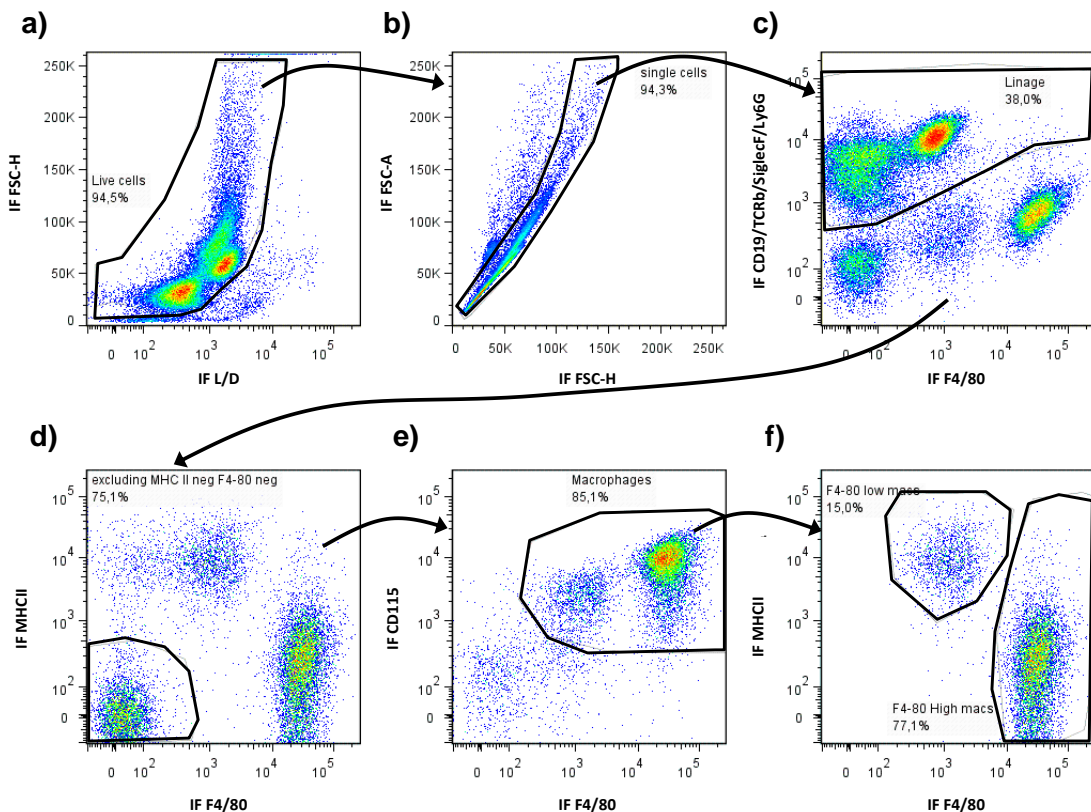


Figura 3.3: Estrategia de selección para definir los macrófagos peritoneales

Se obtuvieron células de cavidad peritoneal y se tiñeron con anticuerpos específicos para definir a los macrófagos peritoneales. La estrategia de selección consistió en **(a)** seleccionar las células vivas, **(b)** seleccionar los singuletes, **(c)** definir LB CD19⁺, LT TCRb⁺, eosinófilos SiglecF⁺ y neutrófilos Ly6G⁺ para eliminarlos del análisis y continuar con el resto de las células. En **(d)** se definieron y descartaron las células MHCII⁻ F4/80⁻, en **(e)** se definieron los macrófagos como F4/80⁺ CD115⁺ y en **(f)** se diferenciaron los macrófagos reclutados como F4/80^{low} y los residentes de cavidad peritoneal como F4/80^{hi}.

3.2.8.b Estrategia de selección para analizar la expresión de marcadores de diferenciación alternativa y proliferación en macrófagos de la cavidad peritoneal reclutados por estimulación con tioglicolato

En la Figura 3.4 se muestra la estrategia de selección empleada para definir los macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato y evaluar los marcadores de diferenciación alternativa y proliferación celular. En primer lugar se seleccionaron las células vivas (a), luego los singuletes (b) y posteriormente se hizo una selección de varias poblaciones marcadas con el mismo fluorocromo para eliminarlas del análisis. Aquí se incluyeron los LB (CD19⁺), LT (TCRb⁺), eosinófilos (SiglecF⁺) y neutrófilos (Ly6G⁺) (c). Luego se descartaron las células MHCII⁻F4/80⁻ (d), y se seleccionaron los macrófagos como CD115⁺F4/80⁺ (e). Posteriormente, se diferenciaron las poblaciones de macrófagos como F4/80⁺MHCII^{alto} y F4/80⁺MHCII^{bajo}. Finalmente, dentro de ambas poblaciones de macrófagos, se evaluaron los marcadores alternativos y de proliferación, haciendo uso del control FMO correspondiente, que permitió fijar el umbral a partir del cual la señal de cada muestra se consideró positiva.

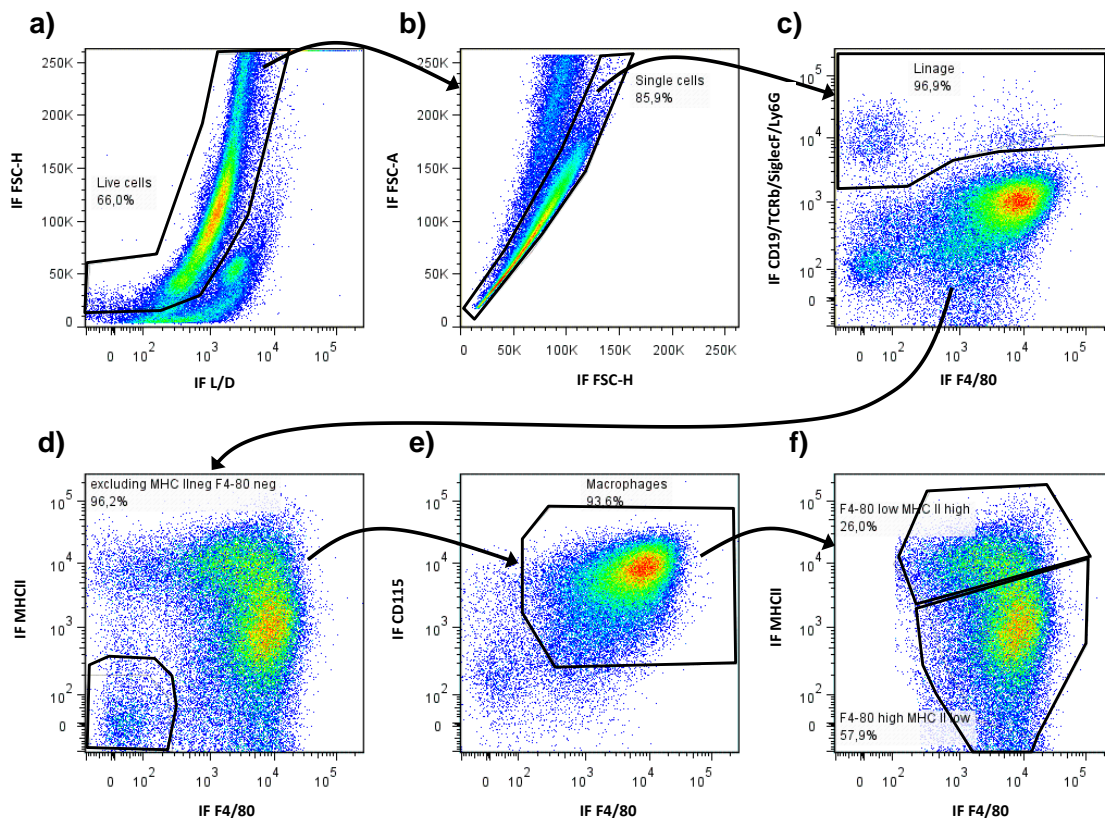


Figura 3.4: Estrategia de selección para definir los macrófagos de peritoneo reclutados por estimulación con tioglicolato

Se indujo el reclutamiento de macrófagos a la cavidad peritoneal tras la inyección de tioglicolato y luego de tres días se recuperaron las células y se tiñeron con anticuerpos específicos para analizarlas por citometría de flujo. La estrategia de selección consistió en **(a)** seleccionar las células vivas, **(b)** seleccionar los singuletes, **(c)** definir LB (CD19⁺), LT (TCRb⁺), eosinófilos (SiglecF⁺) y neutrófilos (Ly6G⁺) para eliminarlos del análisis y continuar con el resto de las células. En **(d)** se definieron y descartaron las células MHCII⁺F4/80⁻, en **(e)** se definieron los macrófagos como F4/80⁺CD115⁺ y en **(f)** se determinaron dos poblaciones de macrófagos como F4/80⁺ MHCII^{alto} y F4/8⁺ MHCII^{bajo}.

Tabla 3.1: Anticuerpos utilizados en la tinción de citometría de flujo

	Antígeno	Fluorocromo	Factor de Dilución	Clona	Marca	
Marcadores de superficie	CD19	APC-Cy7	200	1D3	BD	BMDM condicionadas
	CD3	PE	80	17A2	PharMingen	
	CD11b	PerCp	400	M1/70	BioLegend	
	Ly6C	eFluo	200	HK1.4	eBioscience	
	Ly6G	APC	200	1A8	BioLegend	
	F4/80	PE-Cy7	300	BM8	Invitrogen	
	MHCII	APC	80	M5/114.15.2	BioLegend	
	CD80	Pe-Cy5	40	16-10A1	BioLegend	
	CD86	PE	80	GL1	eBioscience	
	CD36	s/m	25	CRF D 2712	BD	
	anti-IgA	FITC	50	C10-3	BD	
Marcadores de superficie	PD-L2	PE	200	TY25	eBioscience	Proliferación
	CD115 biot.	-	100	AF598	BioLegend	
	Streptavidina	PerCP	400	-	BioLegend	
	CD206	APC	400	C068C2	BioLegend	
	MHC-II	AF700	500	M5/114.15.2	BioLegend	
	CD19	Pac.Blue	300	6D5	BioLegend	
	Siglec-F	BV421	300	E50-2440	BD	
	Ly6G	BV421	300	1A8	BioLegend	
	TCRb	BV421	300	H57-597	BioLegend	
	CD115	FITC	100	AFS98	BioLegend	
Tim4	PE	500	RMT4-54	BioLegend		
Marcadores intracelulares	Ki67	FITC	5 ul/tubo	B56	BD Pharmigen	
	YM-1 biot	-	40	policlonal	RyD Systems	
	Relm-a	-	100	policlonal	PeptoTech	
	anti-rabbit IgG	APC	300		RyD Systems	
	Arg-1	APC	100	policlonal	RyD Systems	
	BrdU	PE	1.5 ul/tubo	Bu20a	BioLegend	
Viabilidad	L/D	Aqua	500	-	Invitrogen	

3.2.9 Obtención de extractos celulares

Para medir la expresión de FABP4 por Western blot se obtuvieron extractos celulares de BMDM condicionados con NO₂-FA en presencia o ausencia de GW9662 como se explicó en el punto 3.2.4.a. Luego de los siete días de condicionamiento, las células se lavaron con PBS y se lisaron utilizando un tampón hipotónico (Hepes 10 mM, EDTA 0.5 mM, KCl 10 mM, pH 7.5, suplementado con DTT 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasas, 100 µl p/pozo). Para obtener cantidades suficientes de proteína se juntaron 4 pozos de cada condición y se sonicaron (3 rondas de pulsos de 1 min a 15 % seguido de tres rondas a 30 % de la potencia total) usando un Omni-Ruptor 4000 (OMNI International Inc.). Posteriormente se centrifugaron los lisados a 10000 *g* durante 15 min a 4 °C. La concentración aproximada de proteínas se estimó en base a la Abs a 280 nm.

Para medir la actividad arginasa se obtuvieron extractos celulares de BMDM condicionadas e incubadas por 24 h con IL4 como se explicó en 3.2.4.a. Se descartó el sobrenadante, se lavaron las células con PBS 3 veces y se lisaron con tritón 0.1 % en agua suplementado con coctel de inhibidores de proteasas (100 µl p/pozo). Se pipetó cada pozo vigorosamente para favorecer la lisis, se incubó la placa con agitación por 30 min a 25 °C y se conservó a -80 °C hasta su uso.

3.2.10 Separación de proteínas por SDS-PAGE y Western blot

En un primer paso las muestras de los lisados celulares se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) siguiendo protocolos convencionales. Brevemente, se utilizaron geles concentradores y separadores de acrilamida de 1.5 mm de espesor al 4 % (m/v) y al 12.5 % (m/v), respectivamente. Las muestras (36 µg de proteína) se diluyeron en tampón de carga 6x (0.35 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % SDS, 10 % glicerol, conteniendo azul de bromofenol) en condiciones reductoras (40 µM DTT), y se calentaron por 10 min a 90 °C previo a ser sembradas. La corrida se realizó usando una solución tampón de corrida (Tris al 0.3 % (m/v), glicina al 1.44 % (m/v), SDS al 0.1 % (m/v)). La electroforesis se realizó en el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), aplicando entre 25-35 mA durante toda la corrida. Se utilizaron marcadores de peso molecular pre-teñidos de entre 20 y 120 kDa (Thermo Fischer Scientific). Luego, las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore-Merck, EEUU), utilizando el sistema de electrotransferencia húmeda (Bio-Rad) y una solución tampón de transferencia [Tris-base 50 mM, glicina 380 mM, SDS al 0.1 % (m/v), metanol al 20 % (v/v)] durante toda la noche a voltaje constante de 56 V y 4 °C. Las membranas se bloquearon con PBS-BSA 0.5 % y se incubaron (durante toda la noche, con agitación continua a 4 °C) con el antisuero de conejo anti-rFABP4 (1:20000) o el anticuerpo IgM de ratón anti-GAPDH humana (1:1000, SIGMA-Aldrich, EEUU) con reactividad cruzada por GAPDH de ratón, diluidos en PBS-Tween-BSA. Luego de tres lavados con PBS-T, se incubaron con el anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:2000, Calbiochem) o anti-Ig de ratón conjugado a peroxidasa (1:2000, Calbiochem). El revelado se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Fischer Scientific) y se fotografió en un sistema de imagen (G:BOX, Syngene, India). La densitometría de las bandas se realizó con el software ImageJ²¹⁹.

3.2.11 Análisis de la expresión génica

Para analizar la expresión génica en primer lugar se obtuvo el ARN total de las células. Para esto, las células se lisaron con TRIzol Reagent siguiendo las recomendaciones del fabricante (300 µl del

reactivo para 5×10^5 células, pipeteando varias veces para homogeneizar) y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Para extraer el ARN total, al homogeneizado se le agregó cloroformo (60 μl), se agitó manualmente y se separaron las fases acuosa y orgánica mediante centrifugación (12000 g , por 15 min a 4°C). Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN con isopropanol (150 μl) mezclando suavemente y dejando reposar a temperatura ambiente por 10 min. Luego se centrifugó la muestra (12000 g , por 15 min a 4°C), se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 300 μl de etanol (75 % en agua libre de ARNsas) usando un agitador tipo vortex. Posteriormente la muestra se centrifugó (7500 g , 5 min a 4°C), se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 30 min. Se resuspendió el pellet en 20 μl de agua libre de ARNsas y se calentó durante 10 min a 55°C para disolver completamente el ARN. Se midió la concentración y se verificó la calidad del ARN obtenido (relación Abs 260/Abs 280 y Abs 260/Abs 230) utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Las muestras de ARN se congelaron a -80°C para su conservación.

En segundo lugar a partir del ARN total se preparó el ADN copia (ADNc), pero previamente las trazas de ADN se eliminaron de la muestra por tratamiento con ADNasa-I, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, 1 μg de ARN se mezcló con 1 unidad de ADNasa-I, su correspondiente tampón conteniendo MgCl_2 y agua libre de ARNsas (c.s.p. 10 μl). Se incubó 30 min a 37°C en termociclador (Bioer, China). Luego se inactivó la enzima por incubación a 65°C durante 10 min en presencia de EDTA. A continuación se realizó la síntesis de la hebra complementaria de ADN (ADNc) usando la transcriptasa reversa M-MLV. Brevemente, a la mezcla de reacción anterior se le adicionaron la enzima M-MLV (200 unidades), 0.5 mM dNTPs, 5 μM cebadores aleatorios y el inhibidor de ARNsas Ribolock (40 unidades). La reacción de síntesis se realizó en un termociclador en tres pasos utilizando las siguientes condiciones: 25°C por 10 min, 37°C por 50 min y 70°C por 15 min.

Para evaluar los niveles de expresión génica, se utilizaron cebadores específicos del gen de interés para amplificar el ADNc correspondiente por PCR en tiempo real (qPCR). Los cebadores, se diseñaron en el software Primer Express (Applied Biosystems, EEUU) y se verificó su eficiencia de amplificación exigiendo que fuera entre 90 y 110 %. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 3.2. Para la qPCR se empleó el kit comercial QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen, Hilden-Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 5 μl de SYBR con los cebadores específicos (sentido y anti-sentido) a una concentración final de 0.9 μM , en un volumen final de 10 μl conteniendo 2 μl de molde. La reacción se realizó en un Rotor-Gene Q real-time PCR cyler (Qiagen) utilizando el siguiente protocolo: 15 min a 95°C , seguido de 40 ciclos de 15 s a 94°C , 30 s a 50°C y 30 s a 72°C . El cambio en el nivel de expresión de los genes de interés se reportó relativo a los niveles observados en las muestras control usando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ²¹⁸, donde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct del gen de interés} - \text{Ct de un gen constitutivo}$. Para todos los ensayos se usó como gen constitutivo la β -actina o el 18S.

Tabla 3.2: Cebadores diseñados para RT-qPCR en muestras provenientes de monocitos y macrófagos murinos

Gen	Cebador sentido	Cebador anti-sentido
18S	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
b-Actina	GCTTCTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG
Fabp4	GATGAAATCACCGCAGACGACA	ATTGTGGTGCAGCTTCCATCCC
Cd36	CAGTCCTGGCTGTGTTTGGGA	TTTGAAAGCAGTGGTTCTCTT
Lpl	CACAACCAGGCCTTCGAGAT	ACCTCGGGCAGGGTGAA

<i>Pparg</i>	CCGTGCAAGAGATCACAGAG	CCCTGGTCATGAATCCTTGG
<i>Hmox1</i>	ACTAGCCCAGTCCGGTGATG	TTCAAGGCCTCAGACAAATCCT
<i>Nos2</i>	CCCCGAGCTCCTCACT	CTGTGGACGGGTCGATGTC
<i>Il6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>Arg1</i>	CGATTACCTGAGCTTTGATGTC	GTCCTGAAAGGAGCCCTGTCT
<i>Chi3l3</i>	CATTGGAGGATGGAAGTTTGA	GAATATCTGACGGTTCTGAGGAGTAG
<i>Mrc1</i>	GCATGGGTTTTACTGCTACTTGATT	CAGGAATGCTTGTTCATATCTGTCTT
<i>Retnla</i>	CGTGGAGAATAAGGTCAAGGAACT	CACTAGTGAAGAGAGAGTCTTCGTT
<i>Il10</i>	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT

3.2.12 Ensayo para la determinación de la actividad arginasa

La actividad arginasa se determinó aplicando la metodología descrita previamente por Corraliza et al.²⁴⁵, que se basa en la detección colorimétrica de la urea formada a partir del sustrato L-Arginina. Para ello, se descongelaron los lisados celulares en tritón 0.1 % y se mantuvieron en hielo durante toda la preparación. Se mezclaron 50 µl de los lisados con 50 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 conteniendo 10 mM MnCl₂, en tubos de PCR. Se pre-calentó el termociclador a 55 °C y luego se incubaron las muestras durante 15 min. Finalizado el tiempo se colocaron las muestras en hielo, se les agregó 100 µl por tubo de L-Arginina (AppliChem, Alemania) 0.5 M en agua pH 9.7 (preparada fresca) y se incubaron 1-2 h a 37 °C. Mientras tanto, se preparó el estándar de urea (Appllichem) en agua, mediante diluciones seriadas al medio que abarcaran un rango de concentración de 0.6 a 0.002 mg/ml y una solución fresca de α- isonitrosopropiofenona (ISPF, Sigma) al 9 % m/v en etanol. Se armó otro set de tubos de PCR considerando las muestras y el estándar por duplicado a los que se les agregó 8 µl de ISPF 9 % y 160 µl de solución de freno (H₂SO₄/H₃PO₄/H₂O destilada, 1/3/7, v/v/v) por tubo. A los tubos nuevos conteniendo ISPF y solución de freno, se les transfirió 40 µl de cada muestra salida del termociclador o del estándar y se los incubó durante 30 min a 90 °C para frenar la reacción. Finalizado el tiempo se esperó a que el termociclador alcanzara la temperatura ambiente y se colocaron las muestras en hielo. Se transfirieron 180 µl de cada tubo a una placa de 96 pocillos de microtitulación y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan). Con el estándar se construyó una curva de calibración de absorbancia vs. concentración de urea, y se estimó la concentración de urea presente en la muestra. Posteriormente se calcularon las unidades de actividad enzimática (U), definidas como los µmoles de producto formado por minuto de reacción y se normalizaron contra la cantidad de proteína total determinada por el kit micro BCA (Thermo Fisher Scientific). Finalmente el resultado se informó como mU/mg de proteína total.

3.2.13 Análisis de los datos

La mayoría de los experimentos se realizaron al menos 3 veces (n = 3) con cada condición por duplicado. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism (version 6, GraphPad Software, EEUU, www.graphpad.com). En todos los casos se utilizó el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para las comparaciones múltiples, con el post-test de Tukey.

3.3 Resultados

3.3.1 El condicionamiento con los NO₂-FA durante la diferenciación de precursores de médula ósea modificó el fenotipo de los macrófagos obtenidos

Se conoce que es posible obtener macrófagos murinos por diferenciación de precursores de médula ósea de ratón con M-CSF ²⁴⁶. El procedimiento rinde una población homogénea de macrófagos (90 %), en un estado relativamente quiescente que pueden responder a distintos estímulos. A su vez, la diferenciación induce una minoría de otras poblaciones contaminantes ^{247,248}. Con el fin de caracterizar el efecto del condicionamiento con los NO₂-FA de los BMDM, primero se analizó el fenotipo de las células obtenidas luego de 7 días de diferenciación con M-CSF (aportado por el sobrenadante de cultivo de la línea de fibroblastos murinos L929), en ausencia o presencia de NO₂-FA (10 μM) o Rosi (5 y 10 μM, para comparar con un ligando total de PPARγ). Además, de los controles realizados sin agregar NO₂-FA (control medio), se trataron células con DMSO como control de vehículo. Al día 7 se despegaron las células y se caracterizaron por citometría de flujo utilizando dos tinciones: i) para examinar la presencia de células pertenecientes a diferentes linajes hematopoyéticos, en base al uso de anticuerpos específicos para los marcadores CD19 (específico de linfocitos B, LB), CD3 (específico de Linfocitos T, LT), CD11b (específico de células inflamatorias), Ly6G (expresado en gran nivel en neutrófilos), Ly6C (específico de monocitos) y F4/80 (expresado en gran nivel en macrófagos); ii) para evaluar dentro de la población de macrófagos (F4/80 positiva) el nivel de expresión de moléculas de superficie vinculadas a las funciones de los macrófagos, como ser el complejo proteico MHC de clase II (MHCII), necesario para la presentación de antígenos, las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, fundamentales para la inmunoestimulación de LT, y el receptor barrendero CD36, asociado a la función fagocítica que contribuye a la remoción de componentes de desecho y resolución de la inflamación.

En primer lugar se analizó si el condicionamiento con los NO₂-FA modificó el rendimiento de la producción y/o la viabilidad de las células obtenidas. Los resultados mostraron que la presencia del NO₂-CLA durante la diferenciación de los precursores mieloides no afectó significativamente ni el rendimiento ni la viabilidad en comparación con los controles (sin tratamiento y DMSO). Sin embargo, esto no fue así para el NO₂-OA, que provocó una reducción significativa en el rendimiento, aunque las células obtenidas mantuvieron una buena viabilidad (Figura 3.5a y b indicado con *). Estas observaciones, sumado a que no se observaron células muertas durante el cultivo, sugieren que el NO₂-OA podría haber afectado la tasa de proliferación celular durante el proceso de diferenciación de los precursores mieloides. Debido al bajo rendimiento obtenido en la preparación de células condicionadas con NO₂-OA, no se pudo realizar la caracterización fenotípica completa de estas células en todas las preparaciones obtenidas y, por lo tanto, estos grupos no se incluyeron en el análisis estadístico aunque los datos obtenidos se muestran en la Figura 3.6. Por su parte, el condicionamiento con CLA y Rosi 10 μM indujo un aumento significativo del número de células, sugiriendo un efecto positivo sobre la tasa de proliferación de los progenitores (Figura 3.5a).

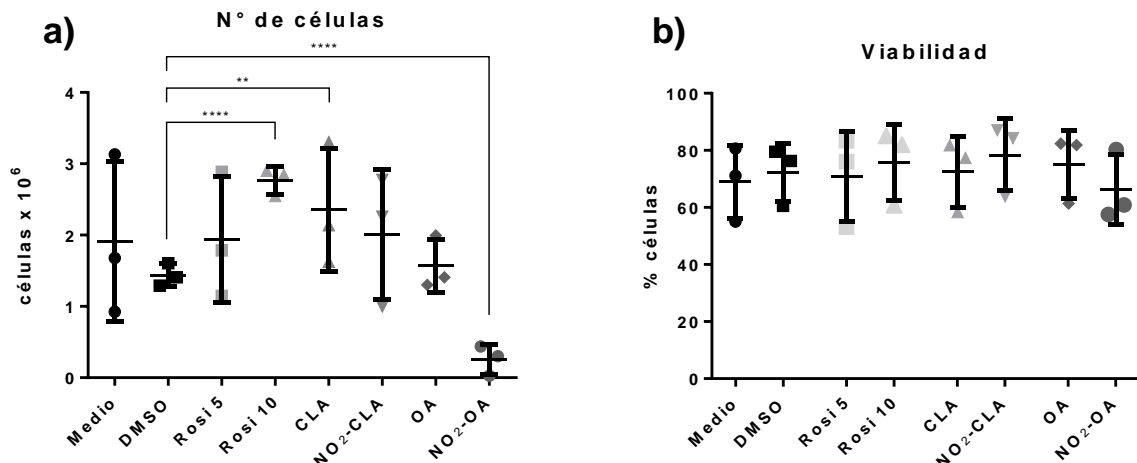


Figura 3.5: Efectos del condicionamiento con NO₂-FAs sobre el rendimiento de la producción y la viabilidad de las células obtenidas

Se obtuvieron progenitores de médula ósea y se diferenciaron con M-CSF por 7 días en presencia o ausencia de los NO₂-FAs (10 μM), Rosi (5 o 10 μM) o sus respectivos controles (FA y DMSO, respectivamente). Al día 7 las células se despegaron y se tiñeron con una sonda para medir la viabilidad celular (L/D) por citometría de flujo. El análisis de los resultados, incluyendo la estrategia de selección, se realizó con el software FlowJo tal como se describió en Materiales y Métodos (punto 3.2.7.a). Se muestra el número total de células obtenidas **(a)** y el porcentaje de células vivas **(b)** para cada tratamiento. En todos los casos los gráficos muestran el promedio de tres experimentos independientes (barras horizontales) ± SD. (*) Indica diferencias significativas con DMSO (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

La caracterización de las células diferenciadas en presencia de M-CSF evidenció, como era de esperar, un contenido despreciable de linfocitos (ausencia de LB y un porcentaje muy bajo, cercano a 1 % de LT Figura 3.6a). En contraste, la mayoría de las células obtenidas expresaron CD11b (CD11b⁺, aproximadamente 80 %, Figura 3.6b), un marcador que adquieren principalmente las células mieloides de la inmunidad innata. Tal como se esperaba luego de la diferenciación con M-CSF²⁴⁷, los macrófagos constituyeron la población mayoritaria dentro de las células CD11b⁺ (85 %, Figura 3.6c), mientras que se definieron dos poblaciones minoritarias, los neutrófilos (cerca de 10%, Figura 3.6d) y los monocitos (cerca de un 4 %, Figura 3.6e). En cuanto a los efectos causados por el condicionamiento con los distintos estímulos, se observó que el NO₂-CLA aumentó significativamente el porcentaje de macrófagos en relación al DMSO (91.7 % vs 85.2 %, respectivamente, Figura 3.6b), mientras que disminuyó el de neutrófilos (2.5 % vs 7.7 % para el DMSO, Figura 3.6d) y en menor medida el de monocitos (2.9 % vs 4.1 % para el DMSO Figura 3.6e). Por su parte el CLA provocó cambios sutiles que incluyeron una disminución del contenido de macrófagos (84.6 %, Figura 3.6b) y aumento de monocitos (4.5 % Figura 3.6e). Finalmente el tratamiento con Rosi a sus dos concentraciones provocó una leve disminución de los monocitos (3.2 % y 3.7 % para Rosi 5 y 10 μM, respectivamente, Figura 3.6e). Por otra parte, se observó que la población de macrófagos obtenida no fue homogénea, presentando dos subpoblaciones con distinto tamaño (determinado por la señal en el detector FSC), a las que llamamos F4/80⁺FSC^{alto} (Figura 3.6f) y F4/80⁺FSC^{bajo} (Figura 3.6g). Entre ambas poblaciones la F4/80⁺FSC^{alto} fue la más abundante en todas las muestras, con un porcentaje entre 75-80 % (Figura 3.6f).

Dado que el NO₂-CLA provocó un aumento en el porcentaje de macrófagos obtenidos (CD11b⁺F4/80⁺), se analizó si esto se acompañaba de un aumento en la expresión de este marcador. Para ello se comparó la intensidad de fluorescencia correspondiente a la tinción para F4/80 entre las células condicionadas con los NO₂-FA, FA y DMSO, seleccionando por separado las regiones correspondientes a las células CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} (grandes) y CD11b⁺F4/80⁺FSC^{bajo} (chicas). En la Figura 3.7 se muestran los gráficos de puntos representativos de los resultados obtenidos para la expresión de F4/80 en los macrófagos grandes y chicos, y los valores medios del porcentaje de células positivas y el nivel de expresión de F4/80 en tres experimentos independientes, así como también el número total de macrófagos obtenido en cada tratamiento. Se comprobó que el CLA y los NO₂-FAs indujeron un aumento significativo del porcentaje de células CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} (desde 65 % a 75 % aproximadamente, Figura 3.7b), y solo el CLA y NO₂-CLA aumentaron además el número de células de manera significativa (Figura 3.7c, indicado con un *). Sin embargo, al considerar la intensidad de fluorescencia de la expresión de F4/80 de todas las células grandes, se evidencia que sólo los NO₂-FA inducen un aumento de la misma (desde 830 a 1900 y 2100, el NO₂-CLA y NO₂-OA respectivamente, Figura 3.7d). En cambio, no se observaron diferencias entre los tratamientos al analizar el porcentaje de células CD11b⁺F4/80⁺FSC^{bajo} o la intensidad de fluorescencia del marcador F4/80 en las células chicas, aunque el tratamiento con Rosi, CLA y NO₂-CLA aumentaron el número de células de manera significativa (Figura 3.7f-g).

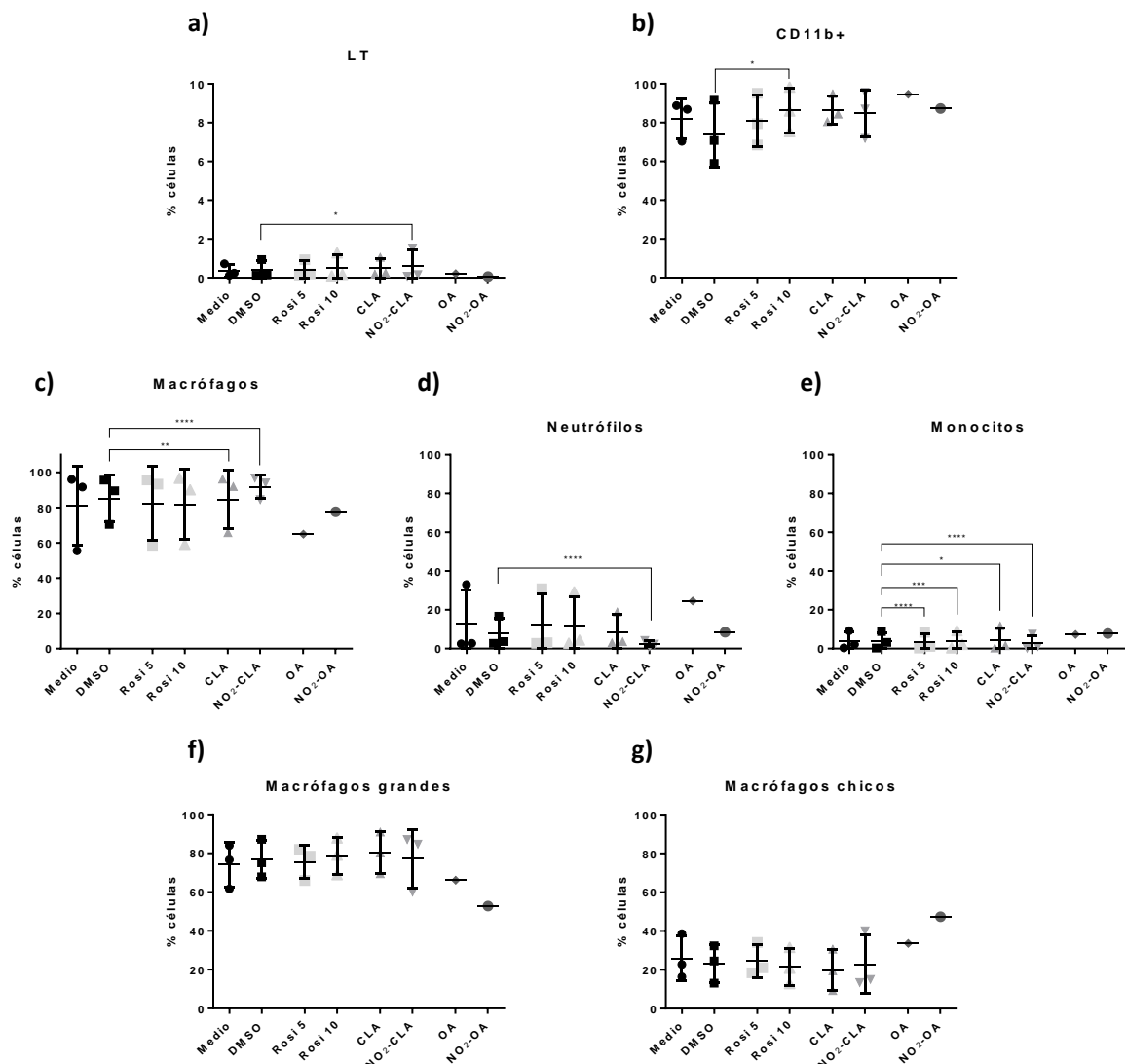
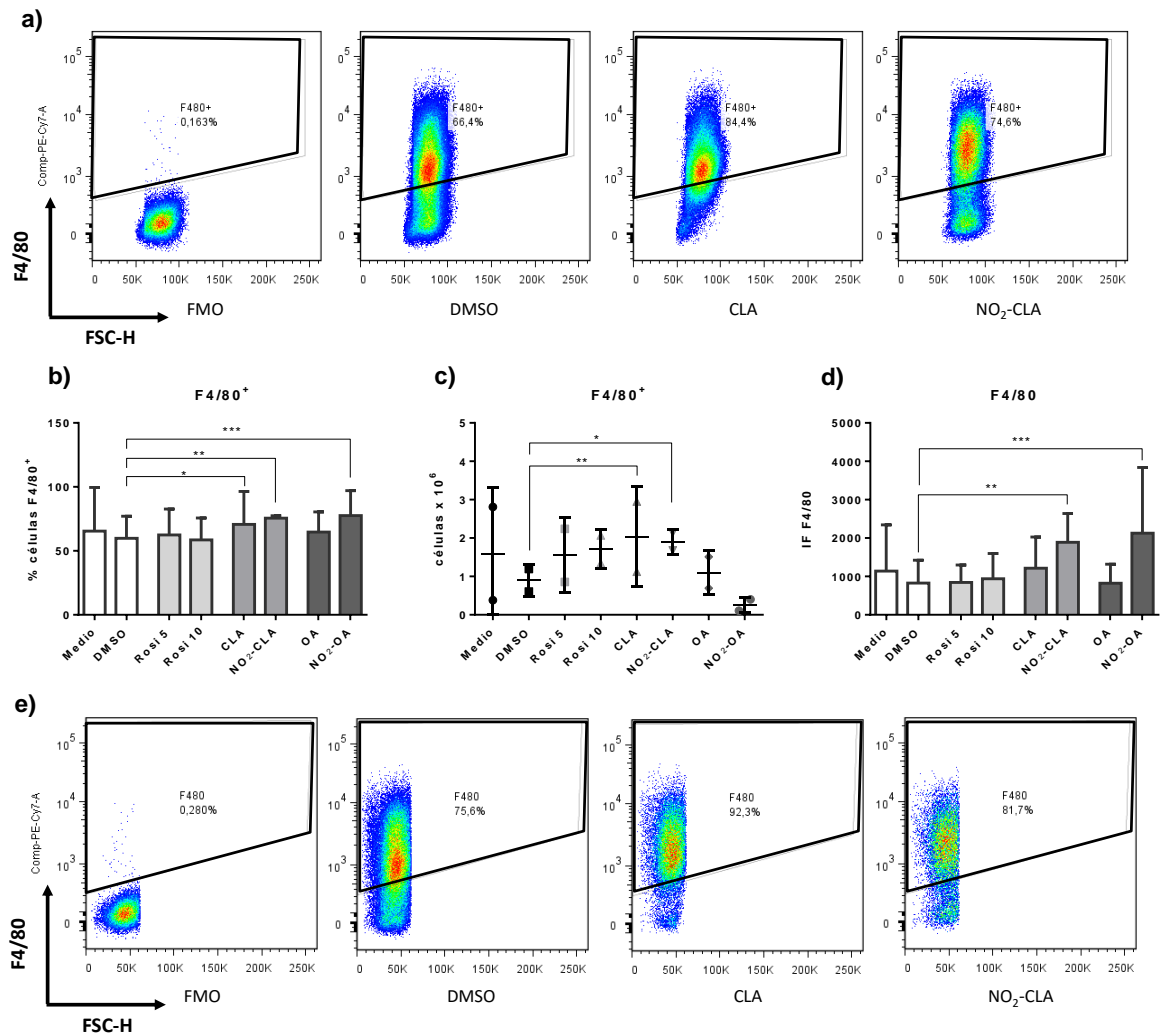


Figura 3.6: El condicionamiento de progenitores de médula ósea con NO₂-FAs condujo a un aumento en el porcentaje de la población de macrófagos obtenida

Se obtuvieron progenitores de médula ósea y se diferenciaron con M-CSF por 7 días en presencia o ausencia de los NO₂-FAs (10 μM), Rosi (5 o 10 μM) o sus respectivos controles (FA y DMSO, respectivamente). Al día 7 las células se despegaron y tiñeron con anticuerpos específicos para analizar los distintos tipos celulares por citometría de flujo. El análisis de los resultados, incluyendo la estrategia de selección, se realizó con el software FlowJo tal como se describió en Materiales y Métodos (punto 3.2.7.a). Se muestran los porcentajes correspondientes a los LT **(a)** y células CD11b⁺ **(b)** relativos al total de la población de células vivas (singuletes), y los porcentajes de macrófagos **(c)** neutrófilos **(d)** y monocitos **(e)** relativos al total de células CD11b⁺. Además, dentro de la población de macrófagos (F4/80⁺) se definieron los macrófagos grandes (FSC^{alto}, panel **f**) y chicos (FSC^{bajo}, panel **g**). En todos los casos los gráficos muestran el promedio de tres experimentos independientes (barras horizontales) ± SD. (*) Indica diferencias significativas con DMSO (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$).



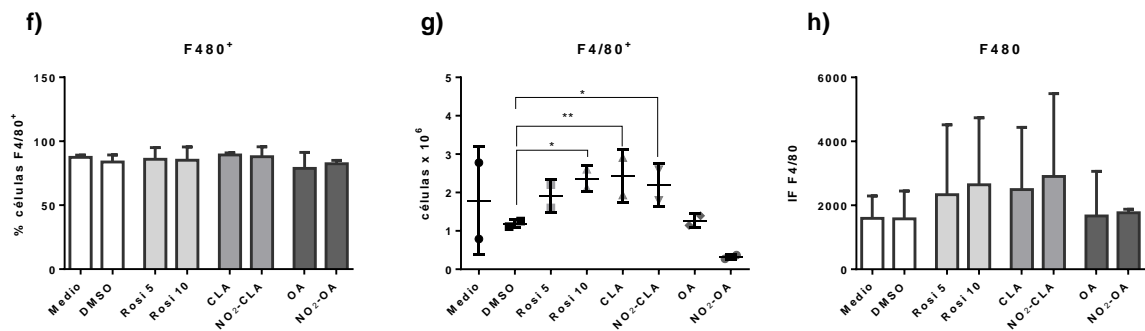


Figura 3.7: El condicionamiento con NO₂-FAs condujo a un aumento en la expresión de F4/80 en los macrófagos grandes (CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto}).

Se analizó por citometría de flujo el nivel de expresión de F4/80 en las células BMDM obtenidas por condicionamiento con FA (10 μ M), NO₂-FA (10 μ M), Rosi (5 o 10 μ M) o DMSO como control. Se realizó el análisis por separado de las células grandes (**a-d**) definidas como CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} y de las células chicas (**e-h**) definidas como CD11b⁺F4/80⁺FSC^{bajo}. En (**a y e**) se muestran gráficos de puntos correspondientes a la expresión de F4/80 vs tamaño de células (FSC-H), los cuales son representativos de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. En (**b y f**), (**c y g**) y (**d y h**) se muestran los valores medios \pm desvío estándar (SD) del porcentaje de células F4/80⁺, del número de células F4/80⁺ y del nivel de expresión de F4/80 (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, IF), correspondientes a dos o tres experimentos independientes. (*) Indica diferencias significativas con DMSO (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$).

3.3.2 El condicionamiento con NO₂-FA redujo la expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras, y aumentó la expresión de CD36 en la superficie de los BMDM

En segundo lugar, se analizó la expresión de varias moléculas de superficie celular de los macrófagos que se asocian con su capacidad fagocítica (CD36) y de recibir ayuda de células T efectoras (MHC-II, CD86 y CD80). Este análisis se realizó sobre las dos poblaciones de macrófagos descritas anteriormente, CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} y CD11b⁺F4/80⁺FSC^{bajo}, siguiendo la estrategia detallada en Materiales y Métodos; se construyeron gráficos de puntos correspondientes a la IF del marcador de interés vs. FSC-H y se definió el umbral a partir del cual la fluorescencia se consideró positiva utilizando el control FMO correspondiente. En este caso, no se observaron diferencias en el perfil de expresión de los marcadores entre los macrófagos grandes y chicos. De todos modos en las Figuras 3.8 a 3.11 se muestran los resultados obtenidos solamente para los macrófagos grandes CD11⁺F4/80⁺FSC^{alto}, ya que representaron la mayoría de la población en todos los tratamientos (entre 75 y 80 %) y la expresión del marcador F4/80 fue inducida por el tratamiento con los NO₂-FA únicamente en estas células.

En cuanto a la expresión de MHCII, se puede ver como el tratamiento con Rosi, tanto a 5 y 10 μ M, y en mayor medida el tratamiento con NO₂-CLA y NO₂-OA, disminuyó significativamente el porcentaje de células MHCII⁺ (Figura 3.8b). Estos resultados se refuerzan al analizar la intensidad de fluorescencia de la totalidad de las células F4/80⁺, donde nuevamente Rosi 10 y ambos NO₂-FAs indujeron una disminución de la expresión de MHCII (Figura 3.8d).

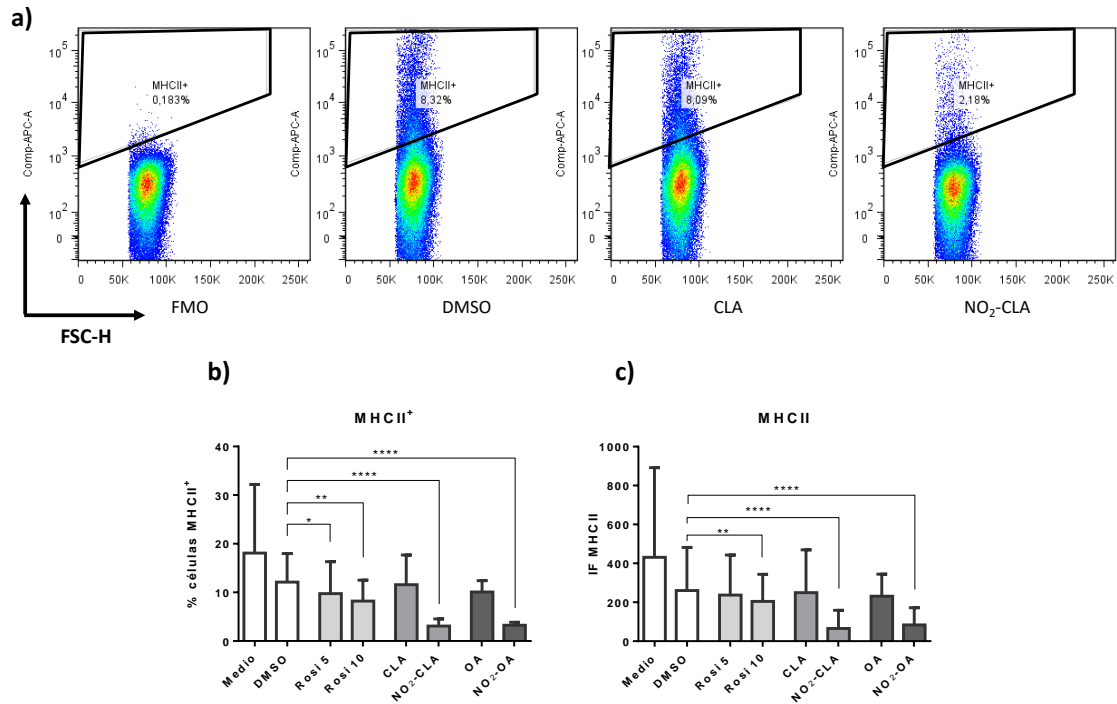
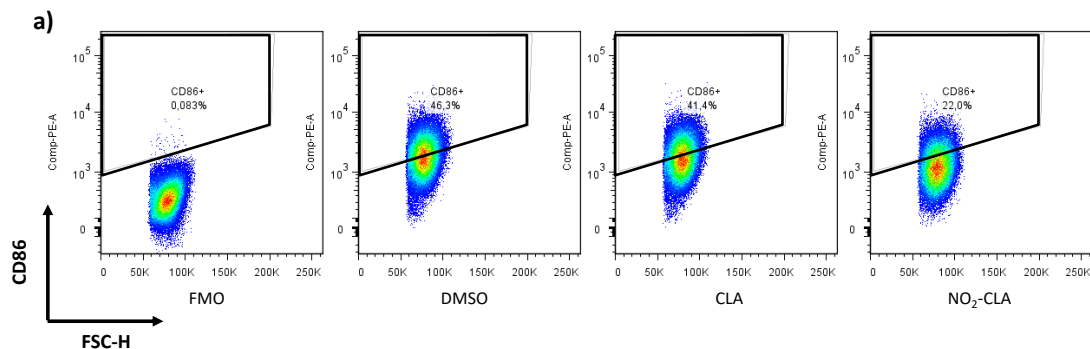


Figura 3.8: El condicionamiento de los BMDM con los NO₂-FAs inhibió la expresión en la membrana plasmática de MHCII

Se analizó por citometría de flujo el nivel de expresión de MHCII en las células BMDM obtenidas por condicionamiento con FA (10 μM), NO₂-FA (10 μM), Rosi (5 o 10 μM) o DMSO como control. Para este análisis se seleccionaron células CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} que constituyen la mayoría de los macrófagos BMDM obtenidos. En **(a)** se muestran gráficos de puntos correspondientes a la expresión de MHCII vs tamaño de células (FSC-H), los cuales son representativos de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. En **(b)** y **(c)** se muestran los valores medios ± SD del porcentaje de células MHCII⁺ y del nivel de expresión de MHCII (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, IF), correspondientes a dos experimentos independientes. (*) Indica diferencias significativas con DMSO (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Por su parte, la expresión de CD86 mostró un patrón similar al observado para la expresión de MHCII. El tratamiento con Rosi o NO₂-FAs disminuyó significativamente tanto el porcentaje de células CD86⁺ como el nivel de expresión de CD86 (intensidad de fluorescencia) en los BMDM condicionados (Figura 3.9b-e), indicando que el condicionamiento interfirió con la expresión de este co-estimulador. El hecho que el efecto de los NO₂-FA, particularmente el NO₂-CLA, sobre la expresión de MHCII y CD86 sea más fuerte que el provocado por la Rosi, sugiere que los mismos podrían involucrar la activación de otra(s) vía(s) de señalización además de PPAR γ .



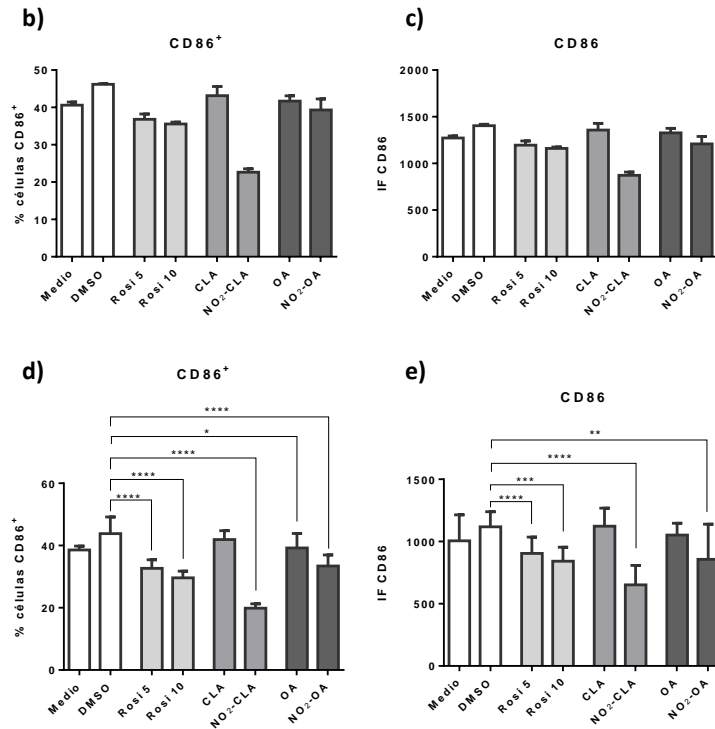


Figura 3.9: El condicionamiento de los BMDM con los NO₂-FAs inhibió la expresión en la membrana plasmática de la molécula co-estimuladora CD86

Se analizó por citometría de flujo la expresión de CD86 en las BMDM condicionadas con FA (10 μ M), NO₂-FA (10 μ M), Rosi (5 o 10 μ M) o DMSO como control. Para este análisis se seleccionaron células CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} que constituyen la mayoría de los macrófagos (**a, b y c**) o las células CD11b⁺FSC^{alto} (**d y e**), que de acuerdo a la caracterización previa contienen aproximadamente un 70% de macrófagos F4/80⁺. En (**a**) se muestran gráficos de puntos representativos de la expresión de CD86 vs tamaño (FSC-H) para los BMDM condicionados por los distintos tratamientos. En (**b**) y (**c**) se muestran los valores medios \pm SD del porcentaje de células CD86⁺ y del nivel de expresión de CD86 (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, IF), correspondientes a un experimento realizado con duplicados analíticos. En (**d y e**) se muestran los valores medios \pm SD del porcentaje de células CD86⁺ y del nivel de expresión de CD86 (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, IF) correspondientes a dos experimentos independientes. (*) Indica diferencias significativas con DMSO (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$).

En cuanto a la expresión de CD80 no se observaron cambios por el condicionamiento con los FA, NO₂-FA o Rosi respecto al grupo control (DMSO). Todos los tratamientos indujeron un porcentaje alto de células CD80⁺ (entre 83 y 95 %, Figura 3.10b), y no hubo variación en el nivel de expresión medido en término de la intensidad de fluorescencia Figura 3.10c). El hecho de no haber detectado variaciones en la expresión de CD80 apoya la idea de que los efectos del condicionamiento con los NO₂-FA sobre la expresión de MHCII y CD86 no se deben a una interferencia general sobre la traducción de proteínas o sobre los mecanismos ligados a la expresión de proteínas de membrana plasmática, sino que responden a una modulación específica sobre estos genes.

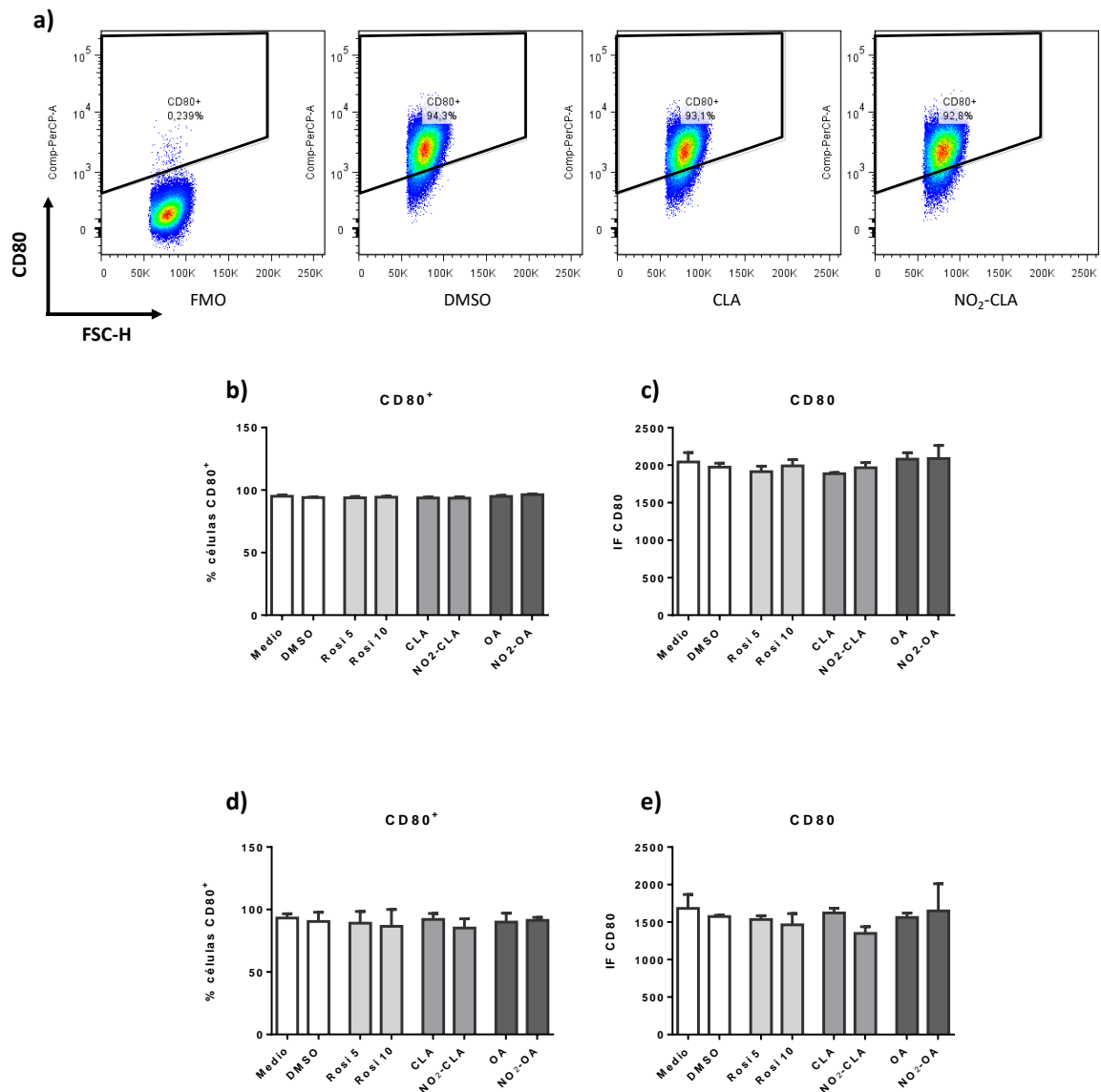


Figura 3.10: El condicionamiento de los BMDM con los NO₂-FAs no alteró la expresión en la membrana plasmática de la molécula co-estimuladora CD80

Se analizó por citometría de flujo la expresión de CD80 en las BMDM condicionadas con FA (10 μ M), NO₂-FA (10 μ M), Rosi (5 o 10 μ M) o DMSO como control. Para este análisis se seleccionaron células CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} que constituyen la mayoría de los macrófagos (**a**, **b** y **c**) o las células CD11b⁺FSC^{alto} (**d** y **e**), que de acuerdo a la caracterización previa contienen aproximadamente un 70% de macrófagos F4/80⁺. En (**a**) se muestran gráficos de puntos representativos de la expresión de CD80 vs tamaño (FSC-H) para los BMDM condicionados por los distintos tratamientos. En (**b**) y (**c**) se muestran los valores medios \pm SD del porcentaje de células CD80⁺ y del nivel de expresión de CD80 (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, IF), correspondientes a un experimento realizado con duplicados analíticos. En (**d** y **e**) se muestran los valores medios \pm SD del porcentaje de células CD80⁺ y del nivel de expresión de CD80 (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, IF) correspondientes a dos experimentos independientes.

En cuanto a la expresión de CD36, únicamente el NO₂-CLA fue capaz de inducir un aumento en el porcentaje de células CD36⁺ (Figura 3.11b). Sin embargo, al evaluar el nivel de expresión de este receptor, se observó que tanto los NO₂-FA como la Rosi indujeron un aumento significativo comparado con el control del vehículo (Figura 3.11c).

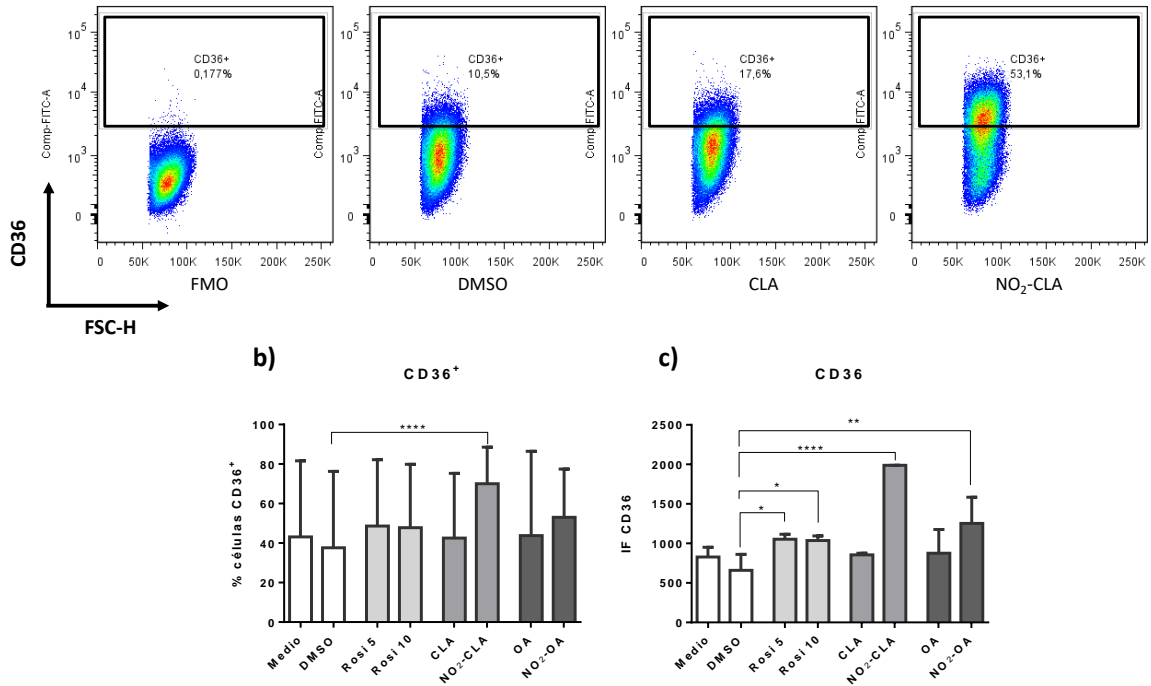


Figura 3.11: El condicionamiento de los BMDM con los NO₂-FAs aumentó la expresión en la membrana plasmática del receptor barrendero CD36

Se analizó por citometría de flujo el nivel de expresión de CD36 en las células BMDM obtenidas por condicionamiento con FA (10 μ M), NO₂-FA (10 μ M), Rosi (5 o 10 μ M) o DMSO como control. Para este análisis se seleccionaron células CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto} que constituyen la mayoría de los macrófagos BMDM obtenidos. En (a) se muestran gráficos de puntos correspondientes a la expresión de CD36 vs tamaño de células (FSC-H), los cuales son representativos de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. En (b) y (c) se muestran los valores medios \pm SD del porcentaje de células CD36⁺ y del nivel de expresión de CD36 (media geométrica de la intensidad de fluorescencia, IF), correspondientes a dos experimentos independientes. (*) Indica diferencias significativas con DMSO (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Tomando en cuenta todos los resultados del estudio de las poblaciones celulares y de los marcadores de superficie realizado sobre las células condicionadas, se puede concluir que la presencia de NO₂-FA o Rosi durante la diferenciación de precursores de médula ósea hacia macrófagos, generó una mezcla de células enriquecida en macrófagos, dentro de los cuales se definen dos poblaciones que difieren en su tamaño, pero no en el perfil de expresión de los marcadores de superficie analizados, siendo predominante la población de mayor tamaño (F4/80⁺FSC^{alto}). El condicionamiento con Rosi y NO₂-FA provocó una reducción en la expresión de MHCII y de CD86, y un aumento en la expresión de CD36, pero no alteró la expresión de CD80. En conjunto, estos resultados sugieren que el condicionamiento con NO₂-FA y Rosi induce un fenotipo de macrófago que debido a la disminución en MHCII y CD86 tiene disminuida su capacidad de funcionar como célula presentadora de antígenos, particularmente para recibir ayuda de células T CD4⁺ efectoras, mientras que ve aumentada su capacidad fagocítica a través del aumento en CD36. Este perfil podría contribuir a la capacidad de estas células de remover detritos celulares y facilitar la resolución de la inflamación.

3.3.3 El condicionamiento con NO₂-CLA se asoció con la presencia de un mayor contenido de FABP4, dependiente de la activación de PPAR γ .

Para evaluar la capacidad de los NO₂-FA de activar PPAR γ durante el proceso de diferenciación de los macrófagos, se trabajó únicamente con el NO₂-CLA, ya que como se comentó previamente se obtuvieron rendimientos muy bajos de células al condicionar con NO₂-OA. Brevemente, se diferenciaron los progenitores de médula ósea en presencia de distintas concentraciones de NO₂-CLA (1, 5 o 10 μ M), Rosi (1 o 5 μ M) o DMSO (control del vehículo) y, con el fin de inhibir a PPAR γ , previo al agregado de los estímulos se realizó una pre-incubación con GW9662 (5 o 10 μ M) o DMSO como control. Una vez completada la diferenciación, se evaluó por RT-qPCR la expresión de genes reporteros de PPAR γ como *Fabp4*, *Cd36* y la lipoprotein lipasa (*Lpl*). Los resultados mostraron que utilizando concentraciones entre 1 y 10 μ M de NO₂-CLA no se detectó un aumento en la expresión de *Fabp4*, aunque cuando se utilizó una concentración 1 μ M de NO₂-CLA se observó una tendencia a aumentar (Figura 3.12a) que no llegó a ser estadísticamente significativa. En contraste, la expresión de *Cd36* y *Lpl* aumentó de manera dosis dependiente con la concentración de NO₂-CLA, alcanzando la significancia estadística únicamente a 10 μ M del NO₂-CLA. (Figura 3.12b y c respectivamente); este resultado concuerda con el aumento en la expresión en membrana de este receptor determinada por citometría de flujo. Sin embargo, la respuesta de ninguno de estos dos genes resultó inhibida por la presencia de GW9662, sugiriendo que en los BMDM condicionados el efecto sobre la expresión de CD36 fue independiente de la activación de PPAR γ . En línea con estos resultados, no se detectaron aumentos en la expresión de *Fabp4*, *Cd36* ni *Lpl* bajo el condicionamiento con Rosi. Considerando que no pudimos detectar cambios en la expresión de genes que han sido considerados reporteros de la activación de PPAR γ , nos cuestionamos si la expresión del propio factor nuclear podría estar afectada, por lo que analizamos los niveles de expresión de *Pparg*. Los resultados mostraron cierto grado de variación en la expresión de *Pparg* en las células condicionadas, pero estas variaciones no fueron significativas. Llamó la atención sin embargo, que la expresión de *Pparg* se redujo significativamente cuando se condicionó con 10 μ M NO₂-CLA y 5 μ M GW9662, sugiriendo que existe cierto grado de activación de PPAR γ durante la diferenciación de los BMDM (Figura 3.12d). Esta observación contribuyó a que nos cuestionáramos si la ausencia de expresión de la *Fabp4* podría deberse a las condiciones experimentales utilizadas; sería posible que el tiempo al cual se analizó la respuesta no fuera el óptimo ya que para lograr la diferenciación completa de la célula, el análisis se realizó 48 h después de la estimulación con el NO₂-FA, y a este tiempo sería probable que se haya perdido un efecto diferencial a nivel del ARNm. Sin embargo, de existir un efecto sobre la expresión de *Fabp4*, sería factible que a las 48 h fuera medible a nivel de la proteína. Para evaluar esta posibilidad se realizó un análisis de los niveles proteicos de FABP4 al día final del condicionamiento de BMDM con los NO₂-FA, FA, Rosi o DMSO como control. El resultado obtenido (Figura 3.13) mostró que el condicionamiento con NO₂-FA así como con Rosi aumentó el contenido de FABP4 en los lisados celulares, y este aumento fue inhibido por la pre-incubación con el GW9662. Este resultado indicaría que los NO₂-FA son capaces de activar PPAR γ durante la diferenciación de los precursores mieloides hacia BMDM, aunque a las concentraciones de NO₂-FA y a los tiempos de estimulación y análisis utilizados no se logró detectar un aumento a nivel de la transcripción del gen *Fabp4*. Por las mismas razones que las consideradas para el análisis de la FABP4, no se puede descartar que PPAR γ participe en la inducción de *Cd36* y que el efecto a nivel de ARNm se haya perdido al tiempo de análisis usado.

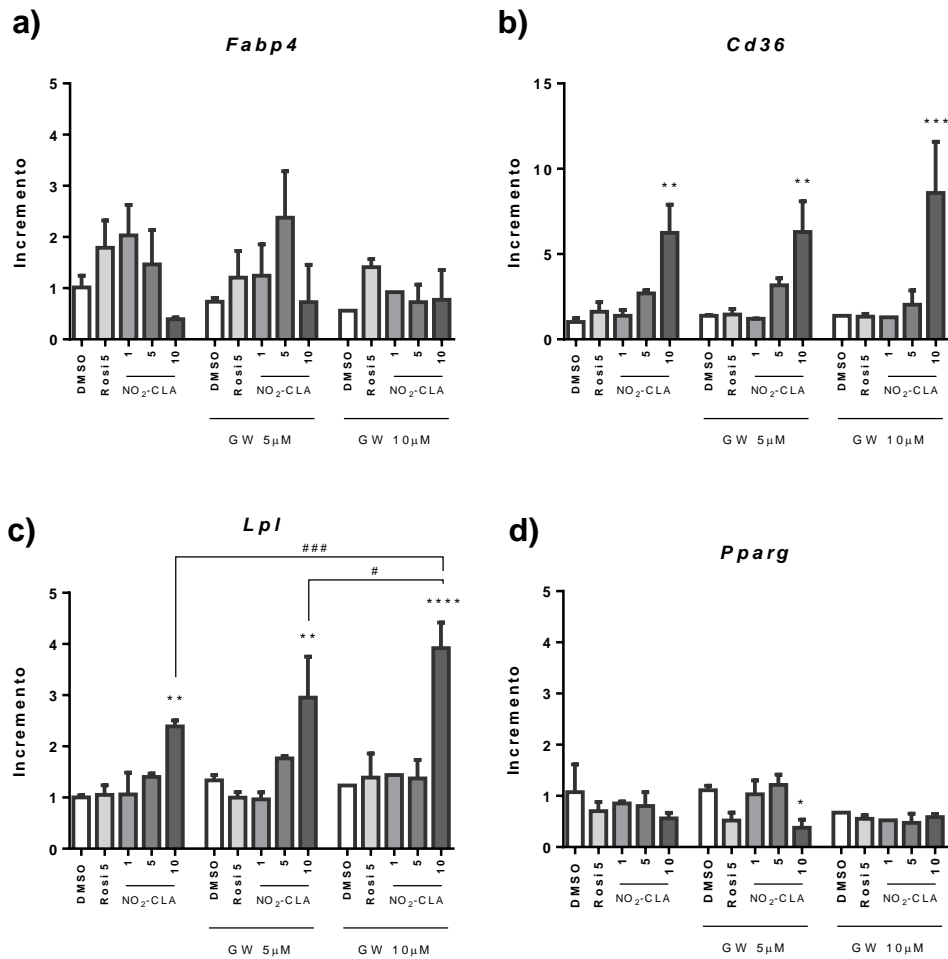


Figura 3.12: No se detectaron cambios dependientes de PPAR γ en la expresión de *Fabp4*, *Cd36* y *Lpl* en BMDM condicionadas con los NO₂-FA.

Se obtuvieron progenitores de médula ósea por diferenciación con M-CSF por 7 días. En los días 0 y 5 las células se pre-trataron con GW9662 (a distintas concentraciones por 30 min), y luego se estimularon con NO₂-CLA (1, 5 o 10 μ M) o Rosi (5 μ M). Se utilizó DMSO como control negativo. Las células se despegaron al séptimo día, se homogeneizaron para obtener el ARNm total y la expresión de *Fabp4* (a), *Cd36* (b), *Lpl* (c) y *Pparg* (d) se determinó por RT-qPCR normalizando contra el gen de la β -actina. Los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo control (DMSO). Las barras representan el promedio de duplicados biológicos \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con el DMSO/DMSO+GW (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (#) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con el NO₂-CLA 10 μ M y GW 10 μ M (ANOVA de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples # $p < 0.05$, #### $p < 0.001$).

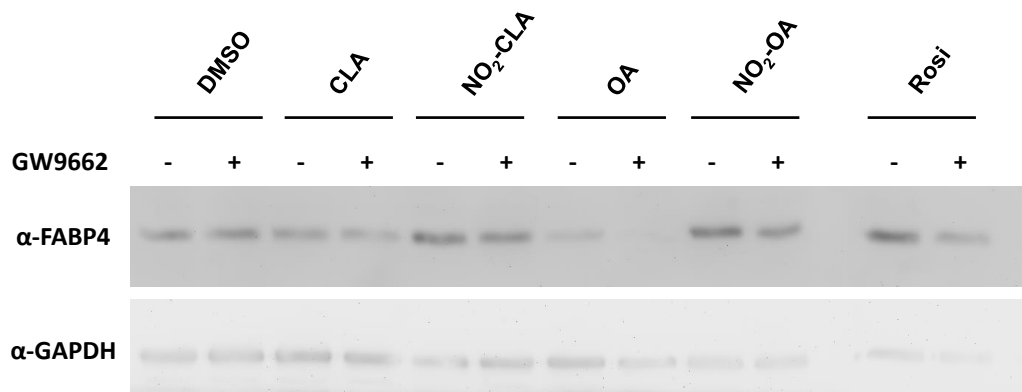


Figura 3.13: El condicionamiento de las BMDM con los NO₂-FA indujo un aumento en el contenido proteico de FABP4 que fue inhibido por GW9662.

Se obtuvieron progenitores de médula ósea por diferenciación con M-CSF por 7 días. En los días 0 y 5 las células se pre-trataron con GW9662 (a 5 μ M por 30 min), y luego se estimularon con NO₂-CLA (10 μ M) o Rosi (5 μ M). Se utilizó DMSO como control negativo. Al séptimo día se lisaron las células para evaluar la expresión de FABP4 a nivel proteico por Western blot, usando el anticuerpo anti-rFABP4 purificado por afinidad (ver Materiales y Métodos). En paralelo se controló la cantidad total del extracto sembrado en cada carril determinando los niveles de la proteína constitutiva GAPDH, con un anticuerpo IgM de ratón anti-GAPDH. Posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpos anti-IgG de conejo y anti-IgM de ratón conjugados a peroxidasa. Finalmente se utilizó un sustrato quimioluminiscente para el revelado. Se muestra un resultado representativo del Western blot.

3.3.4 Efecto del condicionamiento con NO₂-FA sobre la respuesta de los BMDM a estímulos de tipo clásico o alternativo y el posible papel de la FABP4 en dicho condicionamiento

Hasta ahora comprobamos que el condicionamiento con NO₂-FA modificó el fenotipo de los BMDM, en cuanto a la expresión de moléculas de superficie así como también al aumento del contenido de FABP4, este último dependiente de la activación PPAR γ . Para definir si estos cambios se acompañan de una alteración para responder a estímulos inflamatorios, se propuso estudiar la respuesta de los BMDM condicionados por NO₂-FA o sus controles (FA o DMSO) frente a estímulos de tipo clásico (LPS) y alternativo (IL4). Además, dado que la expresión de FABP4 estaría aumentada, se exploró en qué medida la señalización de los NO₂-FA en monocitos/macrófagos expuestos a los distintos estímulos se afectaba tras la inhibición de la proteína. En este sentido es importante recordar que los distintos estímulos (LPS o IL4) pueden variar las concentraciones de FABP4 así como el conjunto de ligandos endógenos que compitan con los NO₂-FA por la unión a la FABP4, modificando en última instancia la distribución celular y la actividad señalizadora de los NO₂-FA.

Básicamente el diseño experimental implicó condicionar a los progenitores durante su desarrollo a BMDM con los NO₂-FA, en presencia o ausencia del inhibidor de la FABP4, y enfrentarlos posteriormente a LPS o IL4, para determinar el efecto sobre los principales marcadores de activación celular. En primer lugar, se ajustaron las condiciones óptimas de concentración así como de tiempo de estimulación de las células para cada uno de los estímulos por separado (LPS e IL4). Se buscó determinar las condiciones donde los BMDM respondieran claramente a ambos estímulos sin llegar a la saturación, para luego poder visualizar el efecto causado por el condicionamiento en presencia de NO₂-FA y la inhibición de la FABP4.

3.3.4.a Respuesta de los BMDM condicionados frente al LPS y el posible papel de la FABP4

Para ajustar las condiciones de estimulación con LPS, se examinó la respuesta de BMDM frente a tres concentraciones de dicho estímulo (1, 10 y 100 ng/ml) y durante distintos tiempos (3, 6 y 9 h). Luego del tiempo de estimulación se evaluó la expresión de genes reporteros como *Nos2* e *Il6* (Figura 3.14), que codifican para dos moléculas efectoras importantes del macrófago inflamatorio la sintasa de óxido nítrico y la interleuquina 6. Para ambos genes se registraron buenos niveles de

inducción en los tres tiempos evaluados, que mostraron ser dependientes de la concentración de LPS utilizada. Incluso los menores incrementos registrados fueron elevados, siendo para el tiempo de 3 h y LPS 1 ng/ml, 1000 veces para *Nos2* y cercano a 500 veces para *I16*. Se eligió continuar trabajando con las concentraciones 1 y 10 ng/ml, y a tiempo final 3 h, ya que para ambos genes se observó una buena respuesta lejos de la saturación.

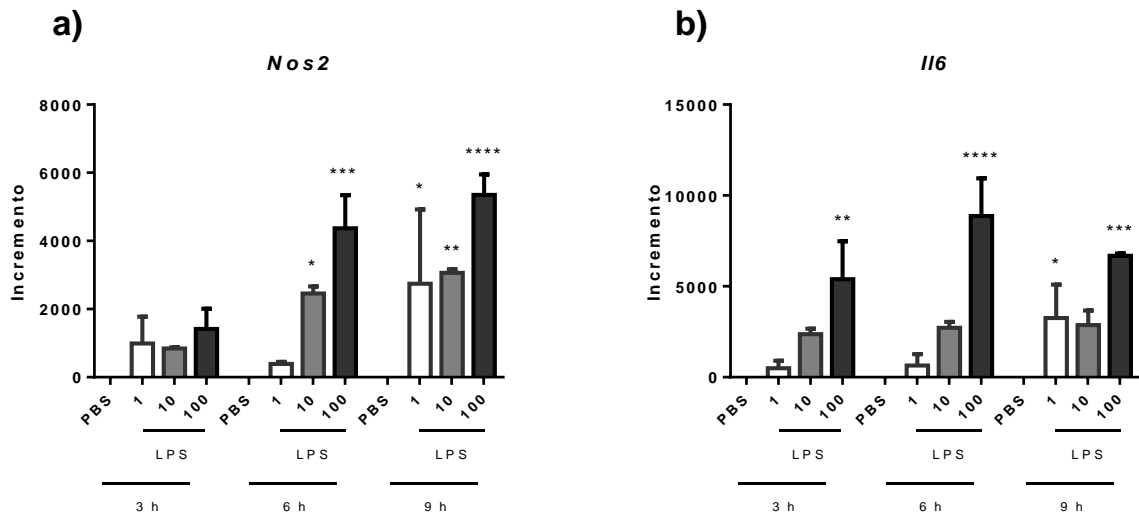


Figura 3.14: El tratamiento de BMDM con LPS indujo la expresión de los genes *Nos2* e *I16*, de forma dosis dependiente.

Se obtuvieron progenitores de médula ósea y se diferenciaron con M-CSF por 7 días. Al séptimo día se descartó el medio y se agregó LPS a 1, 10 o 100 ng/ml en DMEM 1 % SFB por 3, 6 o 9 h. Se utilizó PBS como control negativo. Luego de la estimulación se homogeneizaron las células para obtener el ARNm total y la expresión de *Nos2* (a) e *I16* (b) se determinó por RT-qPCR normalizando contra el gen de la β -actina. Los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo PBS. Las barras representan el promedio de duplicados biológicos \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con el PBS 3 h/PBS 6 h/ PBS 9 h (ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$).

Una vez decididas las condiciones del ensayo con LPS, se incubaron los progenitores de médula ósea con NO_2 -CLA, CLA, Rosi o DMSO (vehículo) como control, en presencia o ausencia de BMS. Finalizados los 7 días, las células se enfrentaron a LPS y luego se evaluó la expresión de varios marcadores de activación clásica. En la Figura 3.15 se muestran los resultados de dos experimentos independientes que presentaron el mismo perfil de inducción pero valores absolutos distintos, por lo cual para representar el conjunto de los resultados se realizó una normalización con respecto al tratamiento con DMSO+LPS 10 ng/ml, que se tomó como el 100 % de expresión en cada experimento. Se observó que el condicionamiento con NO_2 -CLA logró reducir de manera significativa el aumento en la expresión de *Nos2* e *I16* inducido por LPS 10 ng/ml (Figura 3.15, indicado con *), mientras que se observó una tendencia en el mismo sentido que no llegó a ser significativa a 1 ng/ml de LPS. Por otra parte, el bloqueo de la FABP4 no modificó el resultado, sugiriendo que la inhibición de la respuesta al LPS mediada por NO_2 -CLA es independiente de la actividad de la FABP4. También se estudió la expresión de *I17b*; en este caso se observó que los niveles inducidos por NO_2 -CLA mostraron una tendencia a ser menores que los inducidos por el control, pero esta tendencia no alcanzó la significancia estadística.

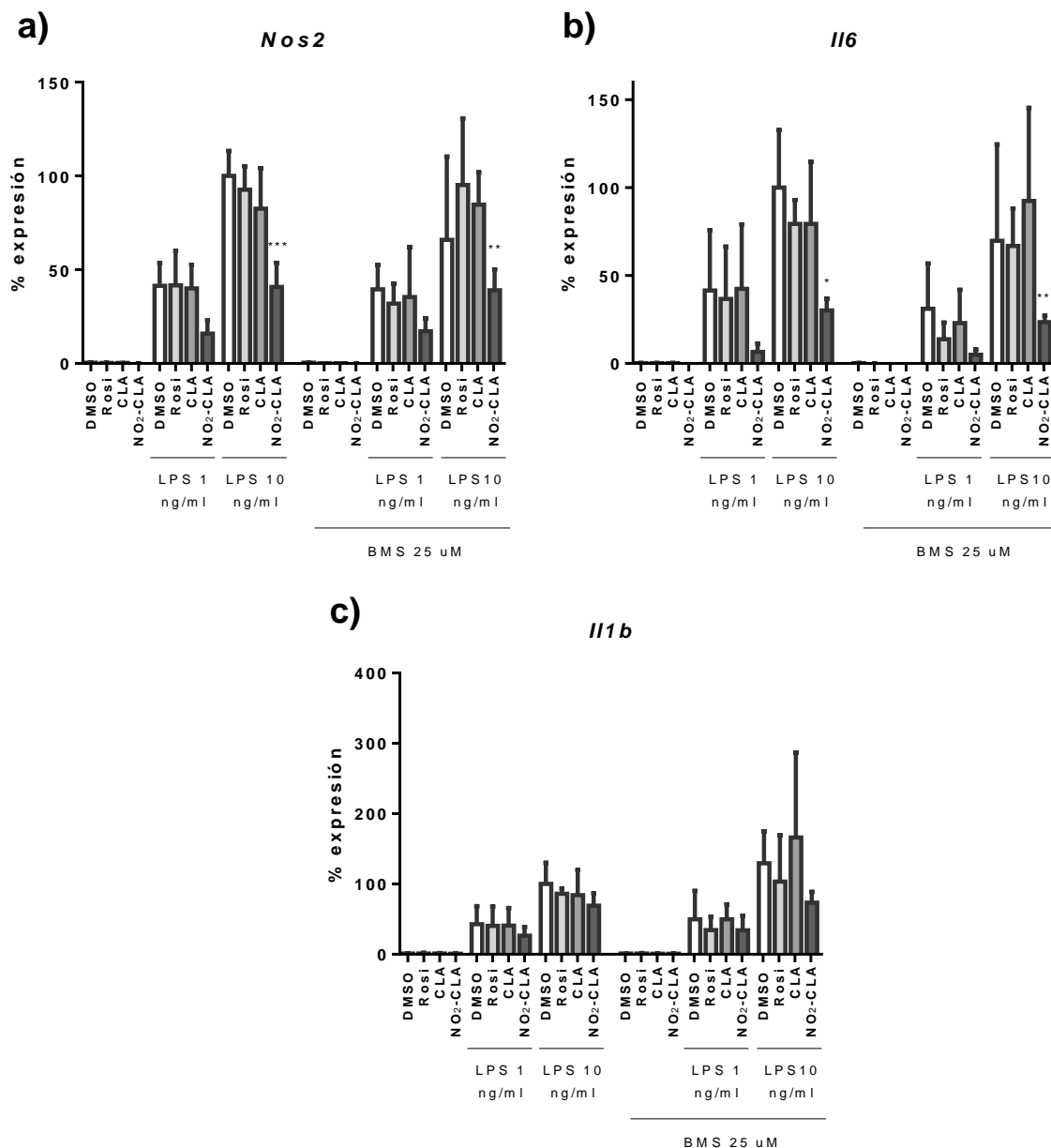


Figura 3.15: La inhibición de la expresión de *Nos2* e *Il6* mediada por el NO₂-CLA en BMDM condicionados es independiente de la actividad de la FABP4

Se obtuvieron progenitores de médula ósea y se diferenciaron con M-CSF por 7 días. En los días 0 y 5 se agregó BMS 25 μ M por 2 h y luego se agregó CLA o NO₂-CLA a 10 μ M o Rosi a 5 μ M. Se utilizó DMSO como control negativo. Al séptimo día se descartó el medio y se agregó LPS a 1 o 10 ng/ml por 3 h. Luego de la estimulación se homogeneizaron las células para obtener el ARNm total y la expresión de *Nos2* (a), *Il6* (b) e *Il1b* (c) se determinó por RT-qPCR normalizando contra el gen de la β -actina. Los resultados se muestran como porcentaje de expresión tomando como 100 % la expresión de los genes inducida por DMSO+LPS 10 ng/ml. Las barras representan el promedio de dos experimentos independientes \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con DMSO+LPS 10 ng/ml o DMSO+LPS 10 ng/ml+BMS (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.3.4.b Respuesta de los BMDM condicionados a IL4 y el posible papel de la FABP4

De manera similar al tratamiento con LPS, utilizando BMDM se testearon dos concentraciones de IL4 a diferentes tiempos y se evaluó la expresión de genes reporteros de la activación alternativa como ser *Arg1*, *Chi3l3* (Ym1) y *Mrc1* (receptor de manosa) (Figura 3.16). Para los tres genes se logró una inducción dosis dependiente por parte de la IL4 a los 3 tiempos estudiados, siendo la *Arg1* la que mostró el mayor incremento (cerca a 60 veces a las 6 h de IL4 0.5 ng/ml, Figura 3.16a), mientras que *Chi3l3* y *Mrc1* fueron similares entre sí y menores a *Arg1* (3 y 2.5 veces a las 6 h e IL4 1 ng/ml para *Chi3l3* y *Mrc1*, respectivamente). Como condiciones finales, se decidió mantener ambas dosis de IL4 y usar 6 h como tiempo de estimulación ya que trabajar con las dos concentraciones ayudaría a ver la dependencia con la concentración y a ese tiempo se observaron buenos niveles de inducción.

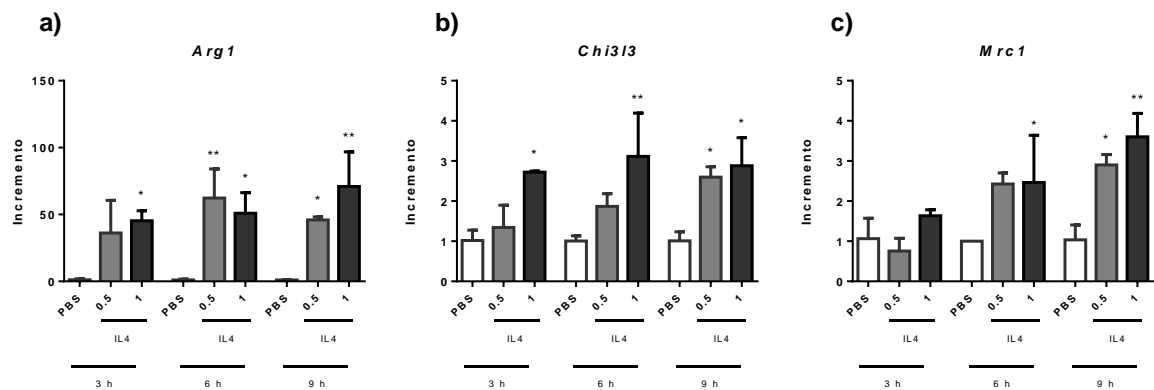


Figura 3.16: El tratamiento de BMDM con IL4 indujo la expresión de los genes *Arg1*, *Chi3l3* y *Mrc1* de forma dosis dependiente

Se obtuvieron progenitores de médula ósea y se diferenciaron con M-CSF por 7 días. Al séptimo día se descartó el medio y se agregó IL4 a 0.5 o 1 ng/ml en DMEM 1 % SFB por 3, 6 o 9 h. Se utilizó PBS como control negativo. Luego de la estimulación se homogeneizaron las células para obtener el ARNm total y la expresión de *Arg1* (a), *Chi3l3* (b) y *Mrc1* (c) se determinó por RT-qPCR normalizando contra el gen de la β -actina. Los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo PBS. Las barras representan el promedio de duplicados biológicos \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con el PBS 3 h/PBS 6 h/ PBS 9 h (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Posteriormente, se condicionaron los progenitores con NO_2 -CLA, CLA, Rosi o DMSO como control, en presencia o ausencia de BMS. Luego de los 7 días, se realizó el tratamiento con IL4 y se evaluó la expresión de marcadores de activación alternativa. Al igual que para la expresión de los marcadores clásicos, los experimentos independientes mostraron el mismo comportamiento en cuanto a la inducción de *Arg1*, pero las respuestas tuvieron distinta intensidad, por lo que con el fin de informar el promedio de los resultados se tuvieron que normalizar los valores. Es así, que se calculó la inducción de la *Arg1* relativa al tratamiento conjunto con Rosi e IL4 a 1 ng/ml en cada experimento, el cual se tomó como 100% de incremento (Figura 3.17a). Los resultados indican que el NO_2 -CLA y Rosi lograron potenciar de manera significativa la expresión de *Arg1* inducida por IL4 1 ng/ml, desde un 68 % a un 100 % de inducción al combinar IL4+ NO_2 -CLA o IL4+Rosi (Figura 3.17a, indicado con un *). En cambio, al bloquear la actividad de la FABP4 no sólo disminuyeron los niveles de *Arg1* inducidos por la administración de IL4 junto con el vehículo (desde 68 % a 37% de inducción), sino que la potenciación por parte del NO_2 -CLA o Rosi se anuló por completo, indicando que la FABP4 participa activamente en los efectos mediados por el NO_2 -CLA y Rosi sobre la expresión de este gen (Figura 3.17a, indicado con un #). Por otra parte, la potenciación de la

expresión de *Arg1* correlacionó con un aumento en la actividad arginasa en los lisados celulares (como se determinó en un único experimento, no fue posible realizar un análisis estadístico).

También se evaluaron otros marcadores de diferenciación alternativa como ser *Mrc1*, *Retnla* (Relma), *Chi3l3*, *Fabp4*, *Cd36* e *Il10* (Figura 3.18). Este último no es un marcador exclusivamente alternativo, pero se ha reportado que el tratamiento con IL4 lo induce ²⁴⁹. Resultó interesante evaluar estos genes en particular debido a que se agrupan en subconjuntos que presentan una regulación extra además de la ejercida por la IL4. Es así que *Retnla* junto con *Arg1* forman un subconjunto controlado por la vía de Akt/mTORC1, mientras que *Chi3l3*, *Fabp4* y *Cd36* son denominados como independientes de Akt/mTORC1 ²⁵⁰. Por su parte, *Fabp4* y *Cd36* son regulados además por PPAR γ y la IL4 puede potenciar su expresión ^{9,251}. Al estudiar el efecto de la IL4 sobre *Mrc1*, *Retnla* y *Chi3l3*, se logró ver una tendencia al aumento de la expresión dependiente de la dosis de IL4 utilizada, que llegó a ser significativa para *Mrc1* y *Retnla* (Figura 3.18a, indicado con ^). Para *Chi3l3* y en menor medida para *Retnla* se observaron tendencias compatibles con un efecto potenciador del NO₂-CLA y la Rosi, principalmente a la concentración 1 ng/ml de IL4, pero que no llegó a ser significativa. Contrariamente, no se observó efecto potenciador del NO₂-CLA en la expresión de *Mrc1* (Figura 3.18a). Cabe mencionar que para estos tres genes no se observó dependencia de la actividad de FABP4, ya que en presencia de BMS no se modificaron los perfiles de expresión. Por su parte, la expresión *Fabp4*, *Cd36* e *Il10* no se modificó en respuesta a la IL4 y para el caso de *Fabp4* e *Il10* tampoco se observaron efectos por parte del NO₂-CLA ya sea de inducción y/o potenciación de la expresión génica en ausencia o presencia de BMS (Figura 3.18d-f). El hecho de que la expresión de *Fabp4* no se haya modificado en presencia de BMS es particularmente importante ya que indica que no se afectaron los niveles basales de la proteína por el tratamiento con el inhibidor (Figura 3.18d), lo cual podría alterar la interpretación de los resultados. Finalmente, para el caso de *Cd36*, se observó una inducción significativa por parte del NO₂-CLA y en menor medida de la Rosi (Figura 3.18e, indicado con *) que fue independiente de la concentración de IL4, pero que disminuyó en presencia de BMS (Figura 3.18e, indicado con #), mostrando cierta dependencia de la FABP4.

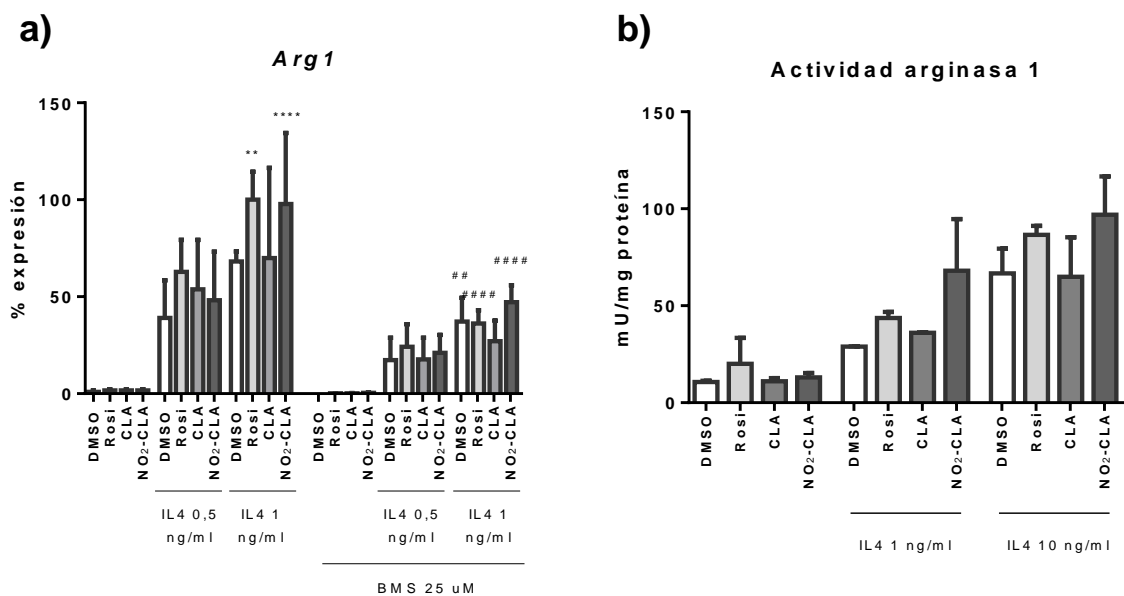
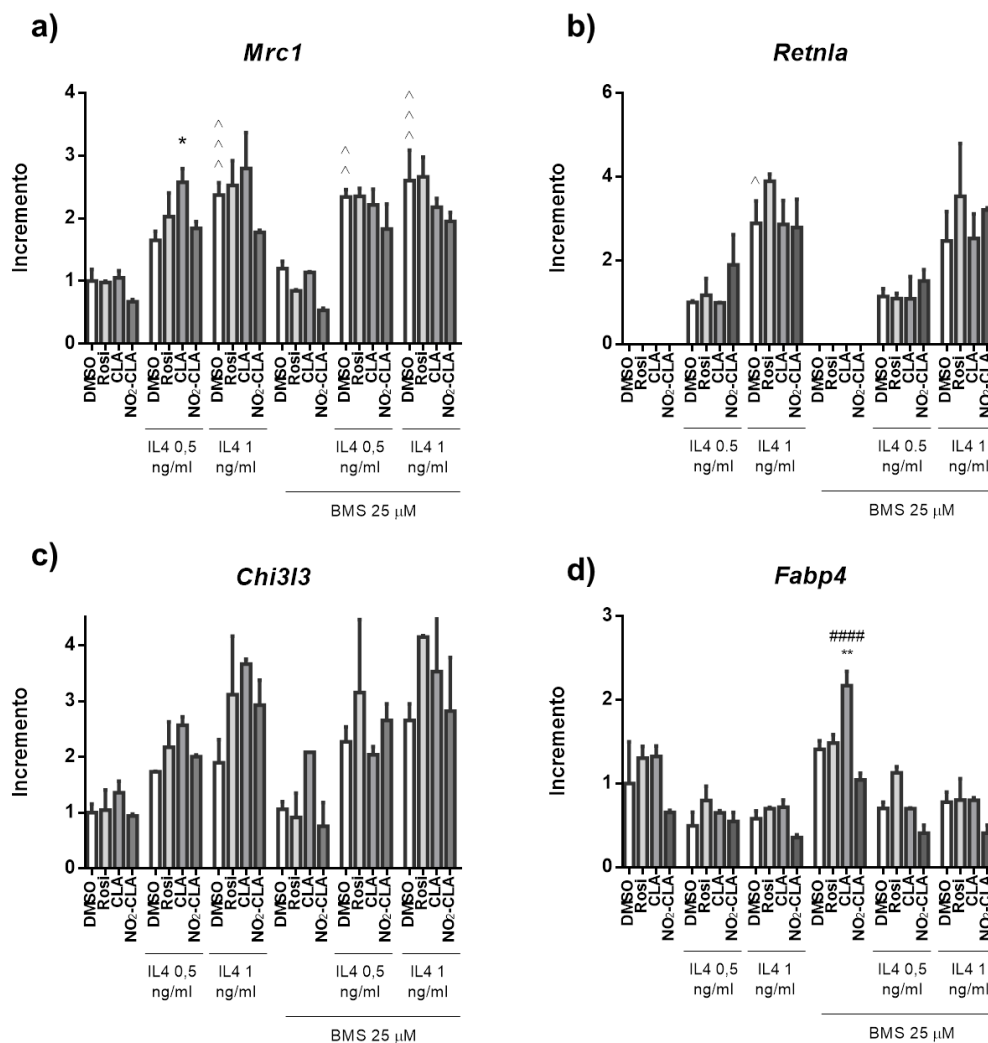


Figura 3.17: Los NO₂-FA son capaces de potenciar la expresión y actividad de la arginasa 1 inducida por la IL4, por un mecanismo dependiente de la FABP4.

Se obtuvieron progenitores de médula ósea y se diferenciaron con M-CSF por 7 días. En los días 0 y 5 se agregó BMS 25 μ M por 2 h y luego se agregó CLA o NO₂-CLA a 10 μ M o Rosi a 5 μ M. Se utilizó DMSO como control negativo. Al séptimo día se descartó el medio y se agregó IL4 (0.5 o 1 ng/ml) por 6 h para los ensayos de expresión (a), o se agregó IL4 (1 o 10 ng/ml) por 24 h para los ensayos de actividad (b). Luego de la estimulación se homogeneizaron las células para obtener el ARNm total y la expresión de *Arg1* se determinó por RT-qPCR cuantitativa normalizando contra el gen de la β -actina (a). Los resultados se muestran como porcentaje de expresión tomando como 100 % la expresión de *Arg1* inducida por la Rosi+IL4 1 ng/ml. Las barras representan el promedio de dos experimentos independientes \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con DMSO+IL4 1 ng/ml (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). (#) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con el mismo tratamiento sin inhibidor (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, ## $p < 0.01$, #### $p < 0.001$). Luego de 24 h se lisaron las células y se midió la actividad arginasa por ensayos enzimáticos, utilizando L-Arginina como sustrato de la reacción. Luego de 2 h se frenó la reacción y se midió la urea generada por adición de un sustrato coloreado e interpolación en una curva de calibración (b). Los resultados se muestran como mU/mg de proteína, que corresponde a los mmoles de urea generados por segundo, normalizados por la cantidad de proteína en la muestra. Las barras corresponden al promedio de réplicas analíticas \pm SD.



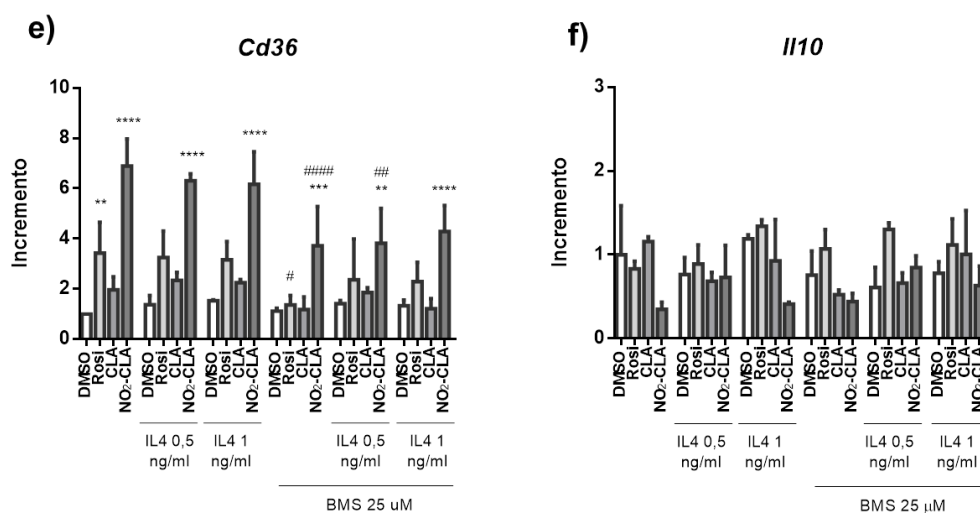


Figura 3.18: La expresión de varios marcadores de diferenciación alternativa inducidos por la IL4 en BMDM condicionados son independientes de la actividad de la FABP4.

Se obtuvieron progenitores de médula ósea y se diferenciaron con M-CSF por 7 días. En los días 0 y 5 se agregó BMS 25 μ M por 2 h y luego se agregó CLA o NO₂-CLA a 10 μ M o Rosi a 5 μ M. Se utilizó DMSO como control del vehículo. Al séptimo día se descartó el medio y se agregó IL4 a 0.5 o 1 ng/ml por 6 h. Luego de la estimulación se homogeneizaron las células para obtener el ARNm total y la expresión de *Mrc1* (a), *Retnla* (b), *Chi3l3* (c), *Fabp4* (d), *Cd36* (e) e *Il10* (f) se determinó por PCR cuantitativa normalizando contra el gen de la β -actina. Los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo DMSO. Las barras representan el promedio de réplicas analíticas \pm SD, con excepción de *Retnla* y *Cd36* que corresponden al promedio de dos experimentos independientes \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con DMSO/DMSO+IL4 0.5/DMSO+IL4 1 ng/ml (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). (^) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con DMSO/DMSO+BMS (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, ^^ $p < 0.01$, ^^ ^ $p < 0.001$).

En conclusión los resultados indican que la FABP4 no estaría involucrada en los mecanismos anti-inflamatorios asociados al condicionamiento con los NO₂-FA que modulan la respuesta de los macrófagos al LPS. En cambio, el condicionamiento con los NO₂-FA potenció la activación alternativa, inducida por IL4, de los BMDM, al menos en lo que refiere a la expresión y actividad de arginasa 1. Esta potenciación si dependió de la actividad de la FABP4. Considerando que la IL4 es capaz de aumentar la expresión de PPAR γ así como de ligandos endógenos del factor nuclear, que además se ha vinculado la activación alternativa y en particular la expresión de *Arg1* con la activación de PPAR γ y que los NO₂-FA activaron PPAR γ durante la diferenciación de los BMDM, se podría establecer un eje IL4/ PPAR γ /FABP4, que sería estimulado por los NO₂-FA contribuyendo a la respuesta de tipo alternativa en monocitos/macrófagos.

3.3.5 Estudio *in vivo* de la capacidad de ligandos de PPAR γ de potenciar la activación alternativa de los macrófagos inducida por IL4

Los resultados obtenidos mostraron que el condicionamiento con NO₂-CLA modificó la capacidad de los BMDM condicionados de activarse *in vitro* en respuesta a estímulos de tipo clásico como el LPS, y de tipo alternativo como la IL4. En particular, los BMDM condicionados con NO₂-CLA expresaron niveles mayores de *Arg1* en respuesta a la IL4, de manera dependiente de la

actividad de la FABP4 y, posiblemente de PPAR γ , dado que este receptor contribuyó al aumento en los niveles de FABP4 observado en los BMDM condicionados con NO₂-FA. Nos interesó examinar si este perfil de activación de tipo regulatorio o alternativo podría ser inducido por el NO₂-CLA en un modelo *in vivo*, donde el NO₂-CLA se administre en forma conjunta con la IL4. En estudios preliminares realizados por nuestro grupo la inyección intraperitoneal (i.p.) de NO₂-OA en conjunto con IL4 y alúmina provocó un aumento en la expresión temprana (8 h) de algunos marcadores alternativos como *Arg1*, *Mrc1* y *Chi3l3*²⁵². En este modelo se utilizó la alúmina como matriz para adsorber a la IL4 y protegerla de la degradación, pero su presencia tuvo ciertos efectos inhibitorios sobre la inducción del fenotipo alternativo por lo cual se optó por explorar otros modelos tradicionalmente utilizados para examinar la activación alternativa de los macrófagos. Un modelo ampliamente aceptado consiste en la inyección por vía i.p. del complejo IL4:anticuerpo anti-IL4 (IL4c); esta forma de administración protege a la citoquina de la degradación alargando su vida media. Además, en el modelo de IL4c se ha logrado medir no sólo los efectos sobre la expresión de genes de tipo alternativos, sino también la capacidad de la IL4 de promover la proliferación de los macrófagos¹⁹⁹. En este sentido, la inyección subcutánea de un análogo de la timidina llamado 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) previo al punto final del experimento, permite evidenciar cambios en la tasa de proliferación inducida por la IL4, debido a que se incorpora en el ADN de las células en proliferación. Todos los estudios que se describen a continuación se realizaron en colaboración con el grupo de investigación dirigido por la Dra. J. Allen (*Institute for Immunology and Infection Research, School of Biological Science, University of Edinburgh*), y permitieron explorar la capacidad de ligandos de PPAR γ , incluyendo los NO₂-FA, de influenciar la activación alternativa de los macrófagos *in vivo*.

Haciendo uso del modelo de IL4c, en primer lugar se evaluó si un activador total de PPAR γ como la Rosi potenciaba el fenotipo alternativo inducido por la IL4c y la proliferación de macrófagos peritoneales, para en una segunda etapa estudiar el efecto de los NO₂-FA, ya que la cantidad y forma de dosificarlos representó un punto crítico para los estudios. Se suministró IL4c y 0.035 μ moles de Rosi por vía i.p. (dosis previamente utilizada en los experimentos *in vivo* realizados en nuestro laboratorio con el modelo con alúmina²⁵²) y luego de 24 o 48 h se recuperaron las células de la cavidad peritoneal, y se evaluó por citometría de flujo la expresión de *Arg1* y la proliferación por incorporación de BrdU y expresión del marcador intracelular Ki67.

Se siguió la estrategia de selección detallada en la Figura 3.3 de Materiales y Métodos, con el fin de diferenciar las poblaciones de macrófagos presentes en el peritoneo. Como ya se mencionó se diferenciaron dos grupos, los macrófagos residentes definidos como F4/80^{alto}MHCII^{med} y los macrófagos reclutados definidos como F4/80^{med}MHCII^{alto}. Los resultados mostraron que el tratamiento con Rosi no modificó el porcentaje de células *Arg1*⁺ o la intensidad de fluorescencia de la expresión de *Arg1* a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 3.19a, b, d, y e), si bien se observó una tendencia al aumento en ambos parámetros a las 24 h en los macrófagos reclutados, que no llegó a ser significativa (Figura 3.19c y f). Tampoco se detectó aumento en la expresión de *Arg1* por RT-qPCR, si bien estos tiempos podrían no ser los óptimos para la detección del aumento a nivel del ARNm (Figura 3.19g). Además, buscando evidencias de la activación PPAR γ se examinaron los niveles de ARNm de *Fabp4* y *Cd36*. Se observó una tendencia al aumento de la expresión de *Fabp4* mediada por la Rosi a las 24 h (Figura 3.19h) y una tendencia similar pero de menor magnitud para *Cd36* (Figura 3.19i). Sin embargo, en ninguno de los casos se alcanzó la significancia estadística aunque como mencionamos para la *Arg1*, los tiempos de análisis (24 y 48 h) posiblemente no

coincidan con el pico de expresión de los mensajeros de *Fabp4* y *Cd36* y la tendencia observada podría estar reflejando la caída luego de un pico de expresión. Además, en este caso el análisis por RT-qPCR no permite estudiar la expresión génica únicamente en la población de macrófagos, lo cual oscurece el resultado. Por otra parte, se evaluaron los efectos de la Rosi sobre la proliferación de macrófagos inducida por IL4. Se encontró que la Rosi no alteró la proliferación de los macrófagos inducida por IL4 a ninguno de los tiempos examinados, aún cuando se analizaron por separado las poblaciones $F4/80^{\text{med}}$ y $F4/80^{\text{alto}}$ (Figura 3.20). Globalmente, los resultados sugieren que hubo una leve activación de PPAR γ por parte de la Rosi en los macrófagos recientemente reclutados, pero que no llegó a ser suficiente como para inducir una potenciación significativa de los marcadores alternativos. Esto podría ser compatible con la idea de que las células respondedoras a la activación de PPAR γ , serían sobre todo los macrófagos reclutados más que los residentes. Con esto en mente, buscamos un modelo donde se induzca una mayor infiltración celular de forma que la población de macrófagos reclutados constituya la fracción mayoritaria de la muestra.

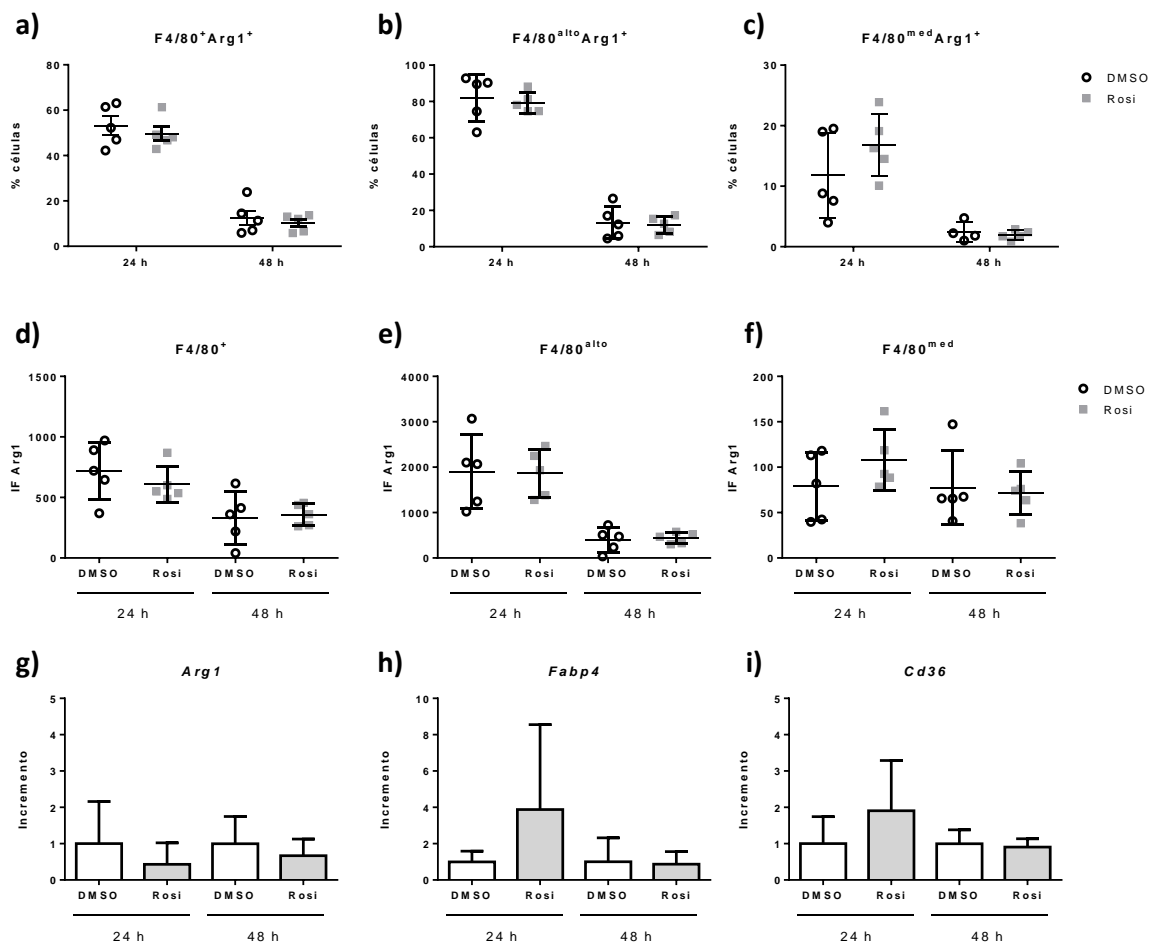


Figura 3.19: *In vivo* no se detectó potenciación por la Rosi de la expresión de *Arg1* inducida por IL4c en macrófagos peritoneales.

Se obtuvieron células de la cavidad peritoneal de ratones después de 24 o 48 h del tratamiento con IL4c y Rosi (0.035 μ moles) o IL4c y DMSO como control. Paneles (a-f) Análisis por citometría de flujo de los niveles de Arg1. Se muestran el porcentaje de células Arg1 $^+$ (a-c) y la intensidad de fluorescencia de la expresión de Arg1 (d-f) en la totalidad de los macrófagos $F4/80^+$ (a y d), en los macrófagos residentes $F4/80^{\text{alto}}$ (b y e) y en los macrófagos reclutados $F4/80^{\text{med}}$ (c y f). Paneles (g-i) análisis por RT-qPCR de la expresión de *Arg1* (g), *Fabp4* (h) y *Cd36* (i) (normalizando contra el gen *18S*) en el total de las células peritoneales. Los resultados se

muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo control a las 24 o 48 h (DMSO). En todos los casos, los datos se expresan como el promedio \pm SD (n=5).

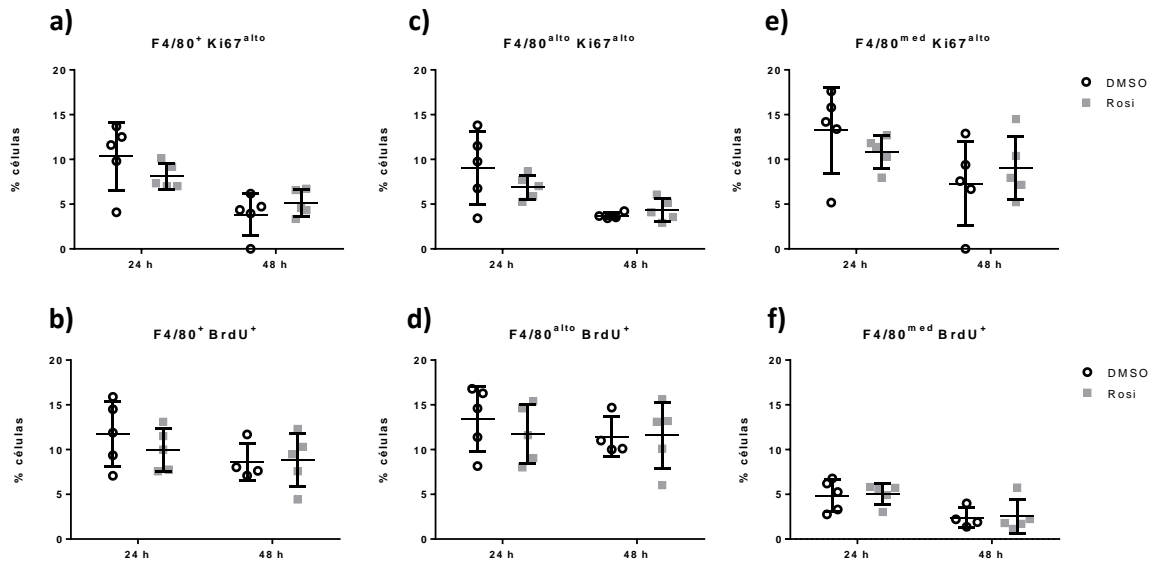


Figura 3.20: El tratamiento con Rosi no modificó la proliferación inducida por IL4c de los macrófagos peritoneales

Se obtuvieron células de la cavidad peritoneal de hembras Balb/c después de 24 o 48 h del tratamiento con IL4c (1 µg) y Rosi (0.035 µmoles) o IL4c y DMSO como control. Se analizó la proliferación de los macrófagos por citometría de flujo determinando la expresión de Ki67 o la incorporación de BrdU en la población de macrófagos F4/80⁺, la cual se informa como porcentaje de células positivas para cada marcador. Se muestran los resultados del análisis realizado sobre la totalidad de los macrófagos (**a y b**), la subpoblación de macrófagos residentes F4/80^{alto} (**c y d**) y a la subpoblación de macrófagos reclutados F4/80^{med} (**e y f**). Los resultados se expresan como el promedio de los individuos (barras horizontales) \pm SD (n=5).

3.3.6 Estudios *in vitro* e *in vivo* de la capacidad de los NO₂-FA de potenciar los efectos de la IL4 en macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato

3.3.6.a Los NO₂-FA activaron PPAR γ y potenciaron la expresión de *Arg1* inducida por IL4 en macrófagos reclutados al peritoneo *in vitro*

Las observaciones obtenidas *in vitro* sobre la capacidad de los NO₂-FA de activar PPAR γ en monocitos y macrófagos, y los resultados utilizando el modelo descrito en el punto 3.3.5, sugirieron que los monocitos reclutados a un sitio inflamatorio, que comienzan su diferenciación a macrófagos, tendrían mayor capacidad de responder a los ligandos de PPAR γ , lo cual está de acuerdo con la escasa literatura en el tema²⁰⁶. Esto nos llevó a diseñar un modelo de estudio que nos permitiera evaluar los efectos sobre monocitos inflamatorios reclutados en el peritoneo. Se decidió utilizar como estímulo inflamatorio el tioglicolato, ya que se ha descrito que induce la infiltración de varios tipos celulares a la cavidad peritoneal (neutrófilos, eosinófilos y monocitos), pero a los tres días post-inyección la población más abundante es la de macrófagos recientemente reclutados²⁵³. Además, la administración de tioglicolato conduce al reclutamiento de una gran cantidad de células y los macrófagos reclutados expresan altos niveles de PPAR γ ²⁰³, lo cual

favorecería detectar el efecto de los NO₂-FA. El diseño propuesto implicó por tanto inyectar tioglicolato en el peritoneo y a los tres días post-inyección realizar una estimulación con IL4c en presencia o ausencia de NO₂-FA. Con esta idea en mente, en primer lugar quisimos evaluar *in vitro*, si los macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato eran capaces de responder a los NO₂-FA evaluando la activación de PPAR γ por RT-qPCR. Para ello, se recuperaron las células peritoneales a los tres días de la inyección de tioglicolato, se sembraron en placas de cultivo y se enriqueció la muestra en macrófagos por adherencia al plástico. Posteriormente se estimularon las células con diferentes concentraciones (1, 2.5, 5 y 10 μ M) de NO₂-CLA, NO₂-OA o sus FA precursores, y se utilizó DMSO como control. Luego de 6 h se evaluó la expresión de *Fabp4* por RT-qPCR. Los resultados mostraron que los NO₂-FA no modificaron la expresión de *Fabp4* en comparación con el control. Sin embargo, se observó nuevamente que la expresión de *Fabp4* tendió a ser mayor luego del tratamiento con NO₂-CLA 2.5 μ M y NO₂-OA 1 μ M, aunque esta tendencia no llegó a ser estadísticamente significativa (Figura 3.21a). Por su parte, la Rosi mostró una tendencia en el mismo sentido que los NO₂-FA e incluso mayor, que de todos modos tampoco alcanzó la significancia estadística (Figura 3.21a). Sin embargo, al aumentar el número de experimentos independientes donde se probaron únicamente las concentraciones que mostraban una tendencia al aumento, se verificó que el efecto del NO₂-CLA a 2.5 μ M indujo significativamente la expresión de *Fabp4* (Figura 3.21b, indicado con un *). Mientras que para el NO₂-OA se siguió viendo una tendencia no significativa (Figura 3.21b).

Por otra parte, se ha descrito que la expresión de la *Fabp4* inducida por activación de PPAR γ en macrófagos murinos es potenciada por el tratamiento con IL4⁹. Por tanto, buscando hacer más visible el efecto de los NO₂-FA observado en los macrófagos reclutados con tioglicolato, se repitieron los experimentos anteriores en presencia de esta citoquina y se evaluaron cambios en la expresión de *Fabp4*. En este caso, se evidenció un aumento significativo de la expresión de *Fabp4* inducida por ambos NO₂-FA en presencia de IL4 en comparación con el control (Figura 3.21c, indicado con un *). Por su parte el CLA también indujo un aumento significativo de la *Fabp4*, pero fue menor que el del NO₂-CLA (Figura 3.21c, indicado con #). En estas mismas muestras se evaluó la expresión de la *Arg1*, observándose tal como se esperaba que el tratamiento con IL4 aumentó los niveles basales de expresión de dicho gen. A su vez, el tratamiento con los NO₂-FA potenció el efecto de la IL4, y en el caso del NO₂-CLA esta potenciación alcanzó la significancia estadística (Figura 3.21d, indicado con *).

Para verificar que el aumento en la expresión de *Fabp4* dependió de la presencia de PPAR γ y no fue resultado de una interacción directa entre la IL4 y los NO₂-FA, se realizaron los mismos ensayos utilizando células provenientes de ratones silvestres (wt), y ratones con deficiencia en la expresión PPAR γ en células mieloides, ya sea parcial (heterocigotas) o total (deficientes). Los resultados mostraron que en presencia de IL4 el NO₂-OA logró inducir *Fabp4* en las células wt (Figura 3.22, indicado con *), y que esta inducción se anuló en las células con deficiencia en los niveles de PPAR γ (tanto heterocigotas como deficientes totales, Figura 3.22, indicado con #). En el caso del NO₂-CLA, los resultados muestran una tendencia similar a la observada con el NO₂-OA, pero en este experimento estas tendencias no alcanzaron la significancia estadística. El mismo comportamiento se observó para la Rosi (Figura 3.22), confirmando la participación de PPAR γ en la inducción de la expresión de *Fabp4* en los macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato.

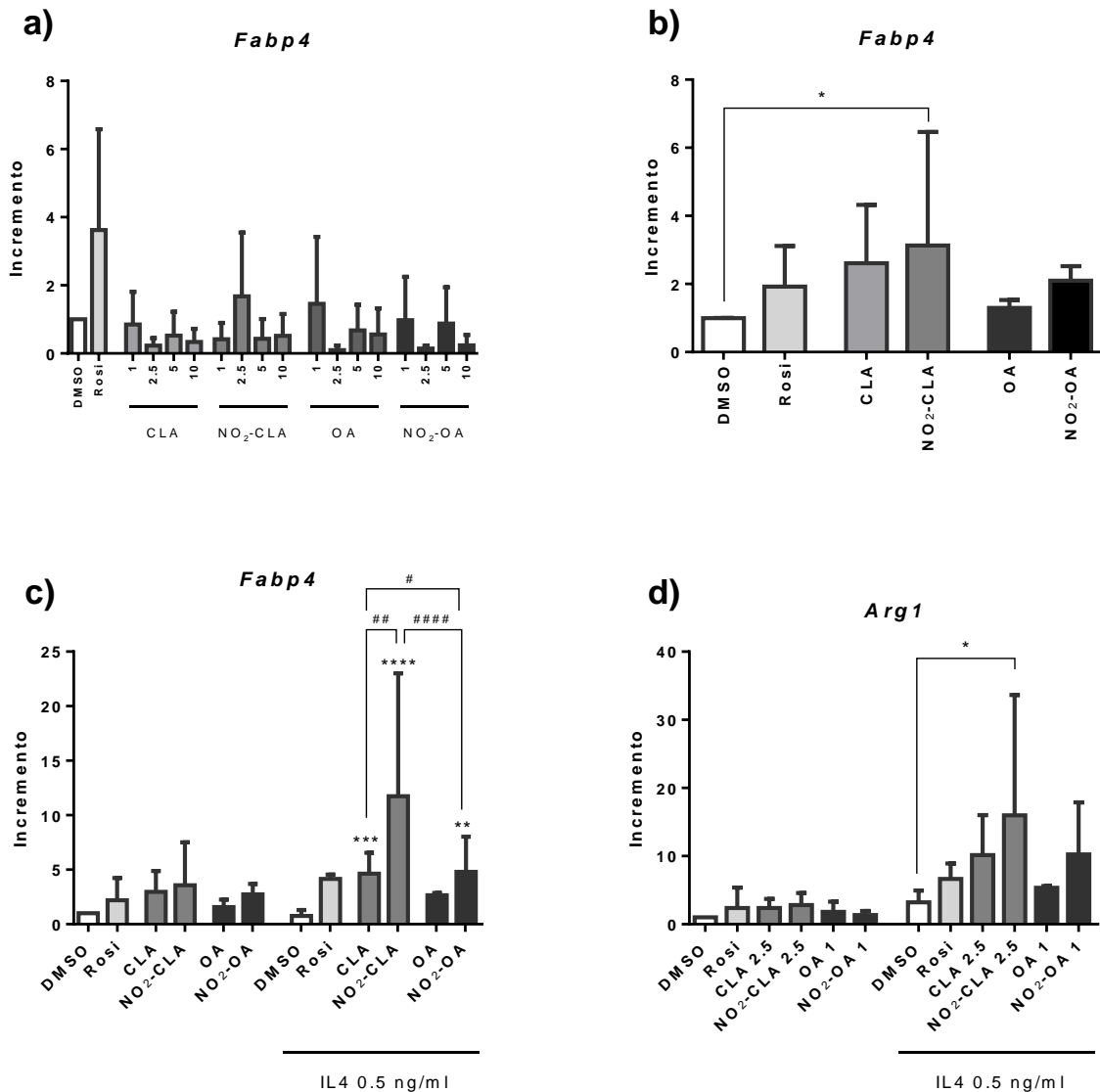


Figura 3.21: Los NO₂-FAs logran potenciar *in vitro* la expresión de *Fabp4* y *Arg1* inducida por la IL4 en macrófagos reclutados en el peritoneo por estimulación con tioglicolato

Se colectaron las células reclutadas a la cavidad peritoneal a los 3 días de la administración de tioglicolato, se plaquearon y se enriqueció la muestra en macrófagos por adherencia al plástico. Las células se estimularon *in vitro* con NO₂-FA, sus correspondientes FA precursores o Rosi, en ausencia o presencia de IL4 (0.5 ng/ml). En paralelo se trataron células con DMSO como control. Se muestran los resultados del análisis por RT-qPCR (normalizando contra el gen *18S*) de la expresión a las 6 h de los genes *Fabp4* (a-c) y *Arg1* (d). En (a) se utilizaron los NO₂-FA/FA a concentraciones de 1, 2.5, 5 y 10 μM, y la Rosi a 1 μM. En (b-d) se agregó el NO₂-CLA/CLA a 2.5 μM, el NO₂-OA/OA a 1 μM y la Rosi a 1 μM. Los resultados se muestran como niveles relativos de ARNm (incremento) en relación al grupo control (DMSO). En (a) las barras representan el promedio de duplicados biológicos ± SD. En (b-d) las barras representan el promedio de al menos tres experimentos independientes ± SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con DMSO o DMSO+IL4 0.5 ng/ml (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). (#) Indica diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

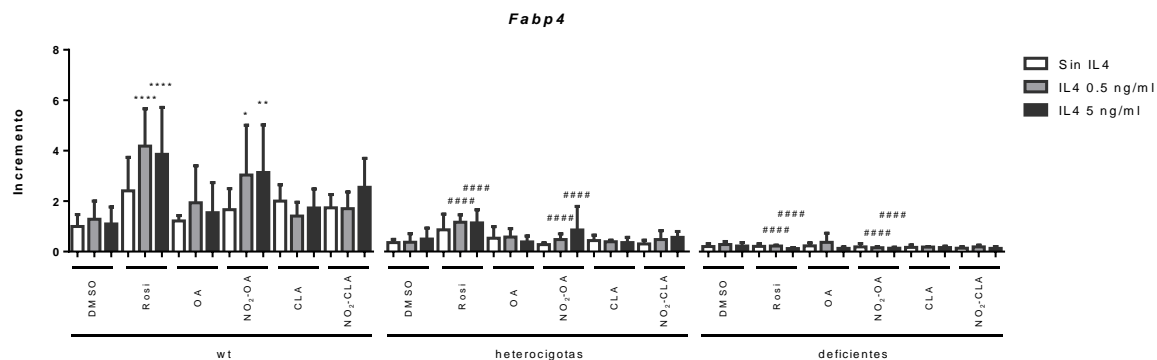


Figura 3.22: En presencia de IL4, los NO₂-FA y la Rosi indujeron un aumento dependiente de PPAR γ en la expresión de *Fabp4* en macrófagos peritoneales reclutados por estimulación con tioglicolato

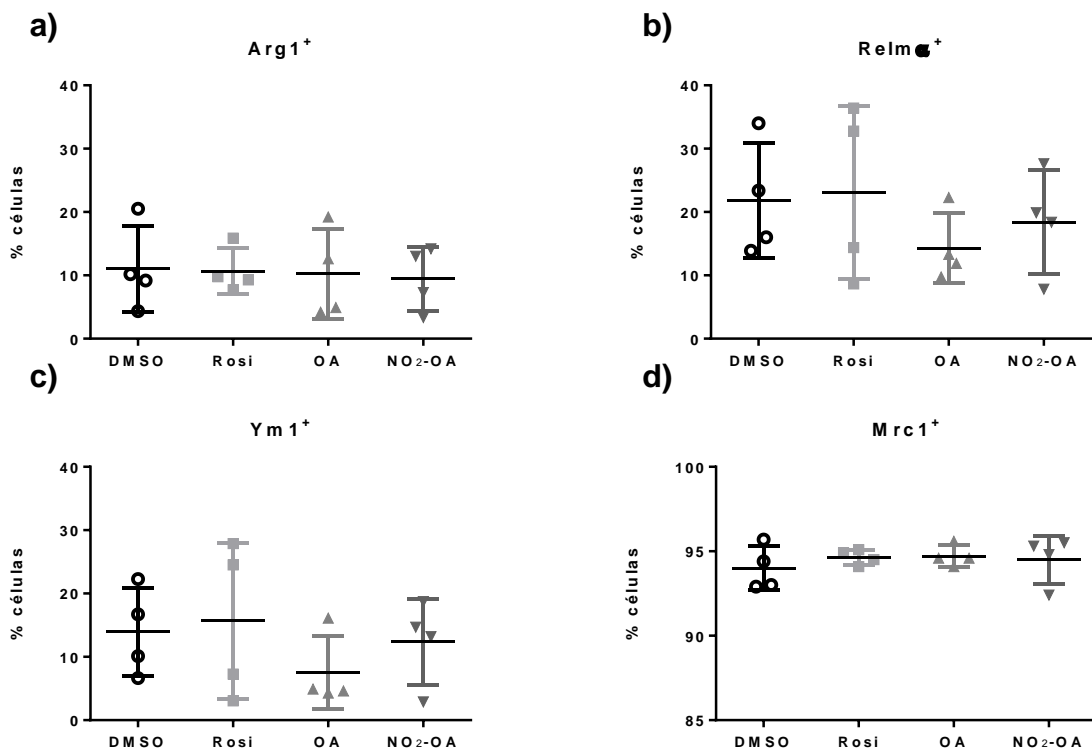
Se colectaron los macrófagos reclutados en la cavidad peritoneal a los 3 días de la administración de tioglicolato a ratones silvestres (wt, del inglés *wild type*), o a ratones con deficiencia en la expresión de PPAR γ en células mieloides, de tipo parcial (heterocigotas) o total (deficientes). Se enriqueció la suspensión celular en las poblaciones adherentes y se estimularon *in vitro* con NO₂-CLA/CLA a 2.5 μ M, el NO₂-OA/OA a 1 μ M o Rosi a 1 μ M, en ausencia o presencia de IL4 (0.5 o 5 ng/ml). En paralelo se realizaron controles con el vehículo (DMSO). Se muestran los resultados del análisis por RT-qPCR (normalizando contra el gen *18S*) de la expresión temprana (6 h) de *Fabp4*. Los datos corresponden a los niveles relativos de ARNm (incremento) en relación a las células control obtenidas de los ratones con niveles normales de PPAR γ (wt) y tratadas con DMSO. Las barras representan el promedio de al menos 4 individuos \pm SD. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas con el control (células wt tratadas con DMSO y sin IL4, ANOVA de dos vías, test de Tukey de comparaciones múltiples, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). (#) Indica diferencias estadísticamente significativas comparado con el mismo tratamiento en los animales wt (ANOVA, de dos vías, Test de Tukey de comparaciones múltiples #### $p < 0.0001$).

En conjunto, los resultados obtenidos del análisis *in vitro* de los efectos de los NO₂-FA sobre los macrófagos reclutados por tioglicolato, apoyaron la idea de que sería posible examinar la capacidad de los NO₂-FA de potenciar la expresión de *Arg1* inducida por la IL4, utilizando el modelo de estimulación intraperitoneal con tioglicolato *in vivo*. De este modo, luego de inducir el reclutamiento de células al peritoneo por la inyección de tioglicolato, se podría suministrar por vía i.p. los NO₂-FA junto con la IL4c y evaluar posteriormente el desarrollo del fenotipo alternativo así como la proliferación de las células peritoneales.

3.3.6.b Efecto de los ligandos de PPAR γ sobre la activación de macrófagos peritoneales inducida por IL4 *in vivo*

Para realizar este estudio se inyectó tioglicolato en la cavidad peritoneal y a los tres días se administró la IL4c y el ligando de PPAR γ o DMSO como control. En estos experimentos se utilizó el NO₂-OA, OA, Rosi (para comparar con un activador total de PPAR γ) y DMSO como control del vehículo. En este caso los estímulos se suministraron a una concentración 5 veces mayor a la usada anteriormente (0.175 vs. 0.035 μ moles), ya que se estimó que el tioglicolato recluta cerca de 5 veces más células que las que residen normalmente en el peritoneo. Se eligió trabajar con el NO₂-OA debido a que fue el NO₂-FA empleado en los estudios previos realizados en el modelo de alúmina, y a su vez, en los estudios con macrófagos peritoneales *in vitro*, se observó una mayor actividad con menor concentración de NO₂-OA que de NO₂-CLA. Continuando con el protocolo, a las 21 h post-estimulación con IL4c, se realizó el pulso de BrdU y a las 24 h se recuperaron las células

mediante lavados peritoneales. Para el análisis por citometría de flujo se seleccionaron los macrófagos dentro del total de células peritoneales como $CD19^+TCRb^-SiglecF^+Ly6G^-CD115^+F4/80^+$. Es importante aclarar que la población de macrófagos peritoneales reclutada por tioglicolato difiere claramente de la reclutada por la inyección de IL4c (ver punto 3.2.8.b), ya que en ese caso se detectaron macrófagos $F4/80^{alto}$ residentes de peritoneo y macrófagos recientemente reclutados $F4/80^{med}$, mientras que el tratamiento con tioglicolato reclutó una población de macrófagos homogénea en cuanto a su expresión de F4/80 ($F4/80^+$) pero que expresa niveles variables de MHCII (Figura 3.4f). Consecuentemente, esta población de macrófagos reclutada se dividió en dos subpoblaciones según la expresión de MHCII alto o bajo. Se evaluaron varios marcadores de diferenciación alternativa así como de proliferación en los macrófagos $F4/80^+MHCII^{bajo}$ y $F4/80^+MHCII^{alto}$, obteniéndose resultados similares. Por simplicidad se muestran solamente los resultados obtenidos al analizar el total de los macrófagos. La expresión de los marcadores de diferenciación alternativa *Arg1*, *Relmα*, *Ym1* y *Mrc1*, se evaluó tanto a nivel del porcentaje de células positivas como del nivel de intensidad del marcador, pero no se encontraron diferencias por el tratamiento con NO_2 -OA o con la Rosi (Figura 3.23a-h). En particular, la *Arg1* que había mostrado cierta modulación en el modelo de estimulación con IL4 y alúmina, no pareció afectarse tras el tratamiento con la Rosi en las células reclutadas por tioglicolato (Figura 3.23a y e). Al evaluar la proliferación por incorporación de BrdU en la totalidad de los macrófagos (Figura 3.24a), no se observaron efectos por el tratamiento con NO_2 -OA o por Rosi, así como tampoco al estudiarla en la población $F4/80^+MHCII^{alto}$ o $F4/80^+MHCII^{bajo}$ (Figura 3.24b y c, respectivamente).



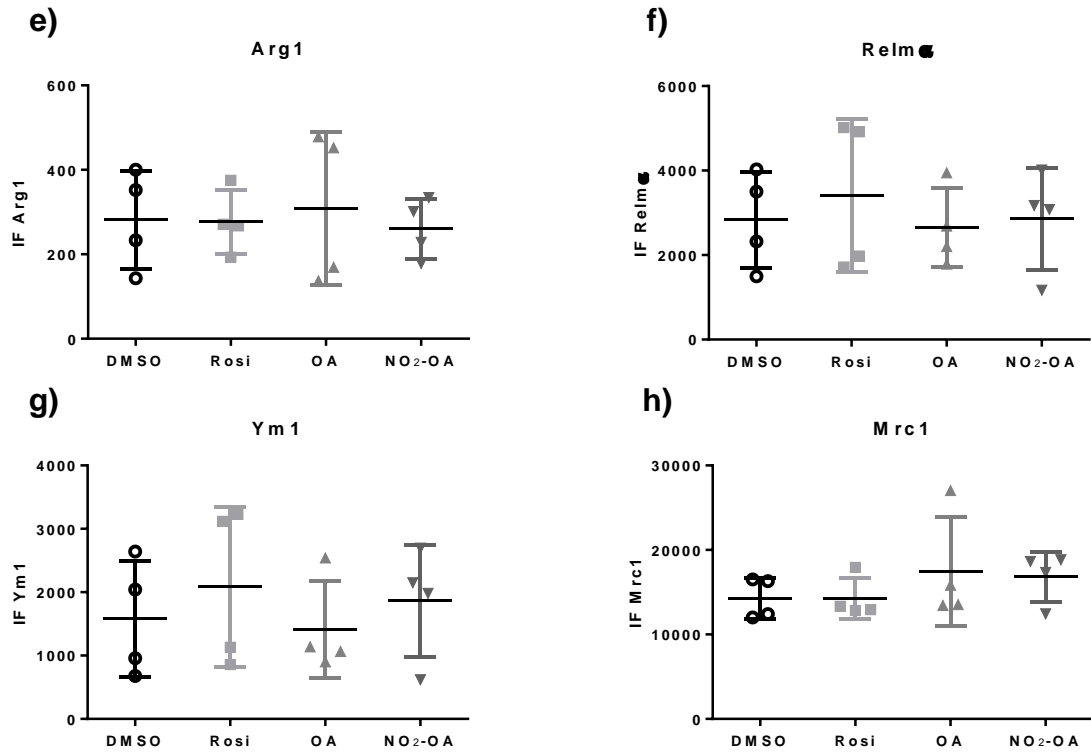
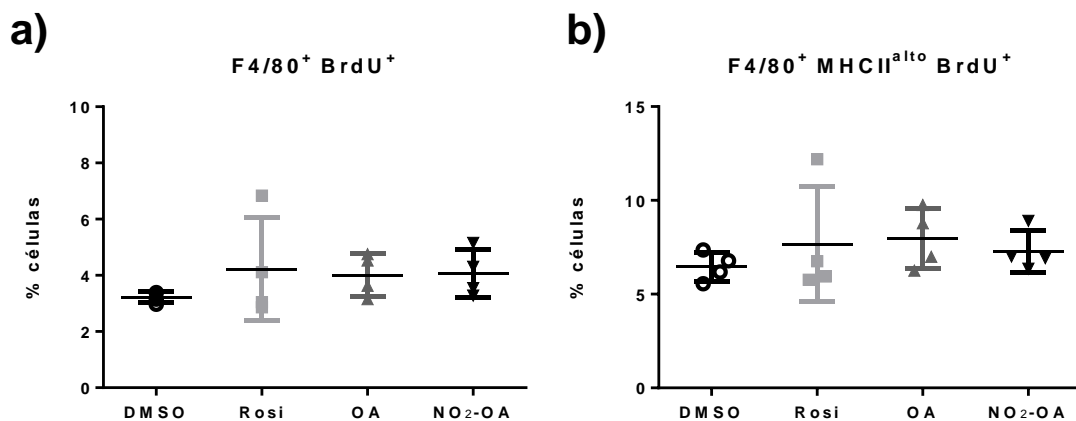


Figura 3.23: El tratamiento con NO₂-OA no potenció la expresión de marcadores de diferenciación alternativa inducidos por IL4c en macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato

Se inyectaron hembras Balb/c con tioglicolato y a los 3 días se administró NO₂-OA, OA o Rosi (0.175 μ moles), en conjunto con IL4c (1 μ g). En paralelo un grupo de ratones se trató con DMSO como control. Luego de 24 h se recuperaron las células de la cavidad peritoneal, se tiñeron con anticuerpos específicos y se analizaron por citometría de flujo. Se evaluó la expresión de distintos marcadores de diferenciación alternativa como Arg1 (a) y (e), Relm α (b) y (f), Ym1 (c) y (g) y Mrc1 (d) y (h). Los resultados se muestran como el porcentaje de células positivas (a-d) o la intensidad de fluorescencia (e-h), correspondiente a la expresión de cada marcador para la totalidad de los macrófagos CD19⁻TCRb⁻SiglecF⁻Ly6G⁻CD115⁺F4/80⁺. Los gráficos representan el promedio de los individuos \pm SD (n=4).



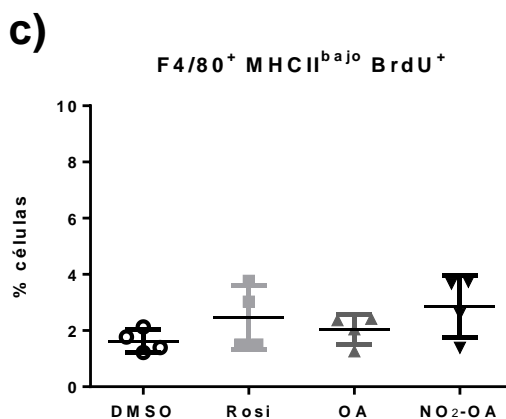


Figura 3.24: El tratamiento con NO₂-OA no modificó la proliferación de macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato inducida por IL4c

Se indujo el reclutamiento de macrófagos a la cavidad peritoneal tras la inyección de tioglicolato y luego de tres días se inyectó NO₂-OA, OA o Rosi, en conjunto con IL4c. Algunos animales fueron tratados con DMSO como control. Luego de 21 h se inyectó BrdU y tres horas después se recuperaron las células de la cavidad peritoneal, se tiñeron con anticuerpos específicos y se analizaron por citometría de flujo. La proliferación se evaluó mediante la incorporación de BrdU en la totalidad de los macrófagos **(a)**, en la sub-población F4/80⁺MHCII^{alto} **(b)** y F4/80⁺MHCII^{bajo} **(c)**. Se grafica el promedio de los individuos (barras horizontales) ± SD.

Considerando los resultados obtenidos en los dos modelos utilizados, podemos decir que en las condiciones ensayadas, no se logró detectar *in vivo* el efecto potenciador sobre la expresión de Arg1 inducida por la IL4 que mostraron los NO₂-FA y la Rosi *in vitro*. No se puede asegurar que los NO₂-FA no puedan inducir este efecto *in vivo*, ya que hay múltiples variables que podrían haber influenciado los resultados, y que se examinan en la discusión de esta tesis.

Capítulo 4

Discusión

4.1 Los NO₂-FA actúan como ligandos parciales de PPAR γ en monocitos y en menor medida en macrófagos

Los NO₂-FAs son mediadores lipídicos cuyas propiedades anti-inflamatorias han sido demostradas *in vitro* e *in vivo*, utilizando una variedad de tipos celulares y modelos de patologías inflamatorias, respectivamente. Más aún, actualmente el isómero posicional 10-NO₂-OA (CXA10, Complexa Inc., USA) está siendo objeto de ensayos clínicos²⁵⁴. Una de las propiedades que apoya el potencial anti-inflamatorio de los NO₂-FA es su capacidad para actuar como ligandos de PPAR γ , descrita por primera vez en 2005^{11,43}. Sin embargo, la relevancia de esta capacidad en los efectos anti-inflamatorios de los NO₂-FA no fue completamente examinada. Como ya se mencionó, la mayoría de los antecedentes provienen de modelos celulares de expresión ectópica de PPAR γ , por lo cual los niveles de expresión del conjunto de co-activadores y co-represores podrían apartarse de las condiciones fisiológicas sin reproducir completamente el complejo mecanismo de activación de este factor nuclear. En este contexto, esta tesis buscó elucidar si en monocitos y macrófagos, células del sistema inmune innato con capacidad de expresar PPAR γ , los NO₂-FAs despliegan su potencial para activar este receptor nuclear y qué consecuencias funcionales derivan de esta activación. En particular, dado que se reportó que PPAR γ puede tener un papel importante en la diferenciación de monocitos a macrófagos²⁰⁶, se realizaron

en estudios en modelos celulares de origen humano (basado en el empleo de la línea celular de pre-monocitos humanos THP-1) y murino (basado en la diferenciación de precursores mieloides a BMDM), que permitieran valorar los efectos de los NO₂-FA durante esta diferenciación.

Los estudios en monocitos en diferenciación y macrófagos humanos obtenidos a partir de la línea celular THP-1, mostraron que los NO₂-FAs indujeron la activación de PPAR γ ya que al igual que el ligando sintético Rosi aumentaron la expresión de *FABP4* y *CD36* por un mecanismo inhibible por el antagonista irreversible de este receptor, GW9662. Similarmente, en el modelo murino, los NO₂-FAs provocaron un aumento de la FABP4 dependiente de PPAR γ ; en este caso aunque los NO₂-FAs aumentaron la expresión de *CD36*, no se pudo demostrar la participación de PPAR γ en esta regulación. En ambos modelos, a las concentraciones utilizadas, los FA no nitrados no mostraron actividad, lo cual destaca la importancia del grupo nitro en la interacción con residuos claves del LBD de PPAR γ . En particular, se ha observado que el NO₂-OA y el NO₂-LA pueden formar una unión covalente con la Cys285 del LBD, lo cual los estabilizaría y favorecería el reclutamiento de co-activadores, que llevan a una mayor actividad transcripcional²⁶. A su vez, la señalización inducida a través de la formación de un enlace covalente, podría extenderse en el tiempo en comparación con la señalización ejercida por los FA, que establecerían únicamente interacciones hidrofóbicas reversibles. De este modo la activación mediada por los NO₂-FA superaría a la de los FA, que logran activar a PPAR γ sólo a concentraciones mayores, cercanas a 100 μ M. Finalmente, cabe mencionar que entre los genes candidatos a reporteros de PPAR γ , *FABP4* y *CD36* (en el modelo humano) fueron los únicos positivamente regulados por los NO₂-FA. De hecho, otros genes candidatos como *ABCA1*, *ABCG1* y *CPT1A* (vinculados al metabolismo lipídico,^{255,256}) y las integrinas α_V y β_5 ²⁵⁷ no mostraron cambios en su expresión compatibles con la activación de PPAR γ .

Por otro lado, los NO₂-FA mostraron en todos los casos efectos menores que el activador total Rosi. De hecho, el tratamiento con GW9662 inhibió completamente el efecto de los NO₂-FA sobre la expresión de *FABP4* y *CD36* en monocitos en vías de diferenciación a macrófagos, pero lo hizo

parcialmente sobre la expresión inducida por Rosi, reafirmando el concepto postulado previamente de los NO₂-FA como activadores parciales de PPAR γ ²⁶. Esto se explica porque la unión de los NO₂-FA induce cambios conformacionales diferentes a los inducidos por la Rosi, que posicionan distinto a la hélice H12 del LBD de PPAR γ , posibilitando solamente la unión de un subconjunto de los factores co-estimuladores y no logrando disociar el total de los co-represores, lo cual confiere actividad transcripcional parcial ²⁶. De hecho, el análisis de la estructura cristalina del complejo que forma PPAR γ con dos regioisómeros de NO₂-LA, muestra que estos ligandos establecen interacciones con aminoácidos del bolsillo del LBD (particularmente Arg288, Glu343 y Phe287) que no son relevantes para la formación del complejo con la Rosi ⁸⁹. Lejos de ser una desventaja, el carácter de activadores parciales brinda una alternativa para la regulación de la expresión génica a través de PPAR γ , de forma de favorecer el control de un grupo, pero no de todos los genes susceptibles a su regulación. La activación parcial sería ventajosa, ya que la activación total, como la obtenida con drogas de la familia de las thiazolidinedionas, como la Rosi, se ha asociado a efectos perjudiciales (incluyendo el aumento de patologías cardiovasculares ²⁵⁸), lo que llevó a retirarlas del mercado en varios países ^{85,86}.

Dentro de los NO₂-FA, el NO₂-CLA mostró ser mejor activador de PPAR γ que el NO₂-OA y el NO₂-AA, lo que se evidenció por la capacidad del primero de inducir la expresión de *CD36* en monocitos humanos. Estas diferencias están probablemente relacionadas con las interacciones que cada NO₂-FA establece con el LBD de PPAR γ , en donde la posición del grupo nitro en la cadena hidrocarbonada puede jugar un papel determinante en los cambios estructurales y el grado de estabilización del complejo NO₂-FA:LBD-PPAR γ . Cabe recordar que en este trabajo se utilizaron mezclas de isómeros posicionales de los NO₂-FA, constituidas por el 9-NO₂-CLA y el 12-NO₂-CLA, el 9-NO₂-OA y el 10-NO₂-OA, y el 9- 12- 14- y 15-NO₂-AA para el NO₂-CLA, NO₂-OA y NO₂-AA, respectivamente. Existen reportes que plantean que la nitración en el C12 de la cadena del ácido graso, como ser el LA o el ácido 12-octadecenoico (no presente en la naturaleza), induce una mayor activación de PPAR γ en comparación con la inducida por otros isómeros posicionales tanto naturales como sintéticos ^{44,45}. Esto se relacionó con diferencias en la interacción del NO₂-FA con aminoácidos claves del LBD; el NO₂ en la posición 12 interacciona con el residuo Glu343, mientras que en la posición 10 lo hace con la Arg288 ⁸⁹. Esta diferencia influiría en la conformación adoptada por el LBD, y en consecuencia en las interacciones que se establecen con co-represores y co-activadores que se posicionan sobre el dominio AF2 y regulan la actividad transcripcional de PPAR γ . De este modo, en los estudios realizados en esta tesis podría esperarse que el NO₂-CLA, conteniendo el isómero 12-NO₂-CLA, lograra una mayor activación de PPAR γ que el NO₂-OA. En cuanto al NO₂-AA, se desconoce la abundancia del isómero 12-NO₂-AA en la mezcla, pero además de que podría no ser el principal, la existencia de cuatro insaturaciones en la molécula le otorga seguramente mayor rigidez, existiendo probablemente mayores diferencias en cómo estos isómeros se posicionan en el LBD en comparación con el NO₂-CLA. Por otra parte, la mayor capacidad activadora del NO₂-CLA cobra importancia considerando que en condiciones fisiológicas el CLA es el FA que funciona como mejor sustrato de las reacciones de nitración ²³, sugiriendo que la ingesta de una dieta rica en CLA y NO₂⁻ podría contribuir a la activación de PPAR γ *in vivo*.

Por otro lado, la activación de PPAR γ por los NO₂-FAs fue mayor en los monocitos en proceso de diferenciación que en los macrófagos humanos ya diferenciados. Esta observación parece contrastar con el hecho que la expresión de PPAR γ aumenta durante el proceso de diferenciación de pre-monocito a macrófago. Más aún, este aumento puede potenciarse con estímulos como IL4 y M-CSF ^{9,149,163,251,259}. Sin embargo, esta aparente contradicción se explicaría considerando que la

determinación de la activación de PPAR γ en nuestros ensayos es una medida relativa, asociada al cambio en la expresión de un gen reportero y, por tanto, influida por el nivel de expresión basal de este gen. Como este nivel basal queda determinado, al menos parcialmente, por el nivel de expresión de PPAR γ , sería posible que los niveles basales de expresión de *FABP4* y *CD36* sean muy altos en los macrófagos diferenciados haciéndolos menos sensibles como marcadores de la actividad. De hecho la expresión basal de FABP4 en macrófagos es mayor que en monocitos en diferenciación (datos no mostrados). Así, la estimulación con los NO₂-FAs conduciría a una respuesta relativa mayor en los monocitos diferenciándose que en los macrófagos ya diferenciados, que se traduciría en un efecto activador de significancia para la célula. Otro factor a considerar es el conjunto de ligandos endógenos presentes en cada tipo celular, que también condicionaría la expresión basal de los genes reporteros. Se conoce que el perfil transcriptómico de los monocitos humanos sufre alteraciones durante la diferenciación a macrófagos, las cuales incluyen la inducción de transcritos involucrados en la síntesis de palmitato y oleato, y en la desaturación y elongación de FA ²⁶⁰. Estas alteraciones introducirían importantes diferencias en el perfil de ligandos endógenos con los cuales los NO₂-FA deberían competir, influyendo en su capacidad de promover la activación de PPAR γ en estas células.

Respecto a la activación de PPAR γ en el modelo murino, utilizamos dos modelos celulares, buscando evaluar el efecto de los NO₂-FA sobre estadios de tipo monocitario generados con estímulos diferentes, tanto *in vitro* (M-CSF) como *in vivo* (tioglicolato). Si bien estos modelos no son estrictamente comparables con el modelo de diferenciación con PMA del monocito THP-1 humano, la activación de PPAR γ por los NO₂-FA en células humanas parece ser más robusta que en células de ratón. Por otra parte, en estudios preliminares no pudimos observar inducción de la *Fabp4* por estimulación de BMDM ya diferenciados con los NO₂-FA (datos no mostrados). Este conjunto de datos sugiere que podría haber diferencia en la respuesta de PPAR γ asociada a la especie. Según la literatura los BMDM, a pesar de ser macrófagos, tendrían menor capacidad de expresar PPAR γ ²⁶¹, lo que dificulta su activación incluso por ligandos fuertes como Rosi ⁹. El escenario en los macrófagos reclutados con tioglicolato es completamente diferente, porque expresan niveles altos de PPAR γ , seguramente como resultado de la estimulación derivada del ambiente inflamatorio ²⁰³. Por lo tanto, en este caso, la expresión basal de *Fabp4* podría haber influido en la detección de la actividad. Más aún, se logró hacer visible la acción de PPAR γ realizando los experimentos en presencia de IL4, ya que esta citoquina logra potenciar la síntesis y la actividad de PPAR γ a través de la activación de STAT6 ^{9,163,203}. No se ha elucidado exactamente cómo actúa STAT6, pero se plantea que promovería la unión de PPAR γ a los PPRE, y que la unión conjunta de STAT6 y PPAR γ a un promotor blanco contribuiría al reclutamiento de un mayor número de co-activadores aumentando la actividad transcripcional de PPAR γ ⁹.

En resumen, a pesar de que la metodología empleada para medir la activación de PPAR γ sea menos potente sobre células donde los genes reporteros tengan una fuerte expresión constitutiva, los resultados muestran que el nivel basal de activación de PPAR γ en los macrófagos podría hacer irrelevante o poco significativa la activación por los NO₂-FA, al menos en términos de la expresión de *FABP4*.

4.2 La FABP4 regula la señalización de los NO₂-FA probablemente actuando como un transportador intracelular

4.2.1 Los NO₂-FA son potenciales ligandos de la FABP4, pero en las células la unión dependerá de múltiples factores incluyendo los niveles de GSH

En vista de que la FABP4 resultó el gen reportero más inducido tras la activación de PPAR γ por los NO₂-FA en monocitos y macrófagos humanos, nos planteamos la posibilidad de que juegue un rol en el transporte de los NO₂-FA en estas células. Primero verificamos que los NO₂-FA se comportan como ligandos de la FABP4 *in vitro*, y que la presencia del grupo nitro no impide su unión, aunque se observó que se unen con menor afinidad que sus FA precursores. De todas maneras, el hecho que la afinidad de la FABP4 por los NO₂-FA no sea muy alta (K_{dapp} del orden μ M), podría facilitar el traspaso de estos ligandos hacia otra proteínas blanco en la célula, como por ejemplo PPAR γ . Como ya se mencionó, proteínas de la familia FABP participan en la transferencia de ligandos a los receptores PPAR en el núcleo^{116,117,160}, por lo cual la unión de los NO₂-FA a la FABP4 podría establecer un circuito de retroalimentación positiva en monocitos y macrófagos que regule la adquisición, el transporte y las posibles interacciones de los NO₂-FA.

Con respecto al valor determinado para la K_{dapp} que describe la afinidad de los NO₂-FA por la FABP4, resulta importante señalar que es importante verificarlo optimizando las condiciones del ensayo. La determinación de la K_{dapp} se realizó mediante ensayos de desplazamiento de la sonda fluorescente ANS previamente unida a la FABP4, con concentraciones crecientes de NO₂-FA. En estos ensayos se utilizó una concentración constante de FABP4 de 3 μ M, que requirió de concentraciones de NO₂-FA cercanas a 20 μ M para lograr la saturación de la proteína. A esas concentraciones podría darse la formación de micelas de NO₂-FA por su limitada solubilidad en el medio acuoso, de modo que a partir de cierta concentración sería posible que una fracción del NO₂-FA agregado no compitiera por el sitio de unión de la proteína, lo cual habría conducido a sobrestimar la K_{dapp} . Por tanto, sería recomendable utilizar concentraciones más bajas de FABP4 (del orden de los 200 nM), para lograr saturar la proteína con concentraciones menores de NO₂-FA, y disminuir el error de la determinación de las K_{dapp} ²²⁴. De todos modos, es importante aclarar que esto no invalida la comprobación de que los NO₂-FA son ligandos de la FABP4, ni la comparación de las K_{dapp} correspondientes a los equilibrios de la FABP4 con los NO₂-FA o sus FA precursores, ya que todas se obtuvieron en las mismas condiciones.

A la luz de los datos obtenidos en los ensayos de unión *in vitro*, resultó evidente que en el medio celular los NO₂-FA tienen que competir con una gran variedad de ácidos grasos por la unión a la proteína. Esta es una competencia muy exigente porque, como ya se comentó, se encuentran en menor concentración que los FA y poseen una menor afinidad por la FABP4. De todas maneras, los resultados *in silico*, sugieren que a la misma concentración molar de ligando, la diferencia en la afinidad de la FABP4 por los FA y los NO₂-FA no se traduciría en una diferencia significativa en el nivel de formación de los complejos FABP4:NO₂-FA y FABP4:FA. Por lo tanto, dado que es de esperar que la concentración de los NO₂-FA sea en cualquier circunstancia menor que la de los FA, el nivel intracelular de la FABP4 podría ser un punto crítico para la formación de los complejos FABP4:NO₂-FA. Se conoce que la expresión de la *Fabp4* en los monocitos/macrófagos depende del estado de activación/diferenciación de las células, que queda definido por el contexto inflamatorio en que se encuentren. Por ejemplo, en monocitos en diferenciación la presencia de señales pro-inflamatorias como LPS/IFN γ disminuye la expresión de *FABP4*^{163,251}, mientras que señales como IL-

4 aumentan dicha expresión a través del aumento de la actividad de PPAR γ ^{9,250,251}. En cambio, el panorama en macrófagos no es tan claro, ya que hay reportes contradictorios en cuanto al tipo de regulación por las señales inflamatorias clásicas o alternativas (LPS regula a la baja a FABP4 o PPAR γ :^{251,262,263}, LPS no altera FABP4:⁹, LPS aumenta FABP4¹⁴⁶). De hecho en los ensayos con macrófagos reclutados con tioglicolato observamos que la estimulación con la IL4 aumentó la expresión de *Fabp4*, pero este aumento no se observó al estimular con IL4 a BMDM totalmente diferenciados (controles del condicionamiento con los NO₂-FA, datos no mostrados). Finalmente, otro factor que podría interferir con la interacción FABP4- NO₂-FA, es la aducción de los NO₂-FA a nucleófilos endógenos. Mientras que la aducción a una proteína ciertamente anularía la posibilidad del NO₂-FA de acomodarse en el bolsillo hidrofóbico de la FABP4, es posible que la aducción a moléculas pequeñas como GSH no lo haga. Resultados preliminares de nuestro grupo, en los que se buscó preformar el aducto GSH-NO₂-OA para luego analizar su unión a la FABP4, indicaron que la aducción alteró pero no eliminó la capacidad del NO₂-OA de desplazar al ANS del bolsillo hidrofóbico de la FABP4. Por otra parte, en esta tesis el efecto de nucleófilos endógenos quedó en evidencia cuando altas concentraciones de GSH alteraron, aunque sin inhibir por completo, la unión del NO₂-OA, OA y NO₂-SA a la FABP4, indicando un efecto independiente de la formación de aductos, y posiblemente relacionado con una alteración en la estructura de la proteína y su capacidad de unir ligandos. En suma, se puede decir que la unión de los NO₂-FA a la FABP4 en los monocitos/macrófagos dependerá de múltiples factores incluyendo la concentración de la FABP4, NO₂-FA, FA y de otros ligandos competidores, la presencia de nucleófilos (GSH, tioles de proteínas) y el contexto inflamatorio que regulará (positiva o negativamente) la expresión de la *FABP4* así como también los niveles de otros mediadores lipídicos y nucleófilos capaces de aductar los NO₂-FA.

4.2.2 La FABP4 actuaría como un *transportador no selectivo* de potenciales agonistas de PPAR γ

En esta tesis no fue posible buscar evidencias directas de la unión de los NO₂-FA a la FABP4 en el medio celular, pero buscamos evidenciar dicha unión en forma *indirecta*. La hipótesis que manejamos fue que esta unión sería crítica para el transporte intracelular de los NO₂-FA, ya que la función clásica de las FABPs es dirigir sus ligandos a distintos organelos o compartimientos celulares. Por esa razón, examinamos la distribución celular de la FABP4, ya que de acuerdo a la literatura la unión de ligandos activadores de PPAR γ , como por ejemplo las drogas de la familia de las thiazolidinedionas, induciría la translocación al núcleo de la proteína. Para este fin analizamos por microscopía confocal la distribución celular de la FABP4 en monocitos en vías de diferenciación a macrófagos estimulados con los NO₂-FA, FA o Rosi. Curiosamente, ninguno de los estímulos indujo la translocación de la proteína al núcleo, lo cual podría indicar que la unión de estos ligandos no provocó un aumento significativo en la exposición de la señal asociada a la translocación nuclear, SLN. Para evaluar esta posibilidad analizamos *in silico* las conformaciones adoptadas por la FABP4 en la dinámica de los complejos FABP4:NO₂-FA, FABP4:FA y comparamos los datos con los reportados para la apo-FABP4. En concordancia con las observaciones obtenidas por microscopía, la unión de los NO₂-FA a la FABP4 no favoreció la adopción de la conformación cerrada de la proteína que se asocia a la exposición del SLN, mostrando un nivel similar al inducido por la unión de los FA. Más aún, en los complejos con NO₂-CLA la FABP4 muestra menor tendencia a adoptar la conformación cerrada que la apo-FABP4. De todas maneras, el análisis de la dinámica de todos los complejos estudiados muestra un predominio de la conformación cerrada de la FABP4

(del entorno del 70% o mayor). Estos resultados describen un escenario donde la mayoría de la población de moléculas de FABP4 adoptaría una conformación cerrada que facilita la exposición del SLN y su translocación al núcleo, independientemente del ligando que carguen. Este escenario es compatible con el hallazgo que en todos los experimentos y bajo cualquier condición de estimulación, se detectó una fracción de la proteína en el núcleo, aunque en un porcentaje inferior al 50%. Otros mecanismos podrían participar en la movilización de la FABP4 en la célula explicando el perfil de distribución observado. Un mecanismo que no se puede descartar es la difusión pasiva a través de los poros nucleares, ya que la FABP4 tiene un tamaño de 14.7 kDa que le permitiría difundir a través de ellos independientemente del ligando que una. Además, células expresando mutantes de FABP4 en la SLN y SEN, mostraron que la proteína se distribuyó en toda la célula ¹¹⁸. En el caso de FABP1 y FABP2, que carecen de la SLN en su secuencia, se confirmó el ingreso al núcleo de manera independiente de importinas ¹⁶². Estos antecedentes en su conjunto podrían sugerir que además del transporte activo hacia y desde el núcleo, mediado por las SLN y SEN no convencionales, la FABP4 experimenta una difusión pasiva, que contribuye en forma importante a su distribución celular y que podría ocultar la translocación dirigida por el ligando.

Llamativamente nuestros resultados contrastan con los trabajos que reportan la translocación de la FABP4 luego del agregado de ligandos como el LA o la droga troglitazona ^{118,264}. En algunos trabajos expresaron la FABP4 fusionada a GFP en forma ectópica, lo cual podría explicar parte de las diferencias si la fusión de ambas proteínas altera el tráfico normal de la FABP4 hacia y desde el núcleo ¹⁶⁰. Una diferencia podría radicar en que debido al mayor tamaño se dificultara la difusión pasiva de la FABP4-GFP (42 kDa) a través de los poros nucleares, facilitando la detección de los mecanismos de translocación activa. Sin embargo, esta limitación no sería importante ya que utilizando mutantes de la FABP4 en la SLN y SEN, se observó una distribución de la FABP4-GFP en toda la célula. Otra posibilidad sería que la fusión de la GFP a la FABP4 alterara en cierta medida la exposición normal de la SLN y la SEN, repercutiendo en la localización de la proteína. Buscando evitar posibles artefactos, Adida y colaboradores estudiaron la localización celular de la FABP4 nativa, pero expresada ectópicamente ¹⁶⁰, mostrando que el agregado de LA indujo su translocación al núcleo. Una diferencia con nuestros ensayos fue la utilización de tiempos más largos de inducción de la translocación, 4 h vs. 30 min o 1 h en nuestros ensayos. Utilizamos tiempos cortos ya que se emplearon con éxito en otros estudios y preferimos evitar que la síntesis de FABP4 en el citoplasma enmascarara la translocación nuclear. Más allá de esto, la principal diferencia radica probablemente en que en esta tesis se exploró la translocación nuclear de la FABP4 en una célula naturalmente capaz de expresar esta proteína y las proteínas accesorias que están involucradas en su distribución celular, evitando sistemas artificiales de transfección que no logran reproducir la concentración fisiológica de FABP4 ni las interacciones que establece con las proteínas que regulan su tránsito. Además mediante el uso de nuestro sistema, evaluamos la localización de FABP4 conservando el conjunto de ligandos endógenos que pudieran existir en estas células. Finalmente, un punto no menos importante es que los macrófagos también expresan PPAR γ , que constituye un posible blanco para los ligandos que la FABP4 transporta. En suma, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en el macrófago, el tránsito de la FABP4 podría ser diferente al que ocurre en los sistemas artificiales previamente utilizados, existiendo quizás una mayor movilidad al núcleo y desde el núcleo al citosol, lo que posibilita pensar en forma continua los ligandos internalizados y/o generados en la célula.

Tomando en cuenta las observaciones previas sobre la capacidad de los NO₂-FA y los FA de activar PPAR γ , concluimos que esta capacidad no se correlaciona con la afinidad de estos ligandos por la FABP4, ni con el grado de exposición de la SLN o de translocación nuclear que estos ligandos inducirían tras la unión. No se puede descartar que la unión a la FABP4 de agonistas de PPAR γ , tenga consecuencias a nivel de la interacción FABP4-PPAR γ , contribuyendo al traspaso del ligando y la activación del factor nuclear, sin correlacionarse con un aumento en el nivel de ingreso de FABP4 al núcleo. Por otra parte, los resultados concuerdan con la idea que la activación de PPAR γ queda definida por las características estructurales del ligando, que determinan los cambios estructurales que induce su unión en el LBD y, por tanto, las interacciones que establece el dominio AF2 con los co-reguladores. En este escenario la FABP4 actuaría sólo como un *vehículo* o *transportador no selectivo*, que entrega ligandos activadores o no activadores a PPAR γ en el núcleo.

Finalmente, además de participar en el transporte intracelular de NO₂-FA, la FABP4 podría estar involucrada en la adquisición por monocitos, macrófagos y adipocitos de estos ácidos grasos nitrados desde el medio extracelular (revisado por ²⁶⁵). Esta posibilidad reviste más importancia cuando pensamos en la administración de los NO₂-FA en los cultivos celulares o su potencial como drogas anti-inflamatorias. También podría plantearse que FABP1 y FABP2 podrían estar involucradas en la toma y transporte intracelular de estos mediadores lipídicos en los enterocitos y hepatocitos, ya que *in vitro* observamos que los NO₂-FA pueden unirse a estas dos isoformas de FABPs. El transporte en el intestino e hígado cobra relevancia cuando se piensa en la formación *in vivo* de los NO₂-FA. Bonacci y colaboradores reportaron que la administración de CLA y NO₂⁻ por vía gástrica generó NO₂-CLA que se detectó luego en varios tejidos del organismo ²³. La presencia de FABP2 y FABP1 a lo largo del intestino haría factible la participación de estas proteínas transportadoras en los eventos que median la incorporación de los NO₂-FA desde el lumen intestinal a la célula y su posterior transporte hacia la sangre. Luego, en el hígado, la FABP1 de los hepatocitos podría captar los NO₂-FA desde la sangre. Además de esta putativa función de captación, la FABP1 y FABP2 podrían retener a los NO₂-FA en los tejidos en los que se encuentran, favoreciendo sus actividades señalizadoras; de hecho, Bonacci y colaboradores determinaron que aquellos animales que generaron NO₂-CLA en el compartimento gástrico, mostraron un aumento de la inducción de HMOX1 en el intestino ²⁰.

4.2.3 La FABP4 regula la señalización de los NO₂-FA

Dado que los NO₂-FA indujeron la expresión y se comportaron como potenciales ligandos de la FABP4, nos interesó evaluar el papel de FABP4 en la señalización mediada por los NO₂-FA en los monocitos en diferenciación THP-1. Para ello utilizamos dos inhibidores específicos de FABP4, llamados BMS y HTS, de naturaleza química distinta (derivados de pirazol y tiofeno, respectivamente ²⁶⁶), los cuales actúan uniéndose con alta afinidad a la FABP4 impidiendo que otro ligando lo pueda hacer. En ningún caso el tratamiento con los inhibidores alteró la expresión y/o la síntesis basal de FABP4 (Figura 2.16). En cambio, la expresión de *FABP4* y *CD36* inducida por los NO₂-FA se anuló totalmente por los inhibidores, demostrando la importancia de la actividad de la FABP4 en la activación de PPAR γ . Dada su baja solubilidad en el medio acuoso, los NO₂-FA probablemente requieren de la FABP4 para ser incorporados en la célula y/o llegar al núcleo. La inhibición observada resulta probablemente del bloqueo por los inhibidores de la unión de los NO₂-FA a la FABP4, afectando su adquisición y/o transporte al núcleo, y consecuentemente la

posterior activación de PPAR γ . Llamativamente, otras vías de señalización activadas por los NO₂-FA, Keap1/Nrf2 y HSPs/HSF1, que no requieren del transporte hacia el núcleo, también fueron alteradas en presencia de los inhibidores. El hecho de que dos inhibidores de naturaleza diferente provoquen los mismos efectos sobre tres vías de señalización activadas por los NO₂-FA nos permite asegurar que la FABP4 está involucrada en los eventos que participan en la señalización por estos mediadores lipídicos.

Contrariamente a lo observado para PPAR γ , el NO₂-OA comparado con el NO₂-CLA logró una mayor activación de la vía de Keap1/Nrf2 y fue el único que indujo la vía de HSF1. Diferencias similares entre los NO₂-FAs fueron reportadas por Bates y colaboradores ²⁶⁷, quienes plantearon que la mezcla de isómeros 9/10-NO₂-OA activó en mayor medida la vía de Nrf2 en comparación con el 12-NO₂-LA, sin embargo, en términos de la activación de PPAR γ esta relación se invertía. Más tarde, Kansanen agregó que dentro de la mezcla de isómeros, el 9-NO₂-OA se comportaba como mejor activador de Nrf2 que el 10-NO₂-OA ²⁶⁸. Las diferencias en la potencia de las respuestas entre el NO₂-OA y el NO₂-CLA en la activación de las vías de Nrf2 y HSF1 posiblemente residan en que en las condiciones de nuestros ensayos, a la misma concentración molar, el NO₂-OA reaccione más rápidamente que el NO₂-CLA con nucleófilos claves en Keap1 y HSPs. Esta hipótesis se basa en la constante de equilibrio y la tasa aparente a pH 7.4 de la reacción de NO₂-FA con tioles de bajo peso molecular, donde las reacciones de adición en β del NO₂-OA son 2 veces más rápidas y originan aductos en β más estables que el NO₂-CLA ²⁶⁹. En este sentido, Keap1/Nrf2 y HSPs/HSF1 son vías activadas por modificaciones en tioles específicos. De hecho Keap1/Nrf2 es una vía encargada de censar la presencia de electrófilos en la célula ⁵³. La aducción de los NO₂-FA a Keap1, así como la alquilación del complejo inhibidor de HSF1, liberan a Nrf2 y a los monómeros de HSF1 para que se transloquen al núcleo y puedan iniciar la transcripción de genes blanco. Curiosamente, la presencia de los inhibidores de FABP4 en general disminuyó esta activación, aunque para cada gen hubo un comportamiento particular.

Considerando las respuestas inducidas por el NO₂-OA, se observó en general que la inducción de la *HMOX1* y *GCLM* disminuyeron en presencia de los inhibidores sin llegar a anularse, mientras que la expresión de *HSP70* resultó levemente afectada. Al comparar la magnitud de los efectos provocados por los inhibidores, parecería que la actividad de la FABP4 fuera más relevante para la señalización a través de PPAR γ , en donde se observó una clara reducción de los efectos de los NO₂-FA, que para la activación de Nrf2 o HSF1. De todos modos, existe cierta contribución de la FABP4 en la activación de estas vías, siendo más evidente en el caso del NO₂-OA. Creemos que la ausencia de FABP4 favorece la formación de aductos no productivos en términos de la señalización, disminuyendo la cantidad de NO₂-FA disponible para activar a PPAR γ , Nrf2 y HSF1. De este modo, la FABP4 protegería a los NO₂-FA, reservándolos para reaccionar con blancos específicos, y es así que la protección sería mayor para el NO₂-OA quien mostró una mayor afinidad por la proteína. En este sentido, la falta de FABP4 podría afectar en mayor medida la señalización del NO₂-OA en comparación con la del NO₂-CLA, considerando su mayor electrofilia. Una función similar había sido previamente reportada para la FABP4, que consistió en la protección del Leucotrieno LTA4 de su hidrólisis no enzimática, alargando su vida media y permitiendo la generación de sus leucotrienos derivados ²⁷⁰.

En cuanto a los efectos inhibitorios sobre la producción de citoquinas inflamatorias, la actividad de los NO₂-FA, también mostró ser dependiente de la FABP4. Aunque no lo comprobamos, los efectos mediados por los NO₂-FA sobre la expresión de *MCP1* e *IL1B* posiblemente se deban a la

inhibición de la vía de NF- κ B ampliamente estudiada en la literatura. La inhibición se puede alcanzar por la nitroalquilación de alguna de las proteínas involucradas en la vía, lo cual evita que el dímero mayoritariamente formado por p65p50 se transloque al núcleo y active la transcripción de genes inflamatorios^{13,19,48}. Otra posibilidad es que la activación de PPAR γ inhiba a NF- κ B por mecanismos de transrepresión⁹⁰. En nuestro modelo, los monocitos en diferenciación inducidos por tratamiento con PMA expresaron niveles basales de *MCP1* e *IL1B* y el NO₂-OA, en mayor medida que el NO₂-CLA, disminuyó estos niveles. Las diferencias entre ambos NO₂-FA podrían explicarse porque en las condiciones del ensayo el NO₂-OA podría aductarse más rápidamente a NF- κ B, inhibiéndolo. Otra posibilidad es que la mayor activación de Nrf2 y HSF1 por el NO₂-OA logre inhibir a NF- κ B indirectamente. Esto se basa en reportes que plantean que Nrf2 es capaz de inhibir la fosforilación de I κ B o competir con p65 por co-activadores disminuyendo el grado de activación de NF- κ B^{57,62}. Además hay reportes que indican que Nrf2 es capaz de unirse al ADN de citoquinas pro-inflamatorias evitando su transcripción⁶⁰. Por su parte, HSP70 previene la degradación de I κ B inhibiendo la activación de NF- κ B⁷³. Por lo tanto una mayor activación de estas vías por parte del NO₂-OA podría traducirse en una mayor inhibición de NF- κ B en comparación con el NO₂-CLA. En cambio, los efectos observados sobre las citoquinas pro-inflamatorias no pueden atribuirse únicamente a la transrepresión de NF- κ B mediada por PPAR γ , ya que el NO₂-OA es peor activador de PPAR γ que el NO₂-CLA, pero inhibió en mayor medida la producción de citoquinas inflamatorias. Curiosamente, en presencia de BMS se revirtió la inhibición de *MCP1* inducida por ambos NO₂-FA mientras que disminuyó la inhibición de *IL1B* inducida por el NO₂-OA, lo que sugiere nuevamente la necesidad del transporte mediado por FABP4 para la acción de los NO₂-FA. En este caso, la situación es similar a la descrita para la activación de Nrf2 y HSF1, donde el bloqueo de FABP4 disminuye la cantidad de aductos productivos con NF- κ B, así como también con Keap1 y HSPs, lo que provoca en su conjunto una menor inhibición de NF- κ B. En estos mismos ensayos observamos que el tratamiento con GW9662 revirtió el efecto de los NO₂-FA sobre las citoquinas pro-inflamatorias en menor medida que el BMS. Estos resultados sugieren que PPAR γ contribuye a la inhibición de NF- κ B de manera indirecta a través de la producción de FABP4. Por lo tanto, en presencia de GW9662 disminuyen los niveles de FABP4 necesarios para transportar a los NO₂-FA e inhibir NF- κ B. Sin embargo, la reducción de la producción de FABP4 por el GW9662 no es total (Figura 2.10), de modo que la FABP4 remanente, sería suficiente para proteger parte de los NO₂-FA y promover su reacción con NF- κ B, Keap1 y HSPs, explicando el efecto anti-inflamatorio marginal observado en comparación con el tratamiento con el BMS.

Además de los genes modulados por los NO₂-FA anteriormente descritos, se estudió la expresión de la metaloproteínasa-9 (MMP-9), que había sido reportada en THP-1 como un gen inhibido por la acción del NO₂-OA tras su inducción por el tratamiento con PMA²⁰. Lamentablemente en nuestro sistema no pudimos ver la inducción de la *MMP9* luego del tratamiento con PMA, por lo que no fue posible evaluar los efectos moduladores de los NO₂-FA. Creemos que, a pesar de haber usado el mismo sistema experimental, las diferencias en la concentración del PMA (0.1 μ M vs. 50 μ M) y los tiempos de tratamiento (9 y 16 h vs 6 h) para inducir la diferenciación de las células así como el orden en el que se agregaron los estímulos (primero una incubación con el NO₂-OA y posteriormente el PMA), podrían explicar la falta de inducción de la MMP-9.

Más allá de la falta de evidencias directas de la unión de los NO₂-FA a la FABP4 en el medio intracelular, la demostración de que la actividad de la FABP4 resultó esencial para el disparo de las vías de señalización de los NO₂-FA sugiere que esta interacción ocurre en los monocitos (ver Figura

4.1). La señalización mediada por los NO₂-FA trae como consecuencia la adquisición de un perfil anti-inflamatorio y anti-oxidativo, a la vez que aumenta la expresión de genes relacionados a las funciones resolutivas como CD36. Tomados en conjunto, los resultados indican que PPAR γ y FABP4 constituyen un eje que regula la señalización por los NO₂-FA y modula el fenotipo celular que adquiere la célula (Figura 4.1.).

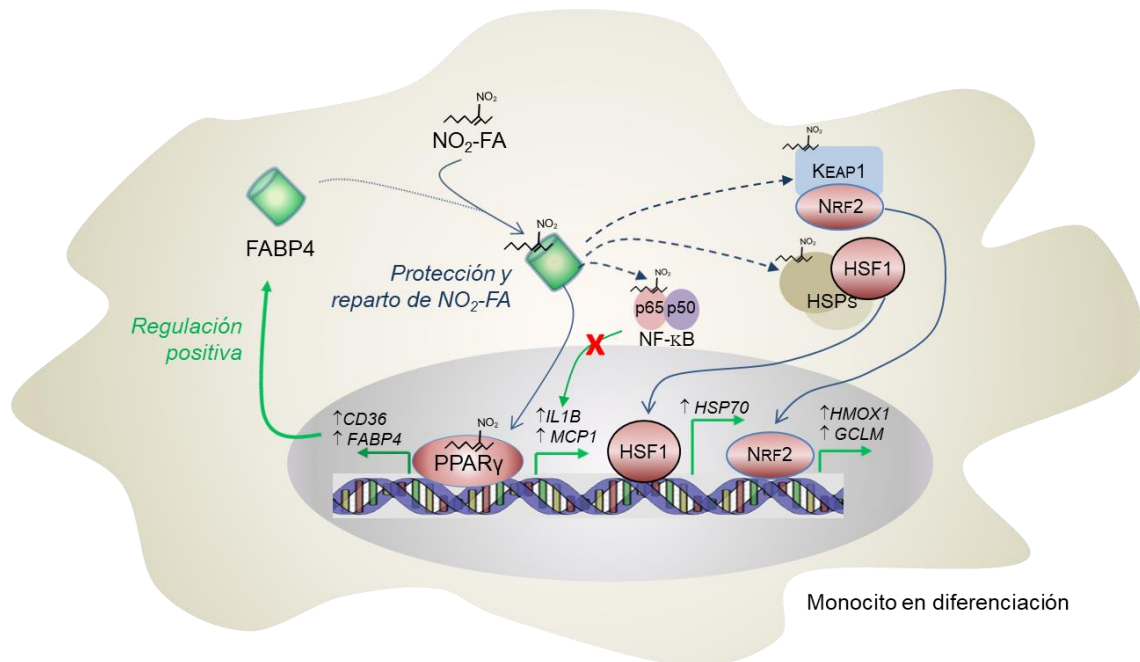


Figura 4.1: El papel del eje FABP4/PPAR γ en la señalización de los NO₂-FA en monocitos en diferenciación.

Los NO₂-FA se comportan como potenciales ligandos de FABP4. Su unión a la proteína los protege de la formación de aductos irrelevantes en la célula y favorece su interacción con factores involucrados en las vías de señalización asociadas a las respuestas anti-inflamatorias y anti-oxidantes como Keap1/Nrf2, HSF1/HSPs y NF- κ B. A su vez, la FABP4 está involucrada en la activación de PPAR γ por los NO₂-FA, mediando el transporte de estos lípidos desde el citoplasma al núcleo donde se encuentra PPAR γ . Como resultado de la activación del factor nuclear, aumenta la expresión de FABP4 y se establece una regulación positiva del eje FABP4/PPAR γ activado por NO₂-FA.

4.3 La presencia de los NO₂-FA durante la diferenciación de los macrófagos modula la expresión de moléculas de superficie y el nivel de FABP4 en el citosol.

En vista de que los NO₂-FA son capaces de activar PPAR γ en monocitos y macrófagos humanos, resultó interesante explorar si esta activación modificaba la respuesta de las células frente a estímulos de tipo clásico o alternativo. Como ya se comentó, para este estudio nos vimos forzados a cambiar el modelo celular ya que si bien se describió que las células THP-1 adquieren un fenotipo alternativo por incubación con IL4 o IL4/IL13^{209,271}, en nuestra experiencia no logramos detectar esta respuesta examinando marcadores característicos de este perfil de diferenciación como el receptor de Mrc1 y Arg1. No nos volcamos a profundizar sobre estas diferencias, creemos que el estado de diferenciación de la célula al momento de la incubación con la IL4 (pre-monocito o macrófago en reposo), los tiempos de estimulación y la actividad específica de la citoquina (varía significativamente entre los distintos proveedores y aún entre diferentes lotes), podrían afectar los

resultados. El uso de monocitos humanos de sangre periférica hubiera sido una alternativa interesante, por trabajar con células primarias evitando las alteraciones genéticas inherentes a las líneas celulares establecidas. Sin embargo, ese abordaje implicaba otras dificultades como introducir variables adicionales al estudio (la variabilidad genética y el control de la condición sanitaria de la población) además de dificultades prácticas; los monocitos de sangre periférica representan un bajo porcentaje del total de las células mononucleadas (2-10 %), dificultando la obtención de cantidades suficientes para cubrir las necesidades de los experimentos ²⁷². Es así que considerando utilizar un cultivo primario que pudiera representar de mejor manera las respuestas fisiológicas frente al uso de líneas celulares, decidimos aprovechar la experiencia de nuestro laboratorio en la preparación y caracterización de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM). Una gran ventaja de este modelo es que utiliza progenitores de médula ósea a los que se les induce la diferenciación a macrófagos, y por lo tanto la estimulación con NO₂-FA podía realizarse desde momentos muy tempranos de la diferenciación. Este detalle no es menor, si se considera que existen evidencias que plantean que la activación de PPAR γ puede condicionar la respuesta de las células cuando es activado durante la diferenciación, pero no cuando se aplica el mismo tratamiento a células ya diferenciadas ²⁰⁶. Por otro lado, las BMDM se definen como macrófagos en reposo, pero se asemejan más a los macrófagos que derivarían de la diferenciación de monocitos de la sangre que a macrófagos residentes de tejido que tienen un origen embrionario, o a macrófagos inflamatorios, previamente estimulados por señales de peligro, que condicionarían su respuesta a un estímulo de tipo M1 o M2. Finalmente la capacidad de respuesta de las BMDM tanto al LPS como a la IL4 está ampliamente reportada en la literatura ^{9,204,273,274} y se contaba con experiencia en nuestro grupo.

El condicionamiento con NO₂-CLA no alteró el rendimiento de la producción de BMDM. En contraste, el NO₂-OA provocó una notoria disminución, a pesar de que las células obtenidas mostraron niveles de viabilidad y aspecto celular similares a los demás tratamientos. Este resultado sugiere algún tipo de interferencia con la diferenciación de los progenitores a macrófagos. En relación con estas observaciones, Verescakova demostró que la diferenciación de progenitores de médula ósea en presencia de NO₂-OA disminuyó la expresión del receptor de M-CSF (M-CSFR), al compararlo con el grupo control ²⁷³. Esta reducción se asoció a un menor número de macrófagos diferenciados y una menor tasa de proliferación al día final de la diferenciación. A su vez determinaron que el tratamiento con NO₂-OA redujo la fosforilación de ERK1/2, PI3K y del propio M-CSFR en los primeros minutos de la diferenciación. En particular, las modificaciones en el receptor de M-CSF podrían explicar alteraciones en la diferenciación de las células, por interferencia con sus funciones señalizadoras donde uno de los mecanismos posibles sería la nitroalquilación de residuos de Cys en el dominio intracelular de M-CSF ²⁷³. Esta idea va de la mano con la hipótesis de que a la misma concentración, las reacciones de aducción del NO₂-CLA a tioles estarán menos favorecidas que con el NO₂-OA. Más aún, en nuestros experimentos la presencia del NO₂-CLA indujo un aumento en el porcentaje y el número de macrófagos (definidos como CD11b⁺F4/80⁺FSC^{alto}).

La diferenciación de los progenitores de médula ósea en presencia de los NO₂-FA aumentó los niveles de CD36 mientras que redujo los niveles de MHCII y CD86 expresados por estas células. Con respecto a CD36, este receptor pertenece a la familia de receptores barrenderos que se encargan de la remoción de desechos celulares y de células apoptóticas presentes en el espacio

extracelular. Esta función contribuye a evitar la generación de señales asociadas a daño tisular, la inducción o amplificación de respuestas inflamatorias, y favorece el desarrollo de mecanismos de reparación del tejido, por lo cual este efecto de los NO₂-FA en los macrófagos estaría de acuerdo con las propiedades anti-inflamatorias descritas en modelos inflamatorios *in vivo*. En cuanto al papel de PPAR γ en la inducción de CD36, la Rosi mostró efectos en el mismo sentido sugiriendo que esta vía podría estar involucrada. Además, esta idea encuentra apoyo en el hecho que la expresión basal de *Cd36* tanto en BMDM como en macrófagos de tejido adiposo disminuye en células así como en animales deficientes en PPAR γ ^{204,275,276}. Sin embargo, los NO₂-FA indujeron respuestas de CD36 de mayor magnitud que la Rosi, sugiriendo la participación de otras vías. Los experimentos con GW9662 no fueron concluyentes porque los niveles de ARNm de *Cd36* se midieron a tiempos muy prolongados (48 h después de la estimulación con NO₂-FA y GW9662), lo cual impide determinar efectos directos de los NO₂-FA sobre la transcripción. En este sentido, resulta necesario evaluar los niveles proteicos de CD36, en BMDM condicionados en presencia o ausencia de GW9662, utilizando técnicas como citometría de flujo o Western blot, para establecer el papel que juega PPAR γ en la regulación de este receptor. En suma parece razonable suponer que PPAR γ tenga un papel secundario en esta respuesta, y que la expresión de *Cd36* sea inducida por otras vías, como ser Nrf2, similarmente a lo descrito en otros modelos²⁷⁷⁻²⁷⁹. Por otro lado, la disminución observada en MHCII y CD86 es interesante porque estas moléculas participan en la conexión de los macrófagos con los linfocitos TCD4⁺. Normalmente, frente a un estímulo como las señales provenientes de patógenos o de daño tisular, los macrófagos son activados, aumentando la expresión de ambas moléculas, lo que contribuiría a la interacción con linfocitos TCD4⁺ efectores capaces de regular las funciones del macrófago. Así, el condicionamiento con NO₂-FA disminuiría por ejemplo la capacidad de estas células de ser activadas por linfocitos TCD4⁺ de tipo inflamatorio. Respecto al papel de PPAR γ en este efecto, nuevamente observamos que la Rosi tuvo un efecto similar sobre estas moléculas pero de menor intensidad que los NO₂-FA. Como el aumento de la expresión de MHCII y CD86 es mediado por señales de peligro que disparan cascadas de señalización que incluyen la activación de NF- κ B, se podría pensar en que parte de este efecto esté ligado a la inhibición de la activación de este factor por los NO₂-FA.

Finalmente, los BMDM condicionados, mostraron un aumento de los niveles proteicos de FABP4 que fue dependiente de PPAR γ . No fue posible detectar este efecto a nivel de la expresión del ARNm, pero esto es probablemente consecuencia de que en estos ensayos el punto final se tomó a las 48 h post-estimulación con NO₂-FA, y por lo tanto el pico de expresión del gen podría haberse perdido. En cambio, como la respuesta a nivel proteico tiene una cinética diferente fue posible evidenciarla a las 48 h. Este resultado está de acuerdo con los resultados obtenidos con los monocitos y macrófagos THP-1 humanos, y confirma que los NO₂-FA son capaces de inducir la expresión de FABP4 por un mecanismo dependiente de PPAR γ en células mieloides en vías de diferenciación a macrófagos.

En suma, podemos decir que durante la diferenciación de precursores mieloides a macrófagos, el condicionamiento con NO₂-FA resultó en una población con características inflamatorias disminuidas, mientras que el nivel de FABP4 y las capacidades fagocítica (al menos la mediada por CD36) y de resolución de la inflamación se vieron aumentadas. Estos efectos probablemente sean consecuencia de la activación de varias vías de señalización, incluyendo PPAR γ y Nrf2, así como también la inhibición de NF- κ B.

4.4 El condicionamiento con los NO₂-FA inhibió la capacidad de los BMDM de adquirir un fenotipo inflamatorio tipo M1, por mecanismos independientes de la FABP4

Como parte de la caracterización del fenotipo adquirido por las BMDM condicionadas con los NO₂-FA, estudiamos cómo respondieron estas células a la estimulación con LPS, un estímulo de tipo clásico. Se observó que el condicionamiento de las BMDM con el NO₂-CLA pero no con Rosi inhibió la expresión de *Il6* y de la enzima *Nos2*; una tendencia similar se observó sobre los niveles de *Il1b*. Este efecto no fue sorprendente ya que existen varios trabajos en macrófagos ya diferenciados donde se han descrito efectos anti-inflamatorios de los NO₂-FA^{13,19,48}, incluyendo el NO₂-CLA²⁸⁰. Varios mecanismos podrían participar en esta modulación. A nivel de NF-κB, se describió que en macrófagos RAW activados con LPS los NO₂-FA fueron capaces de aductarse a la subunidad p65 de NF-κB inhibiendo su actividad transcripcional¹³, y de interferir con la señalización desencadenada por TLR4⁴⁸. Este último mecanismo no está del todo dilucidado, pero involucraría la disrupción del reclutamiento del TLR4 a las balsas lipídicas de la membrana plasmática con la consecuente inhibición del disparo de la señalización a través de TRAF6⁴⁸. Por otro lado, también se reportó que el NO₂-OA interfiere con la activación de las vías de ERK1/2 y p38 MAPK, inhibiendo la producción de IL6, TNFα e IL1²⁸¹. A estos mecanismos se le podría sumar un efecto inhibitorio sobre la fosforilación de STAT1 por activación de la MAPK fosfatasa, de manera independiente de PPARγ y de la nitroalquilación de algún componente²⁸². En nuestros estudios la inhibición por el NO₂-CLA de la expresión de *Il6* y *Nos2* ocurrió probablemente por mecanismos independientes de PPARγ y de la FABP4, ya que no se alteró en presencia de BMS. Esto encuentra apoyo en que la activación de NF-κB por LPS lleva a una temprana y total inhibición de la transcripción de *Pparg* que culmina en una desaparición casi completa de la proteína luego de 4 h de estimulación con LPS²⁶³. Este efecto concuerda con el concepto de que el LPS también reduce la expresión de *FABP4*^{163,251}. Así, el escenario en condiciones donde no existan estímulos inflamatorios, mostraría a PPARγ controlando la eventual respuesta inflamatoria activada por NF-κB, lo cual concuerda con que macrófagos PPARγ-deficientes presentan niveles basales de citoquinas inflamatorias más elevados que los silvestres²⁶³. En contraste un estímulo como el LPS invertiría la situación, por lo cual NF-κB bloquearía el efecto represor de PPARγ²⁶³. Así durante la activación de BMDM condicionadas por LPS, la señalización de los NO₂-FA por PPARγ-FABP4 estaría debilitada, por lo cual el efecto inhibitorio del NO₂-CLA se explicaría por: eventos de nitroalquilación de componentes de la vía de NF-κB, inhibición indirecta de NF-κB a través de la activación de Nrf2 o HSF1, y/o por la activación de fosfatasas que limiten la fosforilación/activación de otros mediadores inflamatorios como ERK1/2, p38 MAPK y STAT1.

4.5 El condicionamiento con los NO₂-FA potencia el fenotipo alternativo inducido por la IL4 en las BMDM de manera dependiente de la FABP4

Como ya se discutió en la Introducción, PPARγ podría jugar un rol en la diferenciación alternativa de los macrófagos, un fenotipo caracterizado por sus propiedades anti-inflamatorias y de reparación tisular. Nos propusimos explorar si la activación de PPARγ por los NO₂-FA durante el proceso de diferenciación a BMDM, era capaz de promover la respuesta de estas células a la

estimulación con IL4, y si la FABP4 participaba en la inducción de este efecto. Para ello evaluamos varios de los genes alternativos inducidos por la IL4 en presencia o ausencia de BMS. El primer punto que resulta importante destacar es que trabajamos con una dosis de IL4 relativamente baja en comparación a la utilizada en la mayoría de los trabajos publicados, (0.5-1 ng/mL vs 20 ng/ml). Esta elección se basó en dos aspectos. Primero, se buscó trabajar en un rango de concentración cercano al fisiológico. En individuos sanos, la concentración de IL4 en suero ronda los 2 pg/ml, mientras que en individuos alérgicos luego de un desafío con un alérgeno puede alcanzar los 60 pg/ml²⁸³⁻²⁸⁵. Es probable que los valores a nivel local sean varios órdenes de magnitud superiores al nivel en suero, y optamos por elegir las concentraciones bajas pero que nos permitieran detectar la respuesta. En segundo lugar, a concentraciones altas de IL4, se podría saturar la respuesta de los genes reporteros, ocultando cualquier cambio producido por la estimulación de PPAR γ . En presencia de IL4, la expresión de *Mrc1*, *Retnla* y *Chi3l3* tendió a aumentar de manera dosis dependiente, pero sólo en el caso de *Mrc1* esta tendencia alcanzó significancia estadística. De todas maneras, la co-estimulación con NO₂-FA no potenció el efecto de la IL4 para ninguno de estos marcadores. Por otra parte, la IL4 no indujo respuestas de *Cd36*, *Fabp4* ni *IL-10*, este último a pesar de no ser un marcador exclusivamente alternativo, presenta funciones reguladoras y se ha reportado su inducción en BMDM estimuladas con IL4²⁸¹. Es posible que las concentraciones de IL4 utilizadas no hayan resultado óptimas para el estudio de estos genes, pero en cualquier caso, hubiera sido esperable poder detectar la potenciación por el NO₂-CLA, cosa que no ocurrió. En el caso del *Cd36*, el tratamiento con el NO₂-CLA volvió a mostrar una clara inducción de este gen que, como se mencionó anteriormente, posiblemente responda a la activación de la vía de Nrf2²⁷⁷⁻²⁷⁹. Además, se observó una reducción de la expresión de *Cd36* en presencia de BMS, lo cual podría ser consecuencia de una reducción de la activación de Nrf2 por los NO₂-FA, debido a que la ausencia de la FABP4 afectaría la señalización de esta vía según lo observado en los experimentos en monocitos THP-1 en diferenciación (explicado anteriormente). Es importante destacar, que en nuestras condiciones la inducción de *Cd36* por la IL4²⁵⁰ queda en un segundo plano frente a los efectos inducidos por el NO₂-CLA/Nrf2, sugiriendo diferencias en la dominancia de los elementos de respuesta a STAT6 en comparación con los ARE en el promotor de *Cd36*²⁸⁶.

En contraste con la respuesta de los genes reporteros arriba discutidos, la expresión de *Arg1* aumentó fuertemente (entre 40 % y 60 %), de manera dosis dependiente, por la estimulación con IL4. Este comportamiento diferencial del gen *Arg1* en la diferenciación alternativa no es sorprendente y posiblemente se asocie con la presencia de un elemento PPRE en su promotor^{204,205}. En nuestros ensayos observamos que el condicionamiento con NO₂-CLA o con la Rosi provocó una potenciación de la expresión de *Arg1* inducida por IL4 a la concentración de 1 ng/ml, mientras que el bloqueo de la FABP4 anuló por completo este efecto. Además, la potenciación por el condicionamiento con el NO₂-CLA también correlacionó con aumento de la actividad arginasa. Tomados en conjunto los resultados indican que la activación de PPAR γ durante el proceso de diferenciación de las células efectivamente influye en la expresión de *Arg1* por la IL4, y que este efecto posiblemente se explique a través de la unión del complejo PPAR γ :NO₂-FA al PPRE del promotor de dicho gen. Por otro lado, la pérdida de potenciación en presencia de BMS es compatible con la reducción de la activación del eje PPAR γ -FABP4, que aseguraría el transporte del NO₂-CLA y de la Rosi a PPAR γ . Sorprendentemente, el tratamiento con BMS en ausencia de ligandos también disminuyó la inducción de *Arg1* inducida por IL4, sugiriendo que existe un transporte de ligandos endógenos que mantiene una activación basal de PPAR γ necesaria para la

señalización por esta citoquina. En particular, sería posible que así como STAT6 actúa como un facilitador de la actividad transcripcional de PPAR γ , interaccionando y favoreciendo su unión al ADN en los promotores de los genes blanco ⁹, PPAR γ podría actuar de igual manera con STAT6 en el promotor de *Arg1*. De este modo, para iniciar la transcripción de la *Arg1* tendría que darse una interacción entre PPAR γ -STAT6 dependiente de ligando. Contrariamente, la ausencia de ligando provocada por ejemplo por el bloqueo de FABP4, podría inhibir por completo esta interacción y por lo tanto la expresión del gen. Es importante aclarar que la regulación de la expresión de *Arg1* comprende varios factores de transcripción entre los que se destacan STAT6, PU.1, C/EBP así como PPAR γ ²⁰⁵, por lo que no se descarta la posibilidad de una interacción entre PPAR γ con otros factores, por ejemplo PU.1 el cual se posiciona más cercano en el promotor de la *Arg1*.

De manera similar a lo observado en BMDM condicionados, se comprobó que el NO₂-CLA logró potenciar la expresión de *Arg1* inducida por la IL4 en monocitos/macrófagos reclutados por tioglicolato. Este efecto se correlacionó con un aumento de la expresión de *Fabp4*, lo que va en línea con la idea de la participación de PPAR γ en la potenciación de *Arg1*.

La capacidad de los NO₂-FA de potenciar la activación alternativa de estadios monocíticos en diferenciación a macrófagos es un conocimiento nuevo, que contrasta con un reporte en donde se observó que el NO₂-OA inhibió la respuesta de *Arg1* inducida por la IL4 en macrófagos RAW 264.7 y BMDM totalmente diferenciadas ²⁸¹. Los autores asociaron este efecto a una interferencia del nitroalqueno con la fosforilación de factores claves en la señalización de la IL4 como ser STAT6 y STAT3, además de la inhibición de la activación de PPAR γ inducida por la IL4. Los resultados de estos autores contrastan casi que totalmente con los nuestros y ponen en evidencia la importancia del estado de diferenciación de las células blanco en los efectos de los NO₂-FA (progenitores en vías de diferenciación vs. BMDM diferenciadas). En particular, el uso de macrófagos diferenciados como modelo, implica una situación en donde la expresión y activación basal de PPAR γ se encuentra aumentada, al igual que la concentración de ligandos endógenos de PPAR γ que podrían ser posibles competidores del NO₂-OA. En este sentido las condiciones no son favorables para determinar la activación de PPAR γ por el NO₂-OA, ya que el margen de inducción de la activación de PPAR γ queda reducido. Vale mencionar que los autores realizaron los ensayos de activación de PPAR γ en células RAW 264.7 transfectadas con el gen de la luciferasa, bajo un promotor conteniendo un sitio PPRE. El hecho de que hayan obtenido resultados opuestos a los nuestros, reafirma el valor de los estudios en cultivo primarios vs. el uso de sistemas artificiales. Curiosamente utilizaron la activación de PPAR γ inducida por el OA como control positivo y determinaron que el tratamiento con el NO₂-OA indujo niveles por debajo del OA. Este dato contradice la evidencia estructural que indica que la presencia del grupo NO₂ favorece el establecimiento de interacciones que estabilizan al LBD de PPAR γ , induciendo un mayor grado de activación ⁴⁵. De manera contrastante, nuestros resultados presentan evidencia contundente de la activación de PPAR γ por los NO₂-FA y no por sus FA precursores, en donde se indujeron varios genes reporteros a nivel de mensajero y proteína, y se inhibieron en presencia de inhibidores específicos de PPAR γ , tanto en células humanas como de ratón.

Los resultados obtenidos *in vitro* confirman que los NO₂-FA son mediadores lipídicos con un gran potencial para regular las funciones de los monocitos y macrófagos y que el eje PPAR-FABP4 podría tener un papel importante en la medida que contribuye a la diferenciación de un fenotipo tipo M2 del macrófago, con propiedades anti-inflamatorias y de reparación tisular. En este trabajo,

buscando evidenciar si las propiedades observadas en los cultivos celulares se reproducen *in vivo*, utilizamos algunos modelos en ratón aceptados como válidos para el análisis de los efectos de la IL4 sobre las poblaciones de macrófagos. Estos modelos utilizan dosis elevadas de IL4 (1µg), que resultan necesarias para apreciar claramente los marcadores alternativos así como el efecto sobre la proliferación de los macrófagos residentes, una actividad de gran importancia porque permite repoblar el tejido de la cavidad peritoneal de macrófagos luego de un proceso inflamatorio. En los dos modelos *in vivo* utilizados no fue posible detectar la potenciación de la *Arg1* observada en los cultivos de BMDM condicionadas y de macrófagos reclutados por tioglicolato. Es posible que las altas concentraciones de citoquina no sólo activaran *per se* la expresión de *Arg1*, sino que además indujeran la síntesis de ligandos endógenos de PPAR γ a través de la inducción de la 15-lipooxigenasa²⁸⁷, promoviendo la activación de este receptor y la sinergia con STAT6. Vale la pena mencionar que en un experimento preliminar realizado en nuestro grupo se observó un efecto potenciador del fenotipo alternativo por el NO₂-OA utilizando una concentración de IL4 mucho menor (20 ng), lo cual apoyaría esta idea. Por otra parte, de lo anterior también se desprende que la dosis de los NO₂-FA es sin duda un factor crítico ya que el NO₂-FA administrado podría haber sido despreciable frente al conjunto de ligandos endógenos generados. Relacionado con esto, un factor que puede haber influido en nuestros estudios es la forma de administración del NO₂-CLA. En la mayoría de los estudios *in vivo* donde se reportaron efectos moduladores de los NO₂-FA se realizó una administración continua utilizando polietilenglicol/etanol como vehículo, a través de un dosificador –bomba sub-cutánea- lo cual permitió liberar lentamente y de forma continua el NO₂-FA, logrando establecer una concentración constante del estímulo a lo largo del tiempo^{100,101,288}. Esto es importante ya que la información derivada del análisis de la distribución de NO₂-OA y sus metabolitos luego de su administración intravenosa a ratones mostró que los NO₂-FA experimentan reacciones de saturación, β -oxidación y aducción *in vivo* que rápidamente reducen la cantidad del componente activo; para dar una idea precisa, una proporción del orden del 40 % puede ser inactivada a los 5 min post-administración por reacciones de saturación que originan los nitroalcanos correspondientes⁸. Si bien no existe información pública sobre la vida media y la distribución de los NO₂-FA administrados por vía intraperitoneal, es probable que se metabolicen de forma similar. En el mismo experimento preliminar donde se observó un efecto potenciador del NO₂-OA, el nitroalqueno se administró en una mezcla con alúmina, un gel que podría haber protegido al NO₂-OA de una rápida metabolización. Como ya se comentó en este experimento preliminar el tratamiento con alúmina *per se* pareció disminuir la capacidad de la IL4 de inducir la expresión de marcadores alternativos, lo cual nos llevó a desestimar su uso en experimentos posteriores.

En suma, se considera que las condiciones particulares utilizadas en estos ensayos probablemente afectaron el resultado, y particularmente, no las consideramos concluyentes debido a que la alta concentración de IL4 se aparta considerablemente de los niveles fisiológicos en los que se encontraría esta citoquina, al menos en una variedad de situaciones asociadas a la fase resolutive de la inflamación. Para profundizar en estos estudios sería necesario realizar ensayos donde se utilicen concentraciones más bajas de IL4, intentando acercarse a los niveles que presentan una relevancia fisiológica. En este sentido sabemos que 20 ng en la cavidad peritoneal permitió ver inducción de la activación alternativa, lo que podría tomarse como un punto de partida para realizar una titulación. Por otro lado, la administración del NO₂-FA debería optimizarse para asegurar una mayor disponibilidad del compuesto a lo largo del tiempo. El uso de las bombas sub-cutáneas representaría la situación ideal, pero en su defecto se debería pensar en la

administración de los NO₂-FA en algún vehículo viscoso que retrasara la difusión en el medio extracelular. En este sentido la utilización de polietilenglicol, que presenta una viscosidad muy superior a la del agua (90 veces), una baja toxicidad, y es ampliamente usado en formulaciones farmacológicas, resulta un buen candidato. Para compensar la falta de la dosificación continua, se podría realizar un pre-tratamiento con inyecciones diarias de NO₂-FA que favorecieran la disponibilidad del mismo al momento de la administración de la IL4 o incluso de la estimulación con tioglicolato. Finalmente, utilizando la dosis óptima de IL4, se debería ensayar un rango de concentraciones de NO₂-FA y evaluar la expresión de marcadores alternativos como Arg1, en paralelo con la FABP4 como reportera de la activación de PPAR γ .

Es válido remarcar que aunque no se logró responder a la interrogante sobre si *in vivo* los NO₂-FA pueden potenciar la activación alternativa de los macrófagos, el trabajo representa un avance para enfrentar este desafío en base a un conjunto de información e ideas sobre cómo explorarlo.

Conclusiones

Los conocimientos generados en esta tesis permiten contestar varias de las preguntas inicialmente planteadas.

1. Se determinó que los NO₂-FA pueden comportarse como activadores parciales de PPAR γ , induciendo la expresión de FABP4, tanto en monocitos en vías de diferenciación a macrófagos como en macrófagos ya diferenciados, aunque en estos últimos los niveles de expresión de este receptor y los ligandos endógenos probablemente hagan menos relevante la activación.
2. Los NO₂-FA se comportaron como ligandos de las FABPs ya que lograron unirse a la FABP1, FABP2 y FABP4 en ensayos *in vitro*. En el ambiente intracelular la presencia de altas concentraciones de GSH (~7 mM) podría interferir con la unión de los NO₂-FA a la FABP4, por un mecanismo independiente de la formación de aductos NO₂-FA-GSH.
3. En los monocitos y macrófagos la FABP4 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, y los NO₂-FA no modificaron esta distribución, sugiriendo que la FABP4 actúa como un transportador no selectivo de ligandos de PPAR γ .
4. La inhibición de la actividad de la FABP4 alteró la señalización de los NO₂-FA, afectando: 1) su capacidad de activar PPAR γ ; 2) su capacidad para activar la vía Keap1/Nrf2 y HSF1 y 3) su capacidad de inhibir la vía de NF- κ B.
5. El condicionamiento de progenitores de médula ósea con NO₂-FA generó una población de células que tienen disminuidas sus capacidades inflamatorias, en relación a la expresión de MHCII y CD86, mientras que ven aumentadas sus capacidades fagocíticas y de resolución de la inflamación por aumento de un marcador alternativo como CD36. Además el condicionamiento con NO₂-FA indujo la activación de PPAR γ en estas células.
6. El condicionamiento con NO₂-FA de BMDM inhibió la expresión de genes inflamatorios inducidos por el LPS como *I16* y *Nos2*, por mecanismos independientes de la FABP4, lo cual es compatible con la regulación negativa ejercida por NF- κ B sobre la expresión de PPAR γ . En contraste, el condicionamiento con NO₂-FA potenció el fenotipo alternativo inducido por IL4 en términos de la expresión *Arg1* por un mecanismo dependiente de la FABP4, compatible con la activación de PPAR γ .
7. No fue posible evidenciar *in vivo* el efecto de los NO₂-FA sobre la potenciación del fenotipo alternativo inducido por IL4; será necesario realizar estudios con diferentes dosis de NO₂-FA e IL4 para concluir acerca de esta interrogante.

De acuerdo con estas observaciones, los conocimientos generados en esta tesis muestran que los NO₂-FA tienen el potencial de activar a PPAR γ en los monocitos en vías de diferenciación a macrófagos y en menor medida en los macrófagos, y esta activación aumenta la expresión de la FABP4, que cumple un papel en los eventos asociados a la señalización de los NO₂-FA a través de varias vías, incluyendo PPAR γ , Keap1/Nrf2 y HSP/HSF1. Así PPAR γ y la FABP4 constituyen un eje que regula la señalización y en consecuencia los efectos moduladores de los NO₂-FA.

En el marco de una reacción inflamatoria, los NO₂-FA formados endógenamente o administrados para contrarrestarla dispararán señales moduladoras en los monocitos reclutados y en los macrófagos residentes, interfiriendo con la vía de NF-κB o activando vías como Keap1/Nrf2 y HSPs/HSF1. Durante la fase de apagado de la inflamación, los NO₂-FA podrán activar el eje PPARγ/FABP4 principalmente en los monocitos reclutados, lo cual favorecerá la movilización de los NO₂-FA a sus blancos en la célula y amplificará los efectos moduladores mediados por la activación de PPARγ, Keap1/Nrf2 y HSPs/HSF1. Por otra parte, si la inflamación tiene un perfil mixto con presencia de células Th2 secretoras de IL4, la activación de PPARγ/FABP4 por los NO₂-FA potenciará probablemente la expresión de *Arg1* en los monocitos y macrófagos, contribuyendo a la diferenciación en el macrófago alternativo, especializado en mediar los procesos de resolución de la inflamación y reparación tisular.

Publicaciones

En el marco de esta tesis se publicaron los principales resultados del Capítulo 2 en la revista Redox Biology bajo el siguiente título

Redox Biology 29 (2020) 101376



A FABP4-PPAR γ signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes

M. Lamas Bervejillo^a, J. Bonanata^{b,c}, G.R. Franchini^d, A. Richeri^e, J.M. Marqués^f, B.A. Freeman^g, F.J. Schopfer^g, E.L. Coitino^{b,c,**}, B. Córscico^d, H. Rubbo^{c,h}, A.M. Ferreira^{a,*}

^aLaboratorio de Inmunología, Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias/Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, CP 11600, Uruguay

^bLaboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, CP 11400, Uruguay

^cCentro de Investigaciones Biomédicas (CelnBio), UdelaR, Montevideo, CP 11800, Uruguay

^dInstituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

^eLaboratorio de Biología Celular, Departamento de Neurofarmacología Experimental, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, CP 11600, Uruguay

^fLaboratorio de Investigación en Vacunas, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, CP 11600, Uruguay

^gDepartment of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, 15213, USA

^hDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR, Montevideo, CP 11800, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Nitro-fatty acids
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Fatty acid binding protein 4
Monocytes
Macrophages
Lipid signaling

ABSTRACT

Nitro-fatty acids (NO₂-FA) are electrophilic lipid mediators derived from unsaturated fatty acid nitration. These species are produced endogenously by metabolic and inflammatory reactions and mediate anti-oxidative and anti-inflammatory responses. NO₂-FA have been postulated as partial agonists of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ), which is predominantly expressed in adipocytes and myeloid cells. Herein, we explored molecular and cellular events associated with PPAR γ activation by NO₂-FA in monocytes and macrophages. NO₂-FA induced the expression of two PPAR γ reporter genes, Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) and the scavenger receptor CD36, at early stages of monocyte differentiation into macrophages. These responses were inhibited by the specific PPAR γ inhibitor GW9662. Attenuated NO₂-FA effects on PPAR γ signaling were observed once cells were differentiated into macrophages, with a significant but lower FABP4 up-regulation, and no induction of CD36. Using *in vitro* and *in silico* approaches, we demonstrated that NO₂-FA bind to FABP4. Furthermore, the inhibition of monocyte FA binding by FABP4 diminished NO₂-FA-induced up-regulation of reporter genes that are transcriptionally regulated by PPAR γ , Keap1/Nrf2 and HSF1, indicating that FABP4 inhibition mitigates NO₂-FA signaling actions. Overall, our results affirm that NO₂-FA activate PPAR γ in monocytes and upregulate FABP4 expression, thus promoting a positive amplification loop for the downstream signaling actions of this mediator.

Bibliografía

1. Turell, L. *et al.* The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid. *J. Biol. Chem.* **292**, 1145–1159 (2017).
2. J.R., L. J. Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: Kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem. Res. Toxicol.* (2006).
3. Radi, R., Denicola, A. & Freeman, B. A. Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methods Enzymol.* (1999). doi:10.1016/S0076-6879(99)01099-X
4. Eiserich, J. P. *et al.* Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* (1998). doi:10.1038/34923
5. Brennan, M. L. *et al.* A tale of two controversies. Defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M112400200
6. Castro, L., Eiserich, J. P., Sweeney, S., Radi, R. & Freeman, B. A. Cytochrome c: A catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* (2004). doi:10.1016/j.abb.2003.08.033
7. O'Donnell, V. B. *et al.* Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem. Res. Toxicol.* (1999). doi:10.1021/tx980207u
8. Rudolph, V. *et al.* Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, β -oxidation, and protein adduction. *J. Biol. Chem.* **284**, 1461–1473 (2009).
9. Szanto, A. *et al.* STAT6 Transcription Factor Is a Facilitator of the Nuclear Receptor PPAR γ -Regulated Gene Expression in Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* **33**, 699 (2010).
10. Baker, P. R. S., Schopfer, F. J., Sweeney, S. & Freeman, B. A. Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: Synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11577–11582 (2004).
11. Baker, P. R. S. *et al.* Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J. Biol. Chem.* **280**, 42464–42475 (2005).
12. Lima, É. S., Di Mascio, P., Rubbo, H. & Abdalla, D. S. P. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry* **41**, 10717–10722 (2002).
13. Cui, T. *et al.* Nitrated Fatty Acids: Endogenous Anti-inflammatory Signaling Mediators. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686–35698 (2006).
14. Batthyany, C. *et al.* Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**, 20450–20463 (2006).
15. Trostchansky, A. & Rubbo, H. Nitrated fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1887–1896 (2008).
16. Tsikas, D., Zoerner, A. A., Mitschke, A. & Gutzki, F. M. Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: A targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids* **44**, 855–865 (2009).
17. Nadtochiy, S. M., Baker, P. R. S., Freeman, B. A. & Brookes, P. S. Mitochondrial nitroalkene formation and mild uncoupling in ischaemic preconditioning: Implications for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **82**, 333–340 (2009).
18. Rudolph, V. *et al.* Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovascular Research* **85**, (2010).

19. Ferreira, A. M. *et al.* Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem. J.* **417**, 223–234 (2009).
20. Bonacci, G. *et al.* Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J. Biol. Chem.* **286**, 16074–16081 (2011).
21. Salvatore, S. R. *et al.* Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J Lipid Res* **54**, 1998–2009 (2013).
22. Claridge, R. P., Deeming, A. J., Paul, N., Tocher, D. A. & Ridd, J. H. The reactions of nitrogen dioxide with dienes. *J. Chem. Soc* 3523–3528 (1998).
23. Bonacci, G. *et al.* Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J. Biol. Chem.* **287**, 44071–44082 (2012).
24. Villacorta, L. *et al.* In situ generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol.* **15**, 522–531 (2018).
25. Delmastro-Greenwood, M. *et al.* Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 333–341 (2015).
26. Schopfer, F. J. *et al.* Covalent peroxisome proliferator-activated receptor γ adduction by nitro-fatty acids: Selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J. Biol. Chem.* **285**, 12321–12333 (2010).
27. Coles, B. *et al.* Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *J. Biol. Chem.* **277**, 5832–5840 (2002).
28. Trostchansky, A. *et al.* Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry* **46**, 4645–4653 (2007).
29. González-Perilli, L. *et al.* Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **58**, 126–133 (2013).
30. Wright, M. M. *et al.* Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4299–304 (2006).
31. Villacorta, L. *et al.* Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1 / Nrf2 signaling pathway. **48109**, 770–776 (2007).
32. Ferrari, M. Modulación de la activación de los macrófagos por nitrolípidos: efectos sobre la inducción de las enzimas óxido nítrico sintasa y hemo-oxigenasa I. (Universidad de la República, 2008).
33. Blanco, F. *et al.* 6-Methylnitroarachidonate: A novel esterified nitroalkene that potently inhibits platelet aggregation and exerts cGMP-mediated vascular relaxation. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 411–418 (2011).
34. Balazy, M. *et al.* Vicinal nitrohydroxyecosatrienoic acids: Vasodilator lipids formed by reaction of nitrogen dioxide with arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2001).
35. Schopfer, F. J. *et al.* Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.* **280**, 19289–19297 (2005).
36. Lima, É. S. *et al.* Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 532–539 (2005).
37. Baker, L. M. S. *et al.* Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine: Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J. Biol. Chem.* **282**, 31085–31093 (2007).
38. Rubbo, H., Denicola, A. & Radi, R. Peroxynitrite Inactivates Thiol-Containing Enzymes of Trypanosoma cruzi Energetic Metabolism and Inhibits Cell Respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 96–102 (1994).
39. Zhang, J. *et al.* Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* **107**, 540–548 (2010).
40. Khoo, N. K. H. & Freeman, B. A. Electrophilic nitro-fatty acids: Anti-inflammatory mediators in the vascular compartment. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 179–184 (2010).

41. Mata-Pérez, C. *et al.* Nitro-fatty acids in plant signaling: Nitro-linolenic acid induces the molecular chaperone network in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **170**, 686–701 (2016).
42. Kansanen, E. *et al.* Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J. Biol. Chem.* **284**, 33233–33241 (2009).
43. Schopfer, F. J. *et al.* Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2340–5 (2005).
44. Alexander, R. L. *et al.* Differential potencies of naturally occurring regioisomers of nitrolinoleic acid in PPAR γ activation. *Biochemistry* **48**, 492–498 (2009).
45. Gorczynski, M. J. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) by nitroalkene fatty acids: importance of nitration position and degree of unsaturation. *J Med Chem.* **52**, 4631–4639 (2009).
46. Lenardo, M. J. & Baltimore, D. NF- κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**, 227–229 (1989).
47. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225–260 (1998).
48. Villacorta, L. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc. Res.* **98**, 116–24 (2013).
49. Taniguchi, K. & Karin, M. NF-B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 309–324 (2018).
50. Tu, W., Wang, H., Li, S., Liu, Q. & Sha, H. The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging Dis.* **10**, 637 (2019).
51. Cuadrado, A. *et al.* Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 295–317 (2019).
52. Ogura, T. *et al.* Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2842–2847 (2010).
53. Tkachev, V. O., Menshchikova, E. B. & Zenkov, N. K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochem.* **76**, 407–422 (2011).
54. Sporn, M. B. & Liby, K. T. NRF2 and cancer: The Good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 564–571 (2012).
55. Nath, K. A. Heme oxygenase-1: A provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues. *Kidney Int.* **70**, 432–443 (2006).
56. Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**, 42–59 (2009).
57. Thimmulappa, R. K. *et al.* Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.* **116**, 984–995 (2006).
58. Braun, S. *et al.* Nrf2 Transcription Factor, a Novel Target of Keratinocyte Growth Factor Action Which Regulates Gene Expression and Inflammation in the Healing Skin Wound. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5492–5505 (2002).
59. Long, M. *et al.* An essential role of NRF2 in diabetic wound healing. *Diabetes* **65**, 780–793 (2016).
60. Kobayashi, E. H. *et al.* Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* **7**, 1–14 (2016).
61. Kovac, S. *et al.* Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 794–801 (2015).
62. Kim, K. H. *et al.* Nrf2 is essential for the expression of lipocalin-prostaglandin D synthase induced by prostaglandin D2. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 1134–1142 (2013).
63. Lee, H. Y. *et al.* Controlling Hematopoiesis through Sumoylation-Dependent Regulation of a GATA Factor. *Mol. Cell* **36**, 984–995 (2009).
64. Kim, J. E. *et al.* Suppression of NF- κ B signaling by KEAP1 regulation of IKK β activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell. Signal.* **22**, 1645–1654

- (2010).
65. Diaz-Amarilla, P. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation. *Free Radic. Biol. Med.* **95**, 112–120 (2016).
 66. Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E. T. & Thiele, D. J. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 4–19 (2018).
 67. Yue, S. *et al.* The myeloid heat shock transcription factor 1/ β -catenin axis regulates NLR family, pyrin domain-containing 3 inflammasome activation in mouse liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* **64**, 1683–1698 (2016).
 68. Neef, D. W. *et al.* A direct regulatory interaction between chaperonin TRiC and stress-responsive transcription factor HSF1. *Cell Rep.* **9**, 955–966 (2014).
 69. Jacobs, A. T. & Marnett, L. J. Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. *Acc. Chem. Res.* **43**, 673–683 (2010).
 70. Vila, A. *et al.* Identification of protein targets of 4-hydroxynonenal using click chemistry for ex vivo biotinylation of azido and alkynyl derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 432–444 (2008).
 71. Wang, Y., Gibney, P. A., West, J. D. & Morano, K. A. The yeast Hsp70 Ssa1 is a sensor for activation of the heat shock response by thiol-reactive compounds. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3290–3298 (2012).
 72. Sivéry, A., Courtade, E. & Thommen, Q. A minimal titration model of the mammalian dynamical heat shock response. *Phys. Biol.* **13**, (2016).
 73. Chen, H. *et al.* Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination. *FEBS Lett.* **580**, 3145–3152 (2006).
 74. Poulsen, L. la C., Siersbæk, M. & Mandrup, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 631–639 (2012).
 75. Chandra, V. *et al.* Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **456**, 350–356 (2008).
 76. Lamas Bervejillo, M. & Ferreira, A. M. *Understanding peroxisome proliferator-activated receptors: From the structure to the regulatory actions on metabolism. Advances in Experimental Medicine and Biology* **1127**, (2019).
 77. Mangelsdorf, D. J. *et al.* Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* **6**, 329–344 (1992).
 78. DiRenzo, J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2166–2176 (1997).
 79. Kalkhoven, E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1145–1155 (2004).
 80. Nolte, R. T. *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature* **395**, 137–143 (1998).
 81. Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318–23 (1997).
 82. Forman, B. M., Chen, J. & Evans, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4312–4317 (1997).
 83. Zoete, V., Grosdidier, A. & Michielin, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771**, 915–925 (2007).
 84. Kroker, A. J. & Bruning, J. B. Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR γ partial agonism. *PPAR Res.* (2015). doi:10.1155/2015/816856
 85. Singh, S., Loke, Y. K. & Furberg, C. D. Long-term risk of cardiovascular events with rosiglitazone: A meta-analysis. *J. Am. Med. Assoc.* **298**, 1189–1195 (2007).
 86. Nissen, S. E. & Wolski, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and

- death from cardiovascular causes. *N. Engl. J. Med.* **356**, 2457–2471 (2007).
87. Ricote, M. & Glass, C. K. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771**, 926–935 (2007).
 88. Pascual, G. *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature* **437**, 759–763 (2005).
 89. Li, Y. *et al.* Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . *Nat Struct Mol Biol.* **7915**, 865–867 (2008).
 90. Reddy, A. T. *et al.* The Nitrated Fatty Acid 10-Nitro-Oleate Attenuates Allergic Airway Disease. *J. Immunol.* **191**, 2053–2063 (2013).
 91. Nie, H. *et al.* Nitro-oleic acid attenuates OGD/R-triggered apoptosis in renal tubular cells via inhibition of bax mitochondrial translocation in a ppar- γ -dependent manner. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 1201–1218 (2015).
 92. Koenitzer, J. R. *et al.* Fatty acid nitroalkenes induce resistance to ischemic cardiac injury by modulating mitochondrial respiration at complex II. *Redox Biol.* **8**, 1–10 (2016).
 93. Rudolph, T. K. *et al.* Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–45 (2010).
 94. Cole, M. P. *et al.* Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ. Res.* **105**, 965–972 (2009).
 95. Kinke, A., Möller, A. & Rudolph, T. K. Protective Effects of 10-nitro-oleic Acid in a Hypoxia-Induced Murine Model of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* **51**, 155–162 (2014).
 96. Reddy, A. T., Lakshmi, S. P. & Reddy, R. C. The nitrated fatty acid 10-nitro-oleate diminishes severity of Ips-induced acute lung injury in mice. *PPAR Res.* **2012**, (2012).
 97. Liu, H. *et al.* Nitro-oleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **295**, 942–949 (2008).
 98. Arbeeny, C. M. *et al.* CXA-10, a nitrated fatty acid, is renoprotective in deoxycorticosterone acetate-salt nephropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **369**, 503–510 (2019).
 99. Liu, S. *et al.* Nitro-oleic acid protects against adriamycin-induced nephropathy in mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **305**, 1533–1541 (2013).
 100. Khoo, N. K. H. *et al.* Electrophilic nitro-oleic acid reverses obesity-induced hepatic steatosis. *Redox Biol.* **22**, 101132 (2019).
 101. Rom, O. *et al.* Nitro-fatty acids protect against steatosis and fibrosis during development of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *EBioMedicine* **41**, 62–72 (2019).
 102. Borniquel S, Jansson E, Cole M, Freeman B, L. J. Nitrated oleic acid up-regulates PPARgamma and attenuates experimental inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 499–505 (2010).
 103. Wang, H., Liu, H., Jia, Z., Guan, G. & Yang, T. Effects of endogenous PPAR agonist nitro-oleic acid on metabolic syndrome in obese Zucker rats. *PPAR Res.* **2010**, 9–11 (2010).
 104. Trostchansky, A. *et al.* Profile of arachidonic acid-derived inflammatory markers and its modulation by nitro-oleic acid in an inherited model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–11 (2018).
 105. Mathers, A. R. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids suppress allergic contact dermatitis in mice. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **72**, 656–664 (2017).
 106. Thumser, A. E., Moore, J. B. & Plant, N. J. Fatty acid binding proteins: Tissue-specific functions in health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **17**, 124–129 (2014).
 107. McKillop, I. H., Girardi, C. A. & Thompson, K. J. Role of fatty acid binding proteins (FABPs) in cancer development and progression. *Cell. Signal.* **62**, 109336 (2019).
 108. Xu, A. *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin. Chem.* **52**, 405–413 (2006).
 109. Ishimura, S. *et al.* Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One* **8**, (2013).
 110. Banaszak, L. *et al.* Lipid-binding proteins: A family of fatty acid and retinoid transport

- proteins. *Adv. Protein Chem.* **45**, 89–151 (1994).
111. Richieri, G. V., Ogata, R. T. & Kleinfeld, A. M. Fatty acid interactions with native and mutant fatty acid binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **192**, 77–85 (1999).
 112. He, Y. *et al.* Solution-state molecular structure of apo and oleate-liganded liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry* **46**, 12543–56 (2007).
 113. Richieri, G. V., Ogata, R. T., Zimmerman, A. W., Veerkamp, J. H. & Kleinfeld, A. M. Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry* **39**, 7197–204 (2000).
 114. Storch, J. & Thumser, A. E. A. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1486**, 28–44 (2000).
 115. Furuhashi, M. & Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 489–503 (2008).
 116. Tan, N. *et al.* Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating T. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5114–5127 (2002).
 117. Wolfrum, C., Borrmann, C. M., Borchers, T. & Spener, F. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors α - and γ -mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: A signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2323–2328 (2001).
 118. Ayers, S. D., Nedrow, K. L., Gillilan, R. E. & Noy, N. Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPAR γ by FABP4. *Biochemistry* **46**, 6744–6752 (2007).
 119. Makowski, L. & Hotamisligil, G. S. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **16**, 543–548 (2005).
 120. Gillilan, R. E., Ayers, S. D. & Noy, N. Structural Basis for Activation of Fatty Acid-binding Protein 4. *J. Mol. Biol.* **372**, 1246–1260 (2007).
 121. Ek, B. A., Cistola, D. P., Hamilton, J. A., Kaduce, T. L. & Spector, A. A. Fatty acid binding proteins reduce 15-lipoxygenase-induced oxygenation of linoleic acid and arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1346**, 75–85 (1997).
 122. Dickinson Zimmer, J. S., Dyckes, D. F., Bernlohr, D. A. & Murphy, R. C. Fatty acid binding proteins stabilize leukotriene A4: Competition with arachidonic acid but not other lipoxygenase products. *J. Lipid Res.* **45**, 2138–44 (2004).
 123. Boiteux, G. *et al.* A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *Int. J. Cancer* **124**, 1820–8 (2009).
 124. Levi, A. J., Gatmaitan, Z. & Arias, I. M. Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J. Clin. Invest.* **48**, 2156–67 (1969).
 125. Vogel Hertz, A. & Bernlohr, D. A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: Molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 175–80 (2000).
 126. Chuang, S., Velkov, T., Horne, J., Porter, C. J. H. & Scanlon, M. J. Characterization of the drug binding specificity of rat liver fatty acid binding protein. *J. Med. Chem.* **51**, 3755–64 (2008).
 127. Richieri, G. V., Ogata, R. T. & Kleinfeld, A. M. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J. Biol. Chem.* **269**, 23918–23930 (1994).
 128. Bordewick, U., Heese, M., Borchers, T., Robenek, H. & Spener, F. Compartmentation of Hepatic Fatty-Acid-Binding Protein in Liver Cells and Its Effect on Microsomal Phosphatidic Acid Biosynthesis. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **370**, 229–38 (1989).
 129. Martin, G. G. *et al.* Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene. *J. Biol. Chem.* **278**,

- 21429–38 (2003).
130. Newberry, E. P. *et al.* Decreased Hepatic Triglyceride Accumulation and Altered Fatty Acid Uptake in Mice with Deletion of the Liver Fatty Acid-binding Protein Gene. *J. Biol. Chem.* **278**, 21429–38 (2003).
 131. Martin, G. G. *et al.* Liver fatty acid binding protein gene ablation potentiates hepatic cholesterol accumulation in cholesterol-fed female mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, 36–48 (2006).
 132. Newberry, E. P., Xie, Y., Kennedy, S. M., Luo, J. & Davidson, N. O. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* **44**, 1191–205 (2006).
 133. Darimont, C., Gradoux, N., Persohn, E., Cumin, F. & De Pover, A. Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* **41**, 84–92 (2000).
 134. Cohn, S. M., Simon, T. C., Roth, K. A., Birkenmeier, E. H. & Gordon, J. I. Use of transgenic mice to map cis-acting elements in the intestinal fatty acid binding protein gene (Fabpi) that control its cell lineage-specific and regional patterns of expression along the duodenal-colonic and crypt-villus axes of the gut epithelium. *J. Cell Biol.* **119**, 27–44 (1992).
 135. Agellon, L. B. *et al.* Loss of intestinal fatty acid binding protein increases the susceptibility of male mice to high fat diet-induced fatty liver. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771**, 1283–1288 (2007).
 136. Lagakos, W. Differential enterocyte partitioning of fatty acids in intestinal fatty acid-binding protein-null mice (IFABP^{-/-}). *FASEB J.* **23**, (2009).
 137. Lagakos, W. Intestinal lipid metabolism is altered in Liver Fatty Acid-Binding Protein-null mice (LFABP^{-/-}). *FASEB J.* **21**, (2007).
 138. De Gerónimo, E. *et al.* IFABP portal region insertion during membrane interaction depends on phospholipid composition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 141–50 (2014).
 139. Vassileva, G., Huwyler, L., Poirier, K., Agellon, L. B. & Toth, M. J. The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J.* **14**, 2040–6 (2000).
 140. Furuhashi, M. *et al.* Local production of fatty acid-binding protein 4 in epicardial/perivascular fat and macrophages is linked to coronary atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 825–834 (2016).
 141. Shum, B. O. V. *et al.* The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **116**, 2183–2192 (2006).
 142. Amri, E. Z., Ailhaud, G. & Grimaldi, P. Regulation of adipose cell differentiation. II. Kinetics of induction of the aP2 gene by fatty acids and modulation by dexamethasone. *J. Lipid Res.* **32**, 1457–63 (1991).
 143. Kletzien, R. F., Foellmi, L. A., Harris, P. K. W., Wyse, B. M. & Clarke, S. D. Adipocyte fatty acid-binding protein: Regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Mol. Pharmacol.* **42**, 558–62 (1992).
 144. Makowski, L. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* **7**, 699–705 (2001).
 145. Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M. F. & Garvey, W. T. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **165**, 259–269 (2002).
 146. Kazemi, M. R., McDonald, C. M., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C. & Feingold, K. R. Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Expression and Lipid Accumulation Are Increased During Activation of Murine Macrophages by Toll-Like Receptor Agonists. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1220–1224 (2005).
 147. Pelton, P. D., Zhou, L., Demarest, K. T. & Burris, T. P. PPAR γ activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.* **261**, 456–458 (1999).
148. Fu, Y., Luo, N. & Lopes-Virella, M. F. Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and protein in human THP-1 macrophages. *J. Lipid Res.* **41**, 2017–2023 (2000).
 149. Garin-Shkolnik, T., Rudich, A., Hotamisligil, G. S. & Rubinstein, M. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues. *Diabetes* **63**, 900–911 (2014).
 150. Sessler, R. J. & Noy, N. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol. Cell* **18**, 343–53 (2005).
 151. Cao, H. *et al.* Adipocyte lipid chaperone aP2 Is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab.* **17**, 768–78 (2013).
 152. Mita, T. *et al.* FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity* **23**, 359–67 (2015).
 153. Ertunc, M. E. *et al.* Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *J. Lipid Res.* **56**, 423–34 (2015).
 154. Fuseya, T. *et al.* Ectopic fatty acid-binding protein 4 expression in the vascular endothelium is involved in neointima formation after vascular injury. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, (2017).
 155. Bosquet, A. *et al.* Exogenous FABP4 induces endoplasmic reticulum stress in HepG2 liver cells. *Atherosclerosis* **249**, 191–9 (2016).
 156. Yang, R. *et al.* RNAi-mediated germline knockdown of FABP4 increases body weight but does not improve the deranged nutrient metabolism of diet-induced obese mice. *Int. J. Obes.* **35**, 217–225 (2011).
 157. Hui, X. *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH 2-terminal kinases and activator protein-1. *J. Biol. Chem.* **285**, 10273–10280 (2010).
 158. Makowski, L. & Hotamisligil, G. S. The Fatty Acid-binding Protein, aP2, Coordinates Macrophage Cholesterol Trafficking and Inflammatory Activity: MACROPHAGE EXPRESSION OF aP2 IMPACTS PEROXISOME PROLIFERATORACTIVATED RECEPTOR γ AND I κ B KINASE ACTIVITIES. *J Biol Chem* **280**, 12888–12895 (2005).
 159. Boord, J. B. *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1686–91 (2002).
 160. Adida, A. & Spener, F. Adipocyte-type fatty acid-binding protein as inter-compartmental shuttle for peroxisome proliferator activated receptor γ agonists in cultured cell. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 172–181 (2006).
 161. Helledie, T. *et al.* Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J. Lipid Res.* **41**, 1740–1751 (2000).
 162. Hughes, M. L. R. *et al.* Fatty acid-binding proteins 1 and 2 differentially modulate the activation of peroxisome proliferator-activated receptor α in a ligand-selective manner. *J. Biol. Chem.* **290**, 13895–13906 (2015).
 163. Boß, M., Kemmerer, M., Brüne, B. & Namgaladze, D. FABP4 inhibition suppresses PPAR γ activity and VLDL-induced foam cell formation in IL-4-polarized human macrophages. *Atherosclerosis* **240**, 424–430 (2015).
 164. Furuhashi, M. *et al.* Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* **447**, 959–965 (2007).
 165. Rolph, M. S. *et al.* Regulation of Dendritic Cell Function and T Cell Priming by the Fatty Acid-Binding Protein aP2. *J. Immunol.* **177**, 7794–7801 (2006).
 166. Williams, M., Mildner, A. & Yona, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* **49**, 595–613 (2018).
 167. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (80-.)*. **327**, 656–661 (2010).
 168. Patel, B., Ismahil, M. A., Hamid, T., Bansal, S. S. & Prabhu, S. D. Mononuclear phagocytes are

- dispensable for cardiac remodeling in established pressure-overload heart failure. *PLoS One* **12**, (2017).
169. Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science (80-.)*. **325**, 612–6 (2009).
 170. Yona, S. *et al.* Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
 171. Bartocci, A. *et al.* Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6179–83 (1987).
 172. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (80-.)*. **317**, 666–70 (2007).
 173. Fife, B. T., Huffnagle, G. B., Kuziel, W. A. & Karpus, W. J. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **192**, 899–905 (2000).
 174. Satoh, T. *et al.* Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* **541**, 96–101 (2017).
 175. Hilgendorf, I., Swirski, F. K. & Robbins, C. S. Monocyte fate in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 272–9 (2015).
 176. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–47 (2007).
 177. Graubardt, N. *et al.* Ly6Chi monocytes and their macrophage descendants regulate neutrophil function and clearance in acetaminophen-induced liver injury. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 178. Shechter, R. *et al.* Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.* **6**, (2009).
 179. Plebanek, M. P., Bhaumik, D., Bryce, P. J. & Shad Thaxton, C. Scavenger receptor type B1 and lipoprotein nanoparticle inhibit myeloid-derived suppressor cells. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 686–697 (2018).
 180. Michaud, J. P. *et al.* Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer’s disease-related pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1941–6 (2013).
 181. Carlin, L. M. *et al.* Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* **253**, 362–75 (2013).
 182. Blériot, C. *et al.* Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* **42**, 145–58 (2015).
 183. Askenase, M. H. *et al.* Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* **42**, 1130–42 (2015).
 184. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science (80-.)*. **336**, 86–90 (2012).
 185. Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (80-.)*. **330**, 841–5 (2010).
 186. Williams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 571–578 (2014).
 187. Greter, M. *et al.* Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* **37**, 1050–1060 (2012).
 188. Wang, Y. *et al.* IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* **13**, 753–60 (2012).
 189. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969 (2008).
 190. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–92 (1992).

191. Gordon, S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927–30 (2002).
192. O'Shea, J. J. & Murray, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity* **28**, 477–87 (2008).
193. Loke, P. *et al.* Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4 + T Cells to be Sustained during Chronic Infection. *J. Immunol.* **179**, 3926–36 (2007).
194. Rückerl, D. & Allen, J. E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunol. Rev.* **262**, 113–33 (2014).
195. Rutschman, R. *et al.* Cutting Edge: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production. *J. Immunol.* **166**, 2173–7 (2001).
196. El Kasmi, K. C. *et al.* Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **9**, 1399–406 (2008).
197. Raes, G. *et al.* Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 597–602 (2002).
198. Munitz, A. *et al.* Resistin-like molecule α enhances myeloid cell activation and promotes colitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 1200–1207 (2008).
199. Jenkins, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. *Science (80-.).* **332**, 1284–1288 (2011).
200. Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: A coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology* **6**, 318–28 (2006).
201. Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. & Mosser, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1298–307 (2006).
202. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
203. Huang, J. T. *et al.* Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400**, 378–82 (1999).
204. Odegaard, J. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–1120 (2007).
205. Pourcet, B. & Pineda-Torra, I. Transcriptional regulation of macrophage arginase 1 expression and its role in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **23**, 143–152 (2013).
206. Bouhrel, M. A. *et al.* PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metab.* **6**, 137–143 (2007).
207. Stienstra, R. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **283**, 22620–7 (2008).
208. Tsuchiya, S. *et al.* Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* **42**, 1530–6 (1982).
209. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **23**, 37–45 (2014).
210. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **5**, (2010).
211. Hsu, K. T. & Storch, J. Fatty Acid Transfer from Liver and Intestinal Fatty Acid-binding Proteins to Membranes Occurs by Different Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **271**, 13317–13323 (1996).
212. Fazzari, M. *et al.* Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment. *J. Lipid Res.* **58**, 375–385 (2017).
213. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
214. Pullen, G. R., Fitzgerald, M. G. & Hosking, C. S. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J. Immunol. Methods* **86**, 83–7 (1986).

215. Leesnitzer, L. M. *et al.* Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* **41**, 6640–6650 (2002).
216. Hertzfel, A. V. *et al.* Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Fatty Acid Binding Proteins. *J. Med. Chem.* **52**, 6024–6031 (2009).
217. Xu, H. *et al.* Uncoupling lipid metabolism from inflammation through fatty acid binding protein-dependent expression of UCP2. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1055–65 (2015).
218. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
219. Rueden, C. T. *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 529 (2017).
220. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–82 (2012).
221. Poglitsch, M., Katholnig, K., Säemann, M. D. & Weichhart, T. Rapid isolation of nuclei from living immune cells by a single centrifugation through a multifunctional lysis gradient. *J. Immunol. Methods* **373**, 167–173 (2011).
222. Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16–22 (2006).
223. Maria Curto, L., Javier Caramelo, J., Raquel Franchini, G. & Maria Delfino, J. Delta 98 Delta, a minimalist model of antiparallel beta-sheet proteins based on intestinal fatty acid binding protein. *Protein Sci.* **18**, 735–746 (2009).
224. Norris, A. W. & Li, E. Fluorometric Titration of the CRABPs. in *Retinoid Protocols. Methods in Molecular Biology* (ed. Redfern, C. P. F.) **89**, 123–139 (Humana Press Inc., 1998).
225. Arighi, C. N., Rossi, J. P. F. C. & Delfino, J. M. Temperature-Induced Conformational Switch in Intestinal Fatty Acid Binding Protein (IFABP) Revealing an Alternative Mode for Ligand Binding †. *Biochemistry* **42**, 7539–7551 (2003).
226. Lamas Bervejillo, M., Jenner, B. & Ferreira, A. A FABP4-PPAR γ signaling axis regulates human monocyte responses to electrophilic fatty acid nitroalkenes. *Redox Biol.* (2019). doi:10.1016
227. Xu, Z., Bernlohr, D. A. & Banaszak, L. J. The Adipocyte Lipid-Binding Protein At 1.6- \AA Resolution - Crystal-Structures of the Apoprotein and With Bound Saturated and Unsaturated Fatty-Acids. *J. Biol. Chem.* **268**, 7874–7884 (1993).
228. Case, DA, Cerrutti DS, Cheatham III TA, Darden TA, Duke RE, Giese TJ, Gohlke H, Goetz AW, Greene D, Homeyer N, Izadi S, Kovalenko A, Lee TS, LeGrand S, Li P, Lin C, Liu J, Luchko T, Luo R, Mermelstein D, Merz KM, Monard G, Nguyen H, Omelyan I, Onufriev A, W. R. & Wang J, Wolf RM, Wu X, Xiao L, York DM, Kollman, P. AMBER16. *University of California, San Francisco* (2017).
229. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry.* (Wiley and Sons Ltd, 2017).
230. Tomasi, J., Menucci, B. & Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3093 (2005).
231. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegaw, C. J. F. D. Gaussian 09 Revision D.01. *Gaussian Inc.: Wallingford, CT, USA* (2013).
232. Kollman, P. A. *et al.* Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc. Chem. Res.* **33**, 889–897 (2000).
233. Miller, B. R. *et al.* MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3314–3321 (2012).
234. Porfido, J. L. *et al.* Direct Interaction between EgFABP1, a Fatty Acid Binding Protein from *Echinococcus granulosus*, and Phospholipid Membranes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
235. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
236. Schopfer, F. J. *et al.* Covalent peroxisome proliferator-activated receptor γ adduction by

- nitro-fatty acids: Selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J. Biol. Chem.* **285**, 12321–12333 (2010).
237. Wootan, M. G., Bass, N. M., Bernlohr, D. a & Storch, J. Fatty acid binding sites of rodent adipocyte and heart fatty acid binding proteins: characterization using fluorescent fatty acids. *Biochemistry* **29**, 9305–9311 (1990).
 238. Maher, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res. Rev.* **4**, 288–314 (2005).
 239. Lushchak, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J. Amino Acids* **2012**, 1–26 (2012).
 240. Thompson, J., Winter, N., Terwey, D., Bratt, J. & Banaszak, L. The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates. *J. Biol. Chem.* **272**, 7140–7150 (1997).
 241. Sun, Q. *et al.* Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1303–8 (2013).
 242. Li, Y., Li, X. & Dong, Z. Concerted dynamic motions of an FABP4 model and its ligands revealed by microsecond molecular dynamics simulations. *Biochemistry* **53**, 6409–6417 (2014).
 243. Rom, O., Khoo, N. K. H., Chen, Y. E. & Villacorta, L. Inflammatory signaling and metabolic regulation by nitro-fatty acids. *Nitric Oxide* **78**, 140–145 (2018).
 244. Song, M. G. *et al.* NRF2 signaling negatively regulates phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of human monocytic U937 cells into pro-inflammatory macrophages. *PLoS One* **10**, (2015).
 245. Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. & Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* (1994). doi:10.1016/0022-1759(94)90027-2
 246. Warren, M. K. & Vogel, S. N. Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons. *J. Immunol.* **134**, 982–9 (1985).
 247. Zhang, X., Goncalves, R. & Mosser, D. Isolation of alveolar, BMDM and peritoneal macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* (2008). doi:10.1002/0471142735.im1401s83.The
 248. Rice, H. M., Rossi, A. P., Bradford, M. K., Elkins, K. L. & De Pascalis, R. rM-CSF efficiently replaces L929 in generating mouse and rat bone marrow-derived macrophages for in vitro functional studies of immunity to intracellular bacteria. *J. Immunol. Methods* 112693 (2019). doi:10.1016/j.jim.2019.112693
 249. Roszer, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* **2015**, 16–18 (2015).
 250. Covarrubias, A. J. *et al.* Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *Elife* **5**, e11612 (2016).
 251. Nagy, Z. S., Czimmerer, Z., Szanto, A. & Nagy, L. Pro-inflammatory cytokines negatively regulate PPAR γ mediated gene expression in both human and murine macrophages via multiple mechanisms. *Immunobiology* **218**, 1336–1344 (2013).
 252. Minarrieta, L. Modulación de la diferenciación de macrófagos y células endríticas por nitroalquenos. (Universidad de la República, 2014).
 253. Kuziel, W. A. *et al.* Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12053–8 (1997).
 254. Schopfer, F. J., Vitturi, D. A., Jorkasky, D. K. & Freeman, B. A. Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **79**, 31–37 (2018).
 255. Chinetti, G. *et al.* PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* **7**, 53–8 (2001).
 256. Li, A. C. & Glass, C. K. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and

- the development of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **45**, 2161–73 (2004).
257. Yao, Q. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) induces the gene expression of integrin $\alpha\beta 5$ to promote macrophage M2 polarization. *J. Biol. Chem.* **293**, 16572–16582 (2018).
 258. Home, P. D. *et al.* Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet* **373**, 2125–35 (2009).
 259. Vangaveti, V. *et al.* 9- and 13-HODE regulate fatty acid binding protein-4 in human macrophages, but does not involve HODE/GPR132 axis in PPAR- γ regulation of FABP4. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **9**, 137–150 (2018).
 260. Wallner, S. *et al.* Monocyte to macrophage differentiation goes along with modulation of the plasmalogen pattern through transcriptional regulation. *PLoS One* **9**, e94102 (2014).
 261. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79–81 (1998).
 262. Jennewein, C., Von Knethen, A., Schmid, T. & Brüne, B. MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mRNA destabilization. *J. Biol. Chem.* **285**, 11846–53 (2010).
 263. Necela, B. M., Su, W. & Thompson, E. A. Toll-like receptor 4 mediates cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor γ and nuclear factor- κ B in macrophages. *Immunology* **125**, 344–58 (2008).
 264. Tan, N.-S. *et al.* Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6318–6318 (2002).
 265. Hotamisligil, G. S. & Bernlohr, D. A. Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 592–605 (2015).
 266. Floresta, G. *et al.* Adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors. A comprehensive systematic review. *Eur. J. Med. Chem.* **138**, 854–873 (2017).
 267. Bates, D. J. P., Smitherman, P. K., Townsend, A. J., King, S. B. & Morrow, C. S. Nitroalkene fatty acids mediate activation of Nrf2/ARE-dependent and PPAR γ -dependent transcription by distinct signaling pathways and with significantly different potencies. *Biochemistry* **50**, 7765–7773 (2011).
 268. Kansanen, E. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids activate Nrf2 by a Keap1 cysteine 151-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 14019–14027 (2011).
 269. Turell, L., Steglich, M. & Alvarez, B. The chemical foundations of nitroalkene fatty acid signaling through addition reactions with thiols. *Nitric Oxide* **78**, 161–169 (2018).
 270. Long, E. K. a *et al.* Fatty acids induce leukotriene C4 synthesis in macrophages in a fatty acid binding protein-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1199–207 (2013).
 271. Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M. & Michiels, C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* **15**, 577 (2015).
 272. Kasper, D. L. & Randolph Harrison, T. *Harrison's principles of internal medicine.* (Medical Pub. Division, 2005).
 273. Verescakova, H. *et al.* Nitro-oleic acid regulates growth factor-induced differentiation of bone marrow-derived macrophages Hana. *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 10–19 (2017).
 274. Marathe, C. *et al.* Preserved glucose tolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice transplanted with PPAR γ -/-, PPAR δ -/-, PPAR $\gamma\delta$ -/-, or LXR $\alpha\beta$ -/- bone marrow. *J. Lipid Res.* **50**, 214–224 (2009).
 275. Heming, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ modulates the response of macrophages to lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 276. Nieto, C. *et al.* The activin A-peroxisome proliferator-activated receptor gamma axis contributes to the transcriptome of GM-CSF-conditioned human macrophages. *Front.*

- Immunol.* **9**, 1–15 (2018).
277. Ishii, T. *et al.* Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circ. Res.* **94**, 609–616 (2004).
 278. Maruyama, A. *et al.* Nrf2 regulates the alternative first exons of CD36 in macrophages through specific antioxidant response elements. *Arch. Biochem. Biophys.* **477**, 139–145 (2008).
 279. Kim, W. *et al.* 15-Deoxy- Δ 12,14-Prostaglandin J2 Exerts Proresolving Effects Through Nuclear Factor E2-Related Factor 2-Induced Expression of CD36 and Heme Oxygenase-1. *Antioxidants Redox Signal.* **27**, 1412–1431 (2017).
 280. Villacorta, L. *et al.* Redox Biology In situ generation , metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol.* **15**, 522–531 (2018).
 281. Ambrozova, G., Martiskova, H. & Koudelka, A. Nitro-oleic acid modulates classical and regulatory activation of macrophages and their involvement in pro-fibrotic responses. *Free Radic. Biol. Med.* **90**, 252–260 (2016).
 282. Ichikawa, T. *et al.* Nitroalkenes suppress lipopolysaccharide-induced signal transducer and activator of transcription signaling in macrophages: A critical role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Endocrinology* **149**, 4086–94 (2008).
 283. Kalinauskaitė-Zukauske, V., Janulaityte, I., Januskevicius, A. & Malakauskas, K. Serum levels of epithelial-derived mediators and interleukin-4/interleukin-13 signaling after bronchial challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma. *Scand. J. Immunol.* **90**, 1–9 (2019).
 284. Zhang, Z. *et al.* Increased soluble ST2 and IL-4 serum levels are associated with disease severity in patients with membranous nephropathy. *Mol. Med. Rep.* **17**, 2778–2786 (2018).
 285. Akiyama, M. *et al.* Number of circulating follicular helper 2 T cells correlates with IgG4 and interleukin-4 levels and plasmablast numbers in IgG4-related disease. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 2476–2481 (2015).
 286. Bhattacharjee, A. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **54**, 1–16 (2013).
 287. Czimmerer, Z. *et al.* Identification of novel markers of alternative activation and potential endogenous PPAR γ ligand production mechanisms in human IL-4 stimulated differentiating macrophages. *Immunobiology* **217**, 1301–14 (2012).
 288. Rudolph, T. K. *et al.* Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–945 (2010).