



**Tesina de graduación**

**Licenciatura en Bioquímica**

**Facultad de Ciencias- Universidad de la República**

***MECANISMOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS NITROALQUENOS:***

***Regulación del Inflamasoma NLRP3***

**Germán Galliussi**

**Orientadores: Dr. Carlos Batthyány; Dr. Horacio Botti**

**Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas**

**Institut Pasteur Montevideo**

## **MECANISMOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS NITROALQUENOS:**

### ***Regulación del Inflamasoma NLRP3***

## **ÍNDICE**

### **Abreviaturas**

### **1. Resumen**

### **2. Introducción**

#### *2.1 Inflamación*

#### *2.2. Inflamasoma*

##### 2.2.1. Definición

##### 2.2.2. Descripción de los distintos inflamomas

##### 2.2.3. Componentes del inflamoma NLRP3

##### 2.2.4. Mecanismo de formación del inflamoma NLRP3

##### 2.2.5. Regulación del cebado del inflamoma NLRP3

##### 2.2.6. Regulación del inflamoma a nivel del ensamblado

##### 2.2.7. Regulación negativa del inflamoma

##### 2.2.8. Rol proinflamatorio del inflamoma

#### *2.3. Nitroalquenos*

##### 2.3.1. Definición

##### 2.3.2. Características químicas (formación, reactividad con Cys e His, adición de Michael)

##### 2.3.3. Acciones biológicas (Inhibición de vía pro-inflamatoria NF- $\kappa$ B, activación de vía antioxidante/detoxicante Nrf2-keap1, acción sobre PPAR- $\gamma$ y HSF-1)

##### 2.3.4. Nitroalquenos estudiados en nuestro laboratorio. Ácido nitro-oleico (OA-NO<sub>2</sub>), nitroalqueno-trolox-metil-éster (NATxME), nitroalqueno $\alpha$ -tocoferol (NA- $\alpha$ -TOH), beta-nitro-estireno ( $\beta$ -NO<sub>2</sub>-E).

### **2.4. Hipótesis**

### **2.5. Estrategia de la investigación**

### **2.6. Objetivos**

#### 2.6.1. Objetivo General

#### 2.6.2. Objetivos Específicos

### **3. Materiales y métodos**

- 3.1. Cultivo celular, activación con LPS/ATP y tratamiento con nitroalquenos a las células THP-1
- 3.2. Cuantificación de IL-1 $\beta$  por ELISA
- 3.3. Citotoxicidad y sobrevida celular por citometría de flujo
- 3.4. Procesamiento de datos

### **4. Resultados**

- 4.1 Ensayos con distintos nitroalquenos variando el momento de aplicación
- 4.2 Cambios en la liberación de IL-1 $\beta$  inducidos por la exposición a NATxME en conjunto con la primera señal
- 4.3 Cambios en la liberación de IL-1 $\beta$  inducidos por la exposición a NATxME en conjunto con la segunda señal

### **5. Discusión.**

### **6. Conclusiones**

### **7. Perspectivas**

### **8. Agradecimientos**

### **9. Referencias bibliográficas**

## ABREVIATURAS

<b>*NO</b>	Radical óxido nítrico
<b>*NO<sub>2</sub></b>	Radical dióxido de nitrógeno
<b>3'-UTR</b>	Región sin codificar del extremo 3'
<b>4PL</b>	Parámetro logístico 4 (sigla en inglés 4 Parameter Logistic)
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AIM2</b>	Ausente en Melanoma 2 (sigla en inglés Absent in Melanoma 2)
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza (sigla en inglés Analysis Of Variance)
<b>ARE</b>	Elemento de Respuesta Antioxidante (sigla en inglés Antioxidant Response Element)
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ASC</b>	Proteína tipo espícula asociada a apoptosis conteniendo CARD (sigla del inglés Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD)
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>ATP</b>	Adenosil Trifosfato
<b>α-TTP</b>	Proteína Transportadora de α-Tocoferol (sigla en inglés alpha-tocopherol Transfer Protein)
<b>AV<sup>+</sup> o AV<sup>-</sup></b>	Positivo o negativo para Anexina V respectivamente
<b>β-NO<sub>2</sub>-E</b>	β Nitro Estireno
<b>BRCC3</b>	Enzima Deubiquitinasa BRCC36 específica de Lisina-63
<b>cAMP</b>	Adenosil Monofosfato cíclico
<b>CARD</b>	Dominio de reclutamiento y activación de Caspasas (sigla en inglés Caspase Activation and Recruitment Domain )
<b>CD36</b>	Cluster de Diferenciación 36
<b>CD40L</b>	Ligando de CD40
<b>CLR</b>	Receptor de Lectina tipo-C (sigla en inglés C-type Lectine Receptor)
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CYLD</b>	Cilindromatosis (en inglés cylindromatosis), aquí nos referimos a la deubiquitinasa expresada del gen CYLD
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DAMP</b>	Patrones Moleculares Asociados a Daño (sigla en inglés Damage-associated Molecular Pattern)
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal del 50% de los casos totales
<b>dsADN</b>	ADN doble hebra (double strand)

<b>DUB</b>	Deubiquitinasa
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (sigla en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
<b>FIIND</b>	Dominio "Find" de NLRP1
<b>GCLC</b>	$\gamma$ -glutamylcisteína sintasa catalítica
<b>GCLM</b>	$\gamma$ -glutamylcisteína sintasa moduladora
<b>GSH</b>	Glutati3n reducido
<b>GS-LNO<sub>2</sub></b>	Aducto glutati3n-Ácido nitro Linoleico
<b>GS-OA-NO<sub>2</sub></b>	Aducto glutati3n-Ácido nitro Oleico
<b>GST</b>	Glutati3n S-transferasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Per3xido de Hidr3geno
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad (sigla en inglés High Density Lipoprotein)
<b>HIN200</b>	Proteína Nuclear Hematopoyetica inducible por interfer3n con repetido de 200 aminoácidos (sigla en inglés: Hematopoyetic Interferon-inducible Nuclear protein)
<b>His</b>	Histidina
<b>HMGB-1</b>	Proteínas de alta movilidad del grupo B1 (sigla en inglés High-Movility Group protein B1)
<b>HNO<sub>2</sub></b>	Ácido nitroso
<b>HO-1</b>	Hemooxigenasa-1
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano (sigla en inglés Horseradish Peroxidase)
<b>HSE</b>	Elemento de Choque Térmico (sigla en inglés Heat Shock Element)
<b>HSF-1</b>	Factor de Choque Térmico 1 (sigla en inglés Heat Shock Factor 1)
<b>HSP</b>	Proteína de Choque Térmico (sigla en inglés Heat Shock Proteins)
<b>HSR</b>	Respuesta al Choque Térmico (sigla en inglés Heat Shock Response)
<b>HUVEC</b>	Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (sigla en inglés Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentraci3n Inhibitoria del 50% del valor inicial
<b>IFN</b>	Interfer3n
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibidor $\kappa$ B
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B quinasa (sigla en inglés I $\kappa$ B Kinase)
<b>IL-1<math>\beta</math>, -18, -10</b>	Interleuquina 1 $\beta$ , 18 o 10 respectivamente
<b>IL-1R o -18R</b>	Receptor de Interleuquina 1 o 18 respectivamente
<b>iNOS</b>	3xido nítrico sintasa inducible (sigla en inglés inducible Nitric Oxide Synthase)
<b>IP<sup>+</sup> o IP<sup>-</sup></b>	Positivo o negativa para Ioduro de Propidio respectivamente
<b>IUPAC</b>	Uni3n Internacional de Química Pura y Aplicada (sigla en inglés International Union of Pure and Applied Chemistry)

<b>K<sup>+</sup></b>	Catión Potasio
<b>LBD</b>	Dominio de Unión a Ligando (sigla en Inglés Ligand Binding Domain)
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baja Densidad (sigla en inglés Low Density Lipoprotein)
<b>LeTx</b>	Toxina Letal causante del Ántrax
<b>LNO<sub>2</sub></b>	Ácido Linoleico
<b>LOO<sup>•</sup></b>	Radical peroxilo lipídico
<b>LPC</b>	Lisofosfatidilcolina (sigla en inglés Lysophosphatidylcholine)
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LRR</b>	Repetido Rico en Leucina (sigla en inglés Leucine Rich Repeat)
<b>MAL</b>	Adaptador tipo MyD88 (sigla en inglés MyD88 Adapter-Like)
<b>MAVS</b>	Proteína mitocondrial de señalización antiviral (sigla en inglés Mitochondrial Antiviral-Signaling protein )
<b>miARN</b>	micro ARN
<b>mi-R223</b>	micro ARN R223
<b>mLDL</b>	LDL modificada
<b>MSU</b>	Monourato de sodio (sigla en inglés Monosodium Urate)
<b>mtADN</b>	ADN mitocondrial
<b>mtROS</b>	Especies reactivas del oxígeno mitocondriales
<b>MyD88</b>	Diferenciación Mieloide de respuesta primaria del gen 88 (Del inglés: Myeloid differentiation primary response gene 88)
<b>NA</b>	Nitroalqueno
<b>NA-<math>\alpha</math>-TOH</b>	Nitroalqueno del alfa-tocoferol
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (Forma oxidada)
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (Forma reducida)
<b>NATxME</b>	Nitroalqueno del Trolox Metil Ester
<b>NEMO</b>	Modulador Esencial de NF- $\kappa$ B (sigla en inglés NF- $\kappa$ B Essential Modulator)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B (sigla en inglés Nuclear Factor $\kappa$ B )
<b>NIK</b>	Quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (sigla en inglés NF- $\kappa$ B Inducing Kinase)
<b>NLR</b>	Receptor tipo NOD (sigla en inglés NOD-like Receptor)
<b>NLRC4</b>	Proteína de la familia NLR conteniendo dominio CARD 4 (sigla en inglés NLR family CARD domain-containing protein 4)
<b>NLRP1, 3 o 6</b>	Proteína de la familia NLR conteniendo dominio PYD 1, 3 o 6 (sigla en inglés NLR family PYD domain-containing protein 1, 3 or 6)
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión Nitrito
<b>NO<sub>2</sub>-LA</b>	Ácido Nitro Linolénico

<b>NQO1</b>	NAD(P)H Quinona Deshidrogenasa
<b>Nrf2-Keap1</b>	Nuclear Factor (Erythroid-derived 2) like 2 - (Kelch-like ECH-associated protein 1)
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Oxígeno radical
<b>OA-NO<sub>2</sub></b>	Ácido Nitro Oleico
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Anión Peroxinitrito
<b>ONO-OCO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrosoperoxicarbonato
<b>ONO-OH</b>	ácido peroxinitroso
<b>oxLDL</b>	LDL oxidada
<b>P2X7R</b>	Receptor purinérgico P2X7
<b>PAMP</b>	Patrón Molecular Asociado a Patógeno (sigla en inglés Patogen-associated Molecular Pattern)
<b>PLTP</b>	Proteínas Transportadoras de Fosfolípidos (sigla en inglés Phospholipid Transfer Protein)
<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato (sigla en inglés Phorbol 12-myristate 13-acetate)
<b>PPAR</b>	Receptores activador por proliferación (sigla en inglés Peroxisome proliferator-activated receptor)
<b>proIL-1<math>\beta</math> o 18</b>	Precursor inactivo de interleuquina 1 $\beta$ o 18
<b>PRR</b>	Receptor de Reconocimiento de Patrones (sigla en inglés Pattern Recognition Receptor)
<b>PYD</b>	Dominio Pyrin (sigla en inglés Pyrin Domain)
<b>RHR</b>	Región de Homología Rel (sigla en inglés Rel Homology Region)
<b>RLR</b>	Receptor tipo RIG (sigla en inglés RIG-like Receptor)
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno (sigla en inglés Reactive Oxygen Species)
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute (Nombre del medio celular)
<b>SBF</b>	Suero Bovino Fetal
<b>SD</b>	Desviación Estándar (sigla en inglés Standard Desviation)
<b>SGT</b>	Supresor de dos alelos G de Skp1 (Del inglés: Suppressor of G-two allele of Skp1)
<b>SR</b>	Receptores Scavenger o barrenderos (sigla en inglés Scavenger Receptor)
<b>SUP</b>	Sistema Ubiquitina-Proteasoma
<b>TAP</b>	Proteína de Unión a Tocoferol (sigla en inglés Tocopherol-associated Protein)
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll (sigla en inglés Toll-like Receptor)
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral (sigla en inglés Tumor Necrosis Factor)
<b>TNFR</b>	Receptor de TNF (sigla en inglés TNF Receptor)
<b>TRIF</b>	Adaptador que induce Interferón- $\beta$ conteniendo dominio TIR (Del inglés: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )

<b>TRP</b>	Receptor Potencial Transitorio (sigla en inglés “Transient Receptor Potential”)
<b>TxME</b>	Trolox Metil Ester
<b>USP20, 2a, 21 y 4</b>	Proteasa Específica de Ubiquitina 20, 2a, 21 y 4 (sigla en inglés Ubiquitine Specific Protein)



## 1. RESUMEN

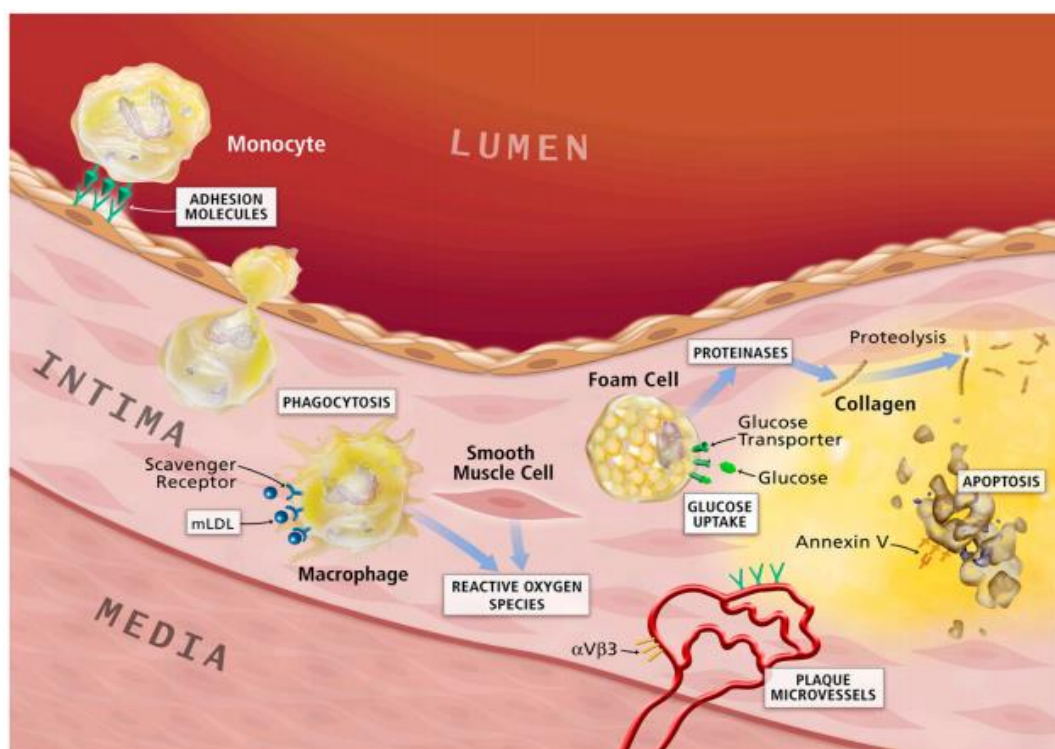
La aterosclerosis es una enfermedad crónica progresiva que se asocia y potencia con otras condiciones patológicas como la diabetes mellitus y el síndrome metabólico resultando las principales causas de morbimortalidad en el mundo occidental y en nuestro país. La aterosclerosis consiste en la formación de una placa de ateroma en la íntima arterial, la cual surge a partir de la deposición de colesterol y diversos lípidos, restos celulares y fibras musculares lisas que proliferan y migran desde la capa media hacia la íntima. Es una enfermedad inflamatoria crónica, de la que participan células inmunes, principalmente macrófagos. Estos fagocitan células necróticas o apoptóticas y endocitan de manera descontrolada LDL que se deposita y se modifica en la íntima, desencadenando una acumulación de colesterol y cristales de colesterol y una cascada de señales que derivan en un proceso inflamatorio crónico. El inflamasoma NLRP3 es un complejo multiproteico citosólico que cumpliría un rol importante en este proceso. Este se ensambla en respuesta a señales de peligro para activar Caspasa-1, una cisteína proteasa que cliva los precursores de IL-1 $\beta$  e IL-18 para dar sus formas activas, potentes citoquinas proinflamatorias. Además, se ha reportado que Caspasa-1 en su forma activa induce la muerte por piroptosis, muerte celular programada proinflamatoria. El ensamblado del inflamasoma NLRP3 es máximo cuando se produce tras dos señales secuenciales, la primera llamada cebado dependiente de NF- $\kappa$ B y la segunda llamada ensamblado, cuyo mecanismo es poco conocido. Se acepta que ambas señales pueden ser dadas por distintos patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (del inglés PAMPs/DAMPs). Nuestro grupo estudia los efectos biológicos de nitroalquenos lipídicos de segunda generación, nitroalquenos derivados de la vitamina E. Los nitroalquenos son compuestos electrofílicos que ejercen importantes efectos biológicos mediante la formación de aductos covalentes reversibles con cisteínas e histidinas de blancos moleculares clave, algunos de ellos ya identificados. Basándonos en la bioquímica de **los nitroalquenos, sus potentes efectos antiinflamatorios y la relevancia del eje inflamasoma/IL-1 $\beta$  en la inflamación, hipotetizamos que estos compuestos podrían modular la inflamación al inhibir el inflamasoma ya sea en forma directa o indirecta**. En este trabajo mostramos que el nitroalqueno del Trolox metil éster (NATxME), un nitroalqueno derivado de la vitamina E, inhibe la liberación de IL-1 $\beta$  en forma dosis dependiente con mayor potencia al aplicarlo durante el ensamblado que durante el cebado. Proponemos que este es un mecanismo general por medio del cual los nitroalquenos modulan la inflamación es mediante la inhibición del ensamblado del inflamasoma NLRP3. Este resultado contribuye a la consolidación de estos compuestos como posibles fármacos antiinflamatorios/antiaterogénicos y contra otras enfermedades inflamatorias y metainflamatorias (enfermedades inflamatorias inducidas por alteraciones metabólicas).

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Inflamación**

La inflamación es una respuesta protectora del organismo contra amenazas e involucra a células hospederas, vasos sanguíneos, proteínas y otros mediadores destinados a eliminar la causa inicial del daño celular, así como también las células y/o tejidos necróticos u apoptóticos iniciando la reparación del daño [1]. La inflamación aguda es rápidamente desencadenada cuando receptores presentes en las células de la inmunidad innata reconocen señales de peligro que se tratan de patrones moleculares asociados a patógenos o a daño tisular (“Pathogen Associated Molecular Pattern”: PAMPs y “Damage Associated Molecular Pattern”; DAMPs). A dichos receptores celulares se los conoce como receptores de reconocimiento de patrones (“Pattern Recognition Receptors”; PRRs) y los mismos pueden encontrarse situados en la membrana celular, membranas endosómicas y en el citosol [2, 3]. Entre las células inmunes, se destacan en primer lugar las residentes en los tejidos como los macrófagos, células dendríticas y mastocitos, mientras que en segundo lugar tenemos células que son reclutadas del plasma sanguíneo como los neutrófilos, basófilos, eosinófilos y linfocitos NK (“Natural Killer”, citolíticos naturales) [3]. En algunas de estas células se expresan diversos PRRs y esto induce señales celulares que promueven la respuesta inflamatoria. Los mismos se clasifican en diferentes familias: por un lado los PRRs de membrana como los receptores tipo Toll (“Toll-like Receptor”; TLR) [4], receptores de quinazas y los de lectina tipo C (“C-type Lectin Receptor”; CLR) [5]. También hay receptores citosólicos como los tipo NOD (“NOD-like Receptor”; NLR) [6] y los tipo RIG (“RIG-like Receptor”; RLR) [4]. Una característica común de todos estos receptores es que no son clonales, es decir entre diferentes células el receptor reconoce ligandos con la misma especificidad. La acción de estos receptores al reconocer señales de peligro es desencadenar señales celulares que determinarán la generación de distintas respuestas inmunes como ser procesos fagocíticos por parte de células que cumplen esta función (por ejemplo macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en menor grado), así como también la síntesis de mediadores proinflamatorios y quimioquinas [7]. Los mediadores proinflamatorios son una amplia gama de moléculas destacándose entre ellas las citoquinas y las quimioquinas, junto a otros mediadores también conocidos como la histamina, prostaglandinas, leucotrienos, entre otros [1]. Las citoquinas son unos de los mediadores más importantes y desde el punto de vista molecular son polipéptidos. Existe una amplia variedad donde cada una cumple un rol específico, pero en general son promotoras de respuestas inflamatorias. Las distintas familias de citoquinas conocidas son los factores de necrosis tumoral (TNF), la familia de interleuquina-1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6) y las citoquinas quimioatrayentes (denominadas por este motivo como quimioquinas) [1, 3].

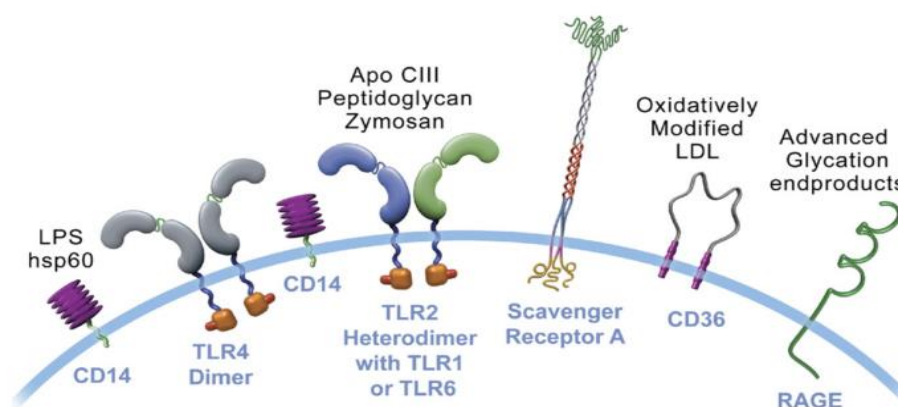
***La inflamación es una forma de defensa y de integridad de los tejidos, pero esta función se cumple correctamente si la respuesta inflamatoria es correctamente regulada. Cuando la inflamación ocurre en forma desregulada, esta respuesta que se pretende que sea protectora es capaz de desencadenar desórdenes relacionados a diversas enfermedades.*** Esto incluiría enfermedades inflamatorias crónicas con alteraciones metabólicas como la aterosclerosis [8] y la diabetes mellitus tipo 2 [9] que se asocian e interactúan en forma cada vez más frecuente en parte a través del denominado síndrome metabólico (antes llamado síndrome X) siendo en conjunto la principal causa de morbimortalidad en países de cultura occidental y en Uruguay [10-12]. Común a los procesos aterogénico, diabetogénico y al síndrome metabólico se hallaría una forma de inflamación distinta en muchos aspectos a la inflamación aguda antes descrita y a otras formas de inflamación crónica, en la que los mensajes metabólicos celulares, tisulares y sistémicos jugarían un rol esencial que ha sido denominada metainflamación [13, 14]. Además, el desarrollo del cáncer ocurre en relación con la inflamación (una relación por cierto compleja) [15]. También se destacan enfermedades inflamatorias agudas graves como ciertas infecciones virales y bacterianas que pueden conducir a la sepsis con falla orgánica [16-19] y la ateromatosis que conduce la isquemia aguda grave con infarto agudo de miocardio [20] y accidentes cerebro vasculares (“stroke”) [21]. En nuestra línea de investigación y de desarrollo de fármacos prestamos especial atención a la **aterosclerosis** [22]. La misma se trata de una enfermedad inflamatoria crónica de la pared arterial y es la principal causa de enfermedades cardiovasculares como lo son el infarto de miocardio y el “stroke”. Esta implica la formación de placas de ateroma en la íntima de las grandes y medianas arterias (arterias musculares), principalmente donde se dividen [23]. La formación de estas placas se debe principalmente a la acumulación de colesterol junto a otros lípidos y fibras musculares lisas que proliferan y migran desde la capa de músculo liso de la arteria hacia la íntima arterial [2, 24] (ver Figura 1). Durante el proceso aterogénico se hacen presentes en la pared arterial células inmunes, siendo los monocitos/macrófagos los más predominantes en etapas tempranas del proceso. Los monocitos, son reclutados a la íntima migrando a través del endotelio y una vez aquí maduran en macrófagos, existiendo en los estados iniciales de formación de las lesiones y continúan presentes en lesiones ya establecidas (ver Figura 1).



**Figura 1: Esquema del proceso aterogénico.** La LDL que circula en el plasma sanguíneo es oxidada o modificada de alguna otra forma y atraviesa el endotelio hacia la íntima. Los monocitos sanguíneos también son reclutados hacia aquí y diferenciados a macrófagos que captan por medio de los receptores Scavenger la mLDL que se acumulará intracelularmente. Esta acumulación provoca la formación de “células espumosas” que morirán liberando su contenido altamente lipídico acumulándose y formando lo que se llama el core necrótico de la placa de ateroma. A la vez, las células musculares lisas de la capa media de la arteria proliferan y migran hacia la íntima formando parte de la placa de ateroma. Imagen tomada de Libby P., 2010, *J. Nucl. Med.*

Estas células que se alojan en sitios de lesiones ateroscleróticas son pro inflamatorias y propagan la respuesta inmune innata como consecuencia de la expresión de altos niveles de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores [2].

Existen evidencias que involucran especialmente a ciertos PRRs y otros tipos de receptores en el proceso aterogénico, como el Toll-like Receptor 4 (TLR-4) con la cooperación de CD14 que reconocen lipopolisacáridos (LPS) y una variedad de patrones instigadores de inflamación y aterosclerosis (por ej. “Heat Shock Proteins”) [2]. El receptor TLR-2 también está involucrado y reconoce productos microbianos. Dentro de los llamados receptores barrenderos (“Scavenger Receptor”, SR) tenemos el SR tipo A que reconoce LDL modificada y CD36 que une LDL oxidada [2] (Figura 2).



**Figura 2. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y otros involucrados en aterosclerosis.** Por un lado tenemos el TLR4 con CD14 como colaborador que se caracteriza por reconocer lipopolisacáridos (LPS) característico de agentes infecciosos y también reconoce heat shock proteins (hsp) que están involucradas en aterosclerosis. También tenemos TLR2 que existe como heterodímero con TLR1 o TLR6 y reconoce productos microbianos (ej.: zymosan, peptidoglicanos) y la apolipoproteína Apo CIII. Los Scavenger receptors A reconocen LDL modificada y CD36 reconoce LDL oxidada. Por último tenemos el receptor RAGE. Imagen y pie de figura tomados de Libby P., 2009, *J. Am. Coll. Cardiol.*

Por otra parte, existirían múltiples agentes que pueden inducir potencialmente la respuesta inflamatoria e inmune en la aterosclerosis, entre los que destacamos: LDL modificada (Ej.: LDL oxidada), necrosis y muerte celular regulada no apoptótica y los cristales de colesterol [25].

**Algunos autores consideran que la LDL oxidada (oxLDL) o LDL modificada (mLDL) podría ser una de las principales causantes de inducción de la inflamación en lesiones ateroscleróticas [23, 26, 27].** La LDL nativa se une a matrices ricas en proteoglicanos de la íntima arterial en sitios de lesión endotelial, lo que permite la retención y la adicional oxidación (oxLDL) y/o modificación de estas partículas (mLDL). La oxLDL/mLDL es inmunogénica y activa células endoteliales, monocitos/macrófagos y células T, llevando a que altas concentraciones puedan ser tóxicas provocando muerte celular en las lesiones [24]. La LDL puede modificarse en condiciones de hiperlipidemia y cuando es retenida en la pared vascular donde hay presente una variedad de mecanismos enzimáticos oxidativos como las lipooxigenasas, mieloperoxidasa y hemoglobina con actividad peroxidasa, así como también mecanismos oxidativos no enzimáticos [28, 29]. La fosfolipasa A2 es una de las enzimas modificadoras de LDL y se expresa en arterias normales y ateroscleróticas. Los efectos proinflamatorios de la oxLDL/mLDL son provocados por los fosfolípidos inflamatorios presentes en ella donde uno de los principales participantes en lesiones ateroscleróticas es la lisofosfatidilcolina (LPC) [24, 30]. Otros mecanismos por los cuales la oxLDL/mLDL estimula inflamación son por su interacción con los “Toll-like Receptors” (TLRs) y los receptores barrenderos (del inglés “Scavenger Receptors”). Los SR en macrófagos se caracterizan por unir e internalizar LDL modificada pero no LDL nativa en un mecanismo no regulado a la baja por la concentración intracelular de colesterol (en clara contraposición al

mecanismo de internalización de la LDL nativa por medio del receptor de LDL), participando CD36 y SR-A que tienen alta afinidad por mLDL [27]. Estos hacen que el macrófago capte e internalice oxLDL/mLDL de manera no regulada, provocando acumulación intracelular de LDL y colesterol en el macrófago formando así las llamadas “células espumosas”, las cuales están mayormente involucradas en la deposición de lípidos en la pared arterial y son causantes de inflamación (ver Figura 1). En el caso de la LDL nativa, ella es reconocida por otros receptores y su internalización está regulada a la baja por la concentración intracelular de colesterol, mecanismo que evita la formación de “células espumosas”. Es importante destacar que las células de mamíferos carecen de enzimas capaces de degradar colesterol, y dado que este es un importante regulador de la fluidez de la membrana, su concentración intracelular es uno de los procesos más controlados en la homeostasis celular. Se ha mostrado que CD36 y SR-A son responsables del 75 a 90% de la captación de estas lipoproteínas y que TLR4 es mediador de la diferenciación del macrófago a “célula espumosa” inducida por oxLDL, como también lo es CD36 [26-28, 31]. Además del rol directo de la LDL modificada/oxidada como estímulo inflamatorio, el colesterol acumulado en las células espumosas, estrías grasas y placas avanzadas alcanza concentraciones de sobresaturación que determinan la aparición de cristales de colesterol que *per se* es reconocido como una señal de peligro [32].

***El reconocimiento de señales de peligro por los TLR y otros sensores desencadena múltiples efectos en células inflamatorias y no inflamatorias, desatacándose el rol sobre los inflamasomas y su regulación en el proceso aterogénico.*** Como se mencionó anteriormente, en los estados iniciales de las lesiones ateroscleróticas ocurre acumulación de lípidos, lipoproteínas y células inmunes, donde estas últimas son las principales responsables de generar los mediadores que promueven inflamación. ***La IL-1 $\beta$  ha sido sugerida como la principal citoquina que participa en aspectos inflamatorios de la aterogénesis, donde su secreción depende principalmente de la activación de Caspasa-1 por parte del inflamasoma NLRP3, NLRP1, NLRC4 y AIM2 [33].*** La IL-1 $\beta$  así como también IL-1 $\alpha$  han sido encontradas a altas concentraciones en placas de ateroma y pueden ser liberadas en este contexto principalmente por células endoteliales (solo IL-1 $\alpha$ ) y macrófagos (ambas) [34]. ***El inflamasoma NLRP3 estaría mayormente involucrado en el proceso aterogénico siendo que es activado directamente por cristales de colesterol fagocitados por macrófagos o formados dentro de macrófagos durante la aterogénesis [25], contribuyendo así a la producción de IL-1 $\beta$  y a la inflamación en los sitios de lesión.***

**La muerte celular es un acontecimiento clave en la inflamación y en la aterosclerosis.** Es un proceso reversible hasta que traspasa una fase de “punto sin retorno”. Una célula era previamente considerada muerta cuando presenta criterios moleculares como la pérdida de la integridad de membrana, fragmentación de la célula incluyendo su núcleo dentro cuerpos discretos y/o la

célula moribunda es ingerida *in vivo* por una célula adyacente [35]. Sin embargo, actualmente se prefieren los criterios bioquímicos y físicos, de los cuales el más aceptado es la pérdida de la función de la membrana celular [36]. En sus recomendaciones de 2009, el Comité de Nomenclatura para la Muerte Celular reconocía la existencia de varias formas de muerte celular como la **apoptosis**, **necrosis** y muerte por **autofagia**, además de otras modalidades de muerte donde destacamos entre ellas la **piroptosis** [35]. Las recomendaciones actuales no apoyan sin embargo la existencia de una subrutina de muerte llamada piroptosis [36], algo que deberá aclararse en los próximos tiempos.

La apoptosis consiste en una muerte celular programada donde ocurren cambios morfológicos como reducción del volumen celular, fragmentación nuclear, modificación de organelos pero en este proceso la integridad de la membrana se mantiene hasta el final. La apoptosis se subclasifica en apoptosis “extrínseca” cuando es inducida por señales de estrés exteriores censadas por receptores, o bien apoptosis “intrínseca” cuando se induce por estrés intracelular [36].

La necrosis fue considerada originalmente como un proceso accidental (no regulado) pero hoy se acepta la existencia de un subgrupo de muertes necróticas reguladas, inducidas por señales que disparan programas genéticamente establecidos (necrosis regulada o necroptosis) [36]. En este sentido, la opinión de algunos investigadores es relevante en el campo, no existiendo evidencias suficientes para considerar a la piroptosis como una forma de muerte celular distinta de la necrosis regulada [37]. Para estos autores la mal llamada piroptosis sería una necroptosis con algunos rasgos característicos de apoptosis dependiendo del grado de activación de Caspasa-7 [38]. A diferencia de la apoptosis, la pérdida de funciones de la membrana y su ruptura ocurren de manera temprana liberando el contenido intracelular al medio circundante [39].

**El rol de la muerte celular como causa de inflamación en la aterosclerosis depende del estadio de la enfermedad.** Existen dos tipos de muerte celular en la neoíntima arterial de lesiones ateroscleróticas: la muerte apoptótica y la necrótica. Si ocurre muerte necrótica es probable que ocurra con liberación primaria o secundaria de IL-1 $\beta$  [24, 40]. Al ocurrir necrosis son liberados factores endógenos que son reconocidos como DAMPs que incluyen grupos de proteínas de alta movilidad B1 (“High Mobility Group B1”; HMGB-1), ADN doble hebra, “amyloid- $\beta$ -peptide” y “Heat-shock proteins” (HSP), junto con alta cantidad de contenido lipídico, incluyendo posiblemente cristales de colesterol, cuando se trata de células espumosas [24].

## **2.2. Inflamasoma**

### **2.2.1. Definición**

**El inflamasoma es un complejo multiproteico citosólico el cual sirve como plataforma de activación de Caspasas, principalmente Caspasa-1, en respuesta a señales de peligro exógenas y endógenas promoviendo principalmente liberación de IL-1 $\beta$  y muerte celular regulada [41, 42].** El inflamasoma fue descubierto por Tschopp usando células THP-1 como modelo, las cuales consisten en una línea de monocitos humanos de un paciente con leucemia, reportándose que el responsable de la activación de Caspasa-1 y el procesamiento de IL-1 $\beta$  es el inflamasoma [42]. Caspasa-1 es una cisteína proteasa que digiere en el extremo amino terminal de residuos de aspartilos y procesa pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 a IL-1 $\beta$  e IL-18 maduras, siendo estas citoquinas potentes desencadenantes de respuestas inflamatorias [43, 44].

Las células de origen mieloide expresan PRRs, tales como TLRs y receptores citosólicos denominados "Nucleotide-binding Oligomerization Domain" (NOD) "Like-Receptors" (del inglés, NLRs). Estos últimos se encargan de reconocer y responder a amenazas en compartimientos intracelulares y algunos de ellos son capaces de oligomerizarse *in vivo* para iniciar el ensamblado de inflamasomas. La estructura proteica consiste por un lado en un dominio central "NACHT" (dominio de unión a nucleótidos) común en todos los NLRs con funciones autorregulatorias, un dominio sensor LRR (del inglés "Leucine-Rich Repeat") carboxilo terminal cuya presencia es variable y consiste en repetidos de leucina. En el extremo N-terminal pueden tener un dominio efector pyrin (del inglés PYD) o de reclutamiento de Caspasa (del inglés CARD) dependiendo del NLR [41, 45]. De los veintidós miembros de NLRs humanos se conocen solo tres que son capaces de ensamblarse para formar inflamasomas, siendo ellos NLRP1, NLRP3 y NLRC4, además de otra proteína AIM2 (del inglés "absent in melanoma 2") que contiene un dominio capaz de unir ADN doble hebra llamado HIN200 (del inglés "Hematopoyetic Interferon-inducible Nuclear protein 200") y por otro lado el dominio PYD [45].

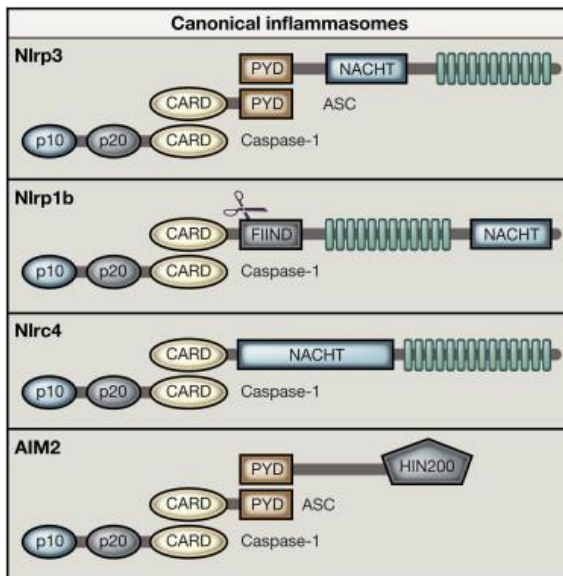
En un contexto inflamatorio los receptores de las células de la inmunidad innata, en mayor medida los macrófagos, reconocen señales de peligro que llevan a una respuesta inflamatoria que implica la producción de citoquinas proinflamatorias desencadenando una serie de mecanismos protectores encargados de la eliminación del peligro y la integridad de los tejidos. El inflamasoma se ensambla cuando se detecta una señal de peligro y así activa Caspasa-1 para la producción de IL-1 $\beta$  y IL-18 pro-inflamatorias [41, 42] y muerte celular regulada [41, 46].



### 2.2.2. Descripción de los distintos inflamasomas

Se conocen distintos tipos de inflamasomas de acuerdo al NLR o ALR (“AIM2 like receptor”) involucrado, siendo los más conocidos y estudiados los inflamasomas NLRP1b, NLRP3, NLRC4 y AIM2. Una característica común de estos inflamasomas nombrados es que todos activan Caspasa-1 (previamente conocida como enzima convertidora de Interleuquina 1, del inglés "ICE"), además que también existen otros como por ejemplo el inflamasoma pyrin (producto del gen MEFV/MEF, “Mediterranean fever”), NLRP6 y el IFI16 [41, 47].

El **inflamasoma NLRP1b** presente en ratones se compone por el NLR que lleva su nombre y este recluta directamente a Caspasa-1. NLRP1b contiene el dominio conservado NATCH y el variable LRR, pero además en el N-terminal está el dominio CARD el cual interacciona directamente con procaspasa-1 que también posee un dominio de este tipo, interactuando entonces a través de una interacción homotípica. Además, posee un dominio FIIND que es sujeto a clivaje autoproteolítico. El ensamblado consiste en la interacción CARD-CARD de NLRP1b y Procaspasa-1 (Ver figura 3) sin la necesidad del adaptador ASC (del inglés "Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD") para el ensamblado de este inflamasoma, siendo dispensable para la secreción de IL-1 $\beta$  y piroptosis [48].



**Figura 3. Composición de los distintos inflamasomas.** Se observa la composición de los inflamasomas canónicos que son los que activan Caspasa-1, donde tenemos a NLRP3, NLRP1b y NLRC4 que se forman a partir de NLRs y AIM2 formado a partir de la proteína que lleva ese nombre. Imagen obtenida de Lamkanfi M., 2014, Cell.

Se ha estudiado en ratones que NLRP1b responde a la toxina letal de la bacteria causante del ántrax *Bacillus anthracis* (LeTx), siendo el mediador primario de la “piroptosis” ante la respuesta a esta toxina [41, 47, 49]. En humanos sin embargo simplemente el inflamasoma es NLRP1 y la gran diferencia es que la estructura del NLR posee dominio PYD amino terminal, siendo capaz de reclutar al adaptador ASC y este luego a procaspasa-1 por medio de CARD [41].

El **inflamasoma NLRC4** es similar a NLRP1b debido a que este posee un motivo CARD en el extremo N-terminal el cual se une directamente a Procaspasa-1 (Ver figura 3). A diferencia de NLRP1b carece de dominio FIIND proteolítico. Este inflamasoma se caracteriza por responder ante la presencia de flagelinas (proteínas presentes en flagelos y maquinaria de locomoción de muchas bacterias) y proteínas del sistema de secreción en bacterias, lo que hace que *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomona aureginosa*, *Burkholderia thailandensis* y *Legionella pneumophila* provoquen respuesta inflamatoria mediada por este inflamasoma [50]. Trabajos han probado que existe relación entre la liberación de IL-1 $\beta$  y activación de Caspasa-1 donde intervienen los inflasomas NLRC4 y NLRP3 mediada por ASC en un contexto de infección con *Salmonella Typhimurium*, aparte de los mecanismos independientes que cada inflamasoma hace para liberar IL-1 $\beta$  [41, 47, 51].

El **inflamasoma AIM2** es ensamblado a partir de la proteína AIM2 (“Absent in Melanoma 2”) cuya estructura consiste en un dominio PYD N-terminal y un dominio HIN200 C-terminal que detecta y une ADN doble hebra (dsDNA) de patógenos intracelulares y también endógeno (humano o de ratón). Debido a la capacidad de HIN200 es que este inflamasoma canónico cumple un rol importante en el reconocimiento de dsDNA de patógenos bacterianos y virales como el de *Francisella tularensis*, vaccinia virus, cytomegalovirus y acción parcial en la respuesta a *Listeria monocytogenes* [52]. A diferencia de los inflasomas NLRP1b y NLRC4, este se ensambla de distinta manera para reclutar y activar Caspasa-1, donde por medio de PYD recluta a ASC y este a su vez por medio de CARD recluta a Procaspasa-1 (ver figura 3), la cual será activada para procesar IL-1 $\beta$  e IL-18 y la consecuente liberación de estas.

El **inflamasoma NLRP3** es en el que este trabajo ha sido enfocado debido a que se sabe que responde directamente o participa de respuestas a una amplia gama de señales de peligro bacterianas (la más estudiada, los distintos LPSs), virales, fúngicas, cristales, toxinas formadoras de poros así como también a DAMPs como por ejemplo ATP extracelular, cardiolipina citosólica, la oxLDL y cristales de colesterol [25, 31, 41, 47]. Estos últimos son importantes protagonistas en la aterogénesis y por lo tanto el inflamasoma NLRP3 tendría un importante rol en procesos inflamatorios relacionados. A continuación se profundizará en los aspectos estructurales, mecanísticos y regulatorios sobre este inflamasoma, solo mencionaremos aquí que a diferencia de NLRP1b y NLRC4 y en común con AIM2 tiene un PYD N-terminal, el cual recluta ASC por interacciones homotípicas PYD-PYD. De este modo, NLRP3 y AIM2 son inflasomas dependientes de ASC (ver Figura 3) [41, 47].

### **2.2.3. Componentes del inflamasoma NLRP3**

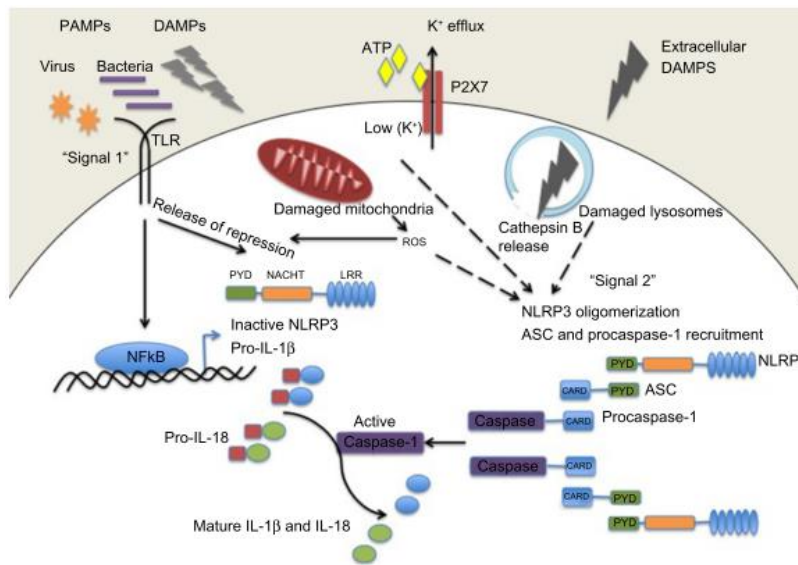
El inflamasoma NLRP3 como se muestra en la Figura 3 está formado por tres componentes proteicos principales, NLRP3 (sinónimos: NALP3, Cryopyrin",

FCAS, FCU, MWS, PYPAF1) el adaptador ASC (sinónimos: pycard, CARD5, TMS-1) y procaspasa-1 (sinónimos: ICE, "interleukin-1 $\beta$  convertase). En cuanto a **NLRP3** su estructura está determinada por un dominio central NATCH, un dominio C-terminal LRR y un dominio PYD. Este último mediante interacción PYD-PYD recluta a la molécula adaptadora **ASC** la cual se compone de dos dominios: PYD N-terminal y CARD C-terminal. Esta proteína permite el reclutamiento de procaspasa-1 y funciona como una plataforma activadora, convirtiendo a procaspasa-1 en Caspasa-1 activa por autoproteólisis, siendo capaz de procesar IL-1 $\beta$  e IL-18. ASC recluta moléculas de procaspasa mediante el dominio efector CARD por interacción CARD-CARD y oligomeriza gracias al dominio PYD, provocando esto la activación de Caspasa-1 [53-55]. **Caspasa-1** es una cisteína proteasa que es expresada como un zimógeno denominado procaspasa-1 que carece de actividad proteolítica. La estructura de procaspasa-1 consiste en un dominio CARD que interacciona con el adaptador ASC y dos subunidades p10 y p20 (10 y 20 kDa respectivamente). Se propone que la procaspasa-1 se activa por proximidad en el inflamasoma para catalizar la conversión autocatalítica de procaspasa-1 a Caspasa-1, la cual compuesta por el heterodímero entre las subunidades p10 y p20 es activa. La oligomerización de ASC es necesaria para dicha activación por proximidad de procaspasa-1. En lo que respecta a Caspasa-1 como enzima, su actividad consiste en clivar al precursor de IL-1 $\beta$  (proIL-1 $\beta$ ) de 31 kDa a la forma madura IL-1 $\beta$  de 17.5 kDa, consistiendo su sitio catalítico en un residuo de cisteína (Cys 285) y uno de histidina (His 237). Este sitio tiene un requerimiento estricto por el aminoácido Asp (D) con preferencia a clivar secuencias de YVAD-|- [43] (Uniprot código: P29466). Caspasa-1 es capaz de clivar también al precursor de IL-18 y está involucrada en procesos de muerte celular piroptótica. Si bien proIL-1 $\beta$  y proIL-18 son los principales sustratos de Caspasa-1, han sido reportados otros sustratos proteicos que son clivados por esta proteasa. Procaspasa-7, la forma inactiva de Caspasa-7 (cisteína proteasa efectora involucrada en la muerte por apoptosis) es sustrato de Caspasa-1 y además es clivada en su sitio de activación canónico (residuos de Asp23 y Asp198), permitiendo así su activación [56]. La proteína "Myd88 adapter-like" (MAL), se trata de un adaptador en la cascada de señalización de TLR-2/TLR-4 y es también sustrato de Caspasa-1, el cual es clivado y el producto de la proteólisis de MAL estaría involucrado en la activación de la vía NF- $\kappa$ B [57].

#### **2.2.4. Mecanismo de formación del inflamasoma NLRP3**

Si es ensamblado el inflamasoma NLRP3 es capaz de activar Caspasa-1 y liberar las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-18. Este proceso tiene asociado todo un mecanismo previo desde que se detecta la señal de peligro hasta la liberación de las interleuquinas. Un esquema sencillo actualmente aceptado de mecanismo de ensamblado propone que dos procesos son necesarios en macrófagos: el **cebado** y la **activación del inflamasoma NLRP3** [41, 47, 58]. En primer lugar, para que el inflamasoma se ensamble debe ocurrir la **primera señal responsable de**

**gatillar el cebado**, el que consiste en parte en la estimulación a nivel transcripcional de la expresión de NLRP3 y proIL-1 $\beta$ , debido a que ambas en condiciones normales no se expresan constitutivamente y su concentración en el citosol es baja. El señalamiento para el cebado puede ser desencadenado por diversos ligandos dentro de los PAMPs o DAMPs que pueden ser reconocidos por receptores TLRs o NLRs, así como también pueden ser citoquinas reconocidas por receptores IL-1R1, TNFR1 y TNFR2 [41, 47, 59]. Estos receptores al reconocer su ligando activan la vía de señalización de NF- $\kappa$ B que induce la transcripción de NLRP3 y proIL-1 $\beta$ , no siendo así con los componentes ASC, procaspasa-1 ni proIL-18, todos los cuales se expresarían constitutivamente [59] (figura 4).



**Figura 4. Mecanismo de ensamblado del inflamasoma NLRP3.** En primer lugar para que el inflamasoma sea ensamblado debe ocurrir una primera señal o cebado dada por los receptores TLRs, NLRs o de citoquinas (TNFR o IL-1R), los cuales reconocen señales de peligro (PAMPs o DAMPs) y estimulan la vía de señalización NF- $\kappa$ B para dar paso al cebado transcripcional que induce la expresión génica de NLRP3 y proIL-1 $\beta$ . Luego cuando NLRP3 se encuentra libre e inactivo en el citosol, necesita una segunda señal que permita el ensamblado de NLRP3 reclutando ASC y procaspasa-1, la cual se activa a Caspasa-1 y procesa proIL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  madura (lo mismo con la IL-18) que luego es secretada. Imagen tomada de Ozaki E., 2015, *J. Inflamm. Res.*

También se ha demostrado la presencia de un **cebado no transcripcional** donde aparentemente luego del cebado transcripcional ocurrirían eventos no dependientes de la segunda señal pero sí de la primera, los cuales preparan a las proteínas expresadas y/o moléculas necesarias para el posterior paso de ensamblado del inflamasoma [60]. **Se ha propuesto que la acción de enzimas deubiquitinadas (DUBs) forman parte de esta fase del mecanismo de cebado no transcripcional** [60]. Aparentemente, las moléculas de NLRP3 permanecen inhibidas en el citosol por ubiquitinación a nivel del dominio LRR. La ubiquitinación impediría la oligomerización de NLRP3 necesaria para el ensamblado del inflamasoma [61] y por eso sería necesaria su deubiquitinación, lo que es llevado

a cabo según un reporte por la enzima deubiquitinasa BRCC3 y posiblemente otras que aún no se conocen [61-63]. Alternativamente, se había propuesto con anterioridad que existen dos proteínas chaperonas que estabilizan al NLRP3 libre en el citosol, manteniéndolo inactivo mientras no ocurre la segunda señal. Estas proteínas son "heat shock protein" 90 (HSP90) y su co-chaperona SGT1 que se asocian al dominio NATCH y LRR [41, 64]. Cuando ocurre la segunda señal estas proteínas se disociarían de NLRP3 y lo desestabilizarían, dejándolo activo para interactuar con el resto de componentes del inflamasoma [64]. Por otra parte, también se ha descrito que en condiciones basales ASC posee una localización subcelular nuclear y que como respuesta a la primera señal este adaptador dejaría el núcleo y se haría disponible en el citosol perinuclear [65]. Claramente, se necesita más investigación original independiente de los mecanismos moleculares implicados en el cebado no transcripcional.

Para que el inflamasoma pueda ensamblarse a plenitud después del cebado transcripcional y no transcripcional, se necesita de una **segunda señal activadora**. Dicha señal permitirá el ensamblado/activación de NLRP3 y la consecuente oligomerización reclutando a ASC y luego procaspasa-1 para ser activada. Los activadores pueden ser moléculas exógenas o endógenas tales como adenosin-trifosfato (ATP), toxinas formadoras de poros como la nigericina y cristales capaces de producir daño fagolisosomal [66]. Cristales como alúmina, sílica, asbestos, monourato de sodio y colesterol actúan como segunda señal y activan al inflamasoma NLRP3 [25]. El mecanismo a nivel de la activación aún es muy discutido y se presentan varios causantes como ser: eflujo de K<sup>+</sup> que causa bajos niveles de K<sup>+</sup> intracelular [67-69], translocación de NLRP3 a la mitocondria mediante el adaptador MAVS [70], producción de especies reactivas del oxígeno provenientes de la mitocondria (ROS) [71], liberación de ADN mitocondrial o cardiolipina y liberación de catepsinas lisosomales provocada por el daño lisosomal [66] (ver figura 4).

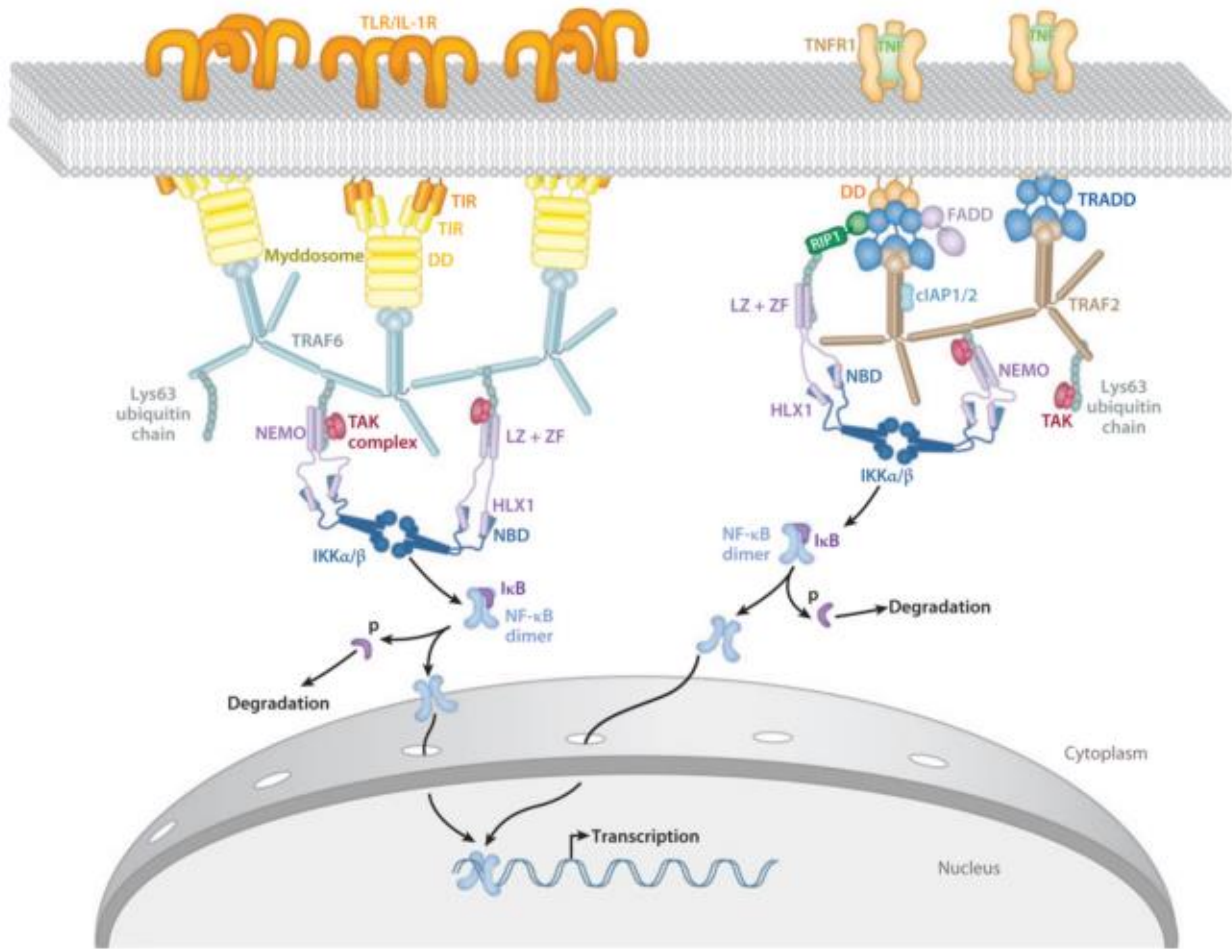
### **2.2.5. Regulación del cebado del inflamasoma NLRP3**

Como ya se ha mencionado, los niveles de proteína NLRP3 libre en el citosol son relativamente bajos para ensamblar y activar el inflamasoma. *El cebado (cebado) de macrófagos con ligandos de TLRs o de otros PRRs inducen la sobreexpresión de NLRP3 y proIL-1 $\beta$  mediante la activación de NF- $\kappa$ B [72].*

#### **NF- $\kappa$ B**

En el cebado transcripcional una de las principales vías de señalización que participa es la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B [59]. También hay una vía no canónica y una alternativa por la cual NF- $\kappa$ B puede ser activado [73]. Esta vía debe su nombre a NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), el cual se trata de una proteína dimérica que es un factor de transcripción regulador de genes clave en procesos inmunes. Este factor de transcripción es activado como consecuencia de una variedad de señales como citoquinas, así como también PAMPs y DAMPs por

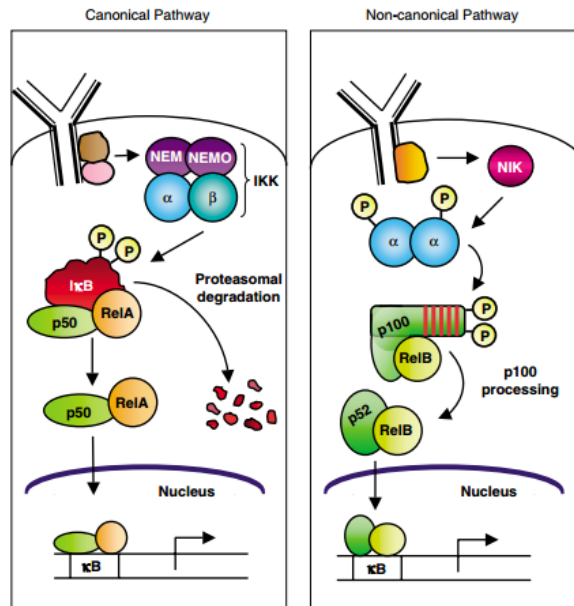
medio de receptores de citoquinas o TLRs, respectivamente [74]. En particular NF- $\kappa$ B es una familia de proteínas destacándose entre ellas p65, p50 y p52, las cuales todas comparten un dominio conservado de unión al ADN y un dominio de dimerización llamado RHR (del inglés "Rel Homology Region"). Este factor de transcripción además se encuentra secuestrado en el citosol por proteínas inhibitorias I $\kappa$ B en condiciones basales, destacándose en la familia de las I $\kappa$ Bs a I $\kappa$ B $\alpha$  (primera en descubrirse), I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  [74]. En condiciones normales, I $\kappa$ B mantiene secuestrado a NF- $\kappa$ B pero en condiciones de estrés son disociados permitiendo que el factor de transcripción ejerza su acción. El mecanismo canónico por el cual ocurre la disociación es por medio del complejo IKK, que se compone de tres subunidades IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  y otra unidad regulatoria y estructural denominada NEMO (del inglés "NF-kappa-B Essential Modulator"). En conjunto, este complejo tiene actividad quinasa y es responsable de la fosforilación de dos serinas de I $\kappa$ B, dejando a esta proteína inhibidora como blanco de degradación proteosomal, permitiendo la liberación de NF- $\kappa$ B y por ende su translocación al núcleo para unirse al ADN [74, 75] (figura 5).



**Figura 5. Vía de señalización de NF-κB.** Los receptores TLR o los IL-1R al reconocer una señal de peligro promueven la ubiquitinación del dominio regulador NEMO del complejo IKK. Dicha ubiquitinación activa IKK y fosforila a IκB que se encuentra inhibiendo a NF-κB en el citosol, lo que deja que se ubiquitine IκB disociándose para ser degradado en el proteasoma. Mientras tanto NF-κB se transloca al núcleo y se une al ADN para potenciar la expresión de diversas proteínas proinflamatorias y asociadas a respuestas inmunes. Imagen tomada de *Napetsching J., 2013, An. Rev. Biophys.*

La ubiquitinación es una forma de regulación de esta vía, siendo importante en la activación de NF-κB porque actúa a nivel del complejo IKK. Este complejo de actividad quinasa para ser activado debe ser ubiquitinado de alguna forma y se ha propuesto que dicha modificación ocurra a nivel de la subunidad reguladora NEMO, debido a que tiene dos dominios de unión de ubiquitina, aunque todavía no están bien definidos los blancos [75]. Como se conoce, la ubiquitinación es un proceso reversible por la acción de enzimas removedoras de ubiquitina llamadas deubiquitininas (DUBs) y en esta vía se conocen algunas que regulan negativamente la activación de NF-κB como la A20 que ha sido la mejor estudiada. A20 inhibe IKK por deubiquitinación de K63 y promueve la ubiquitinación en K48 y subsecuente degradación proteosomal dejando sin efecto la actividad del complejo quinasa. Se conocen otras DUBs como CYLD que también inhibe IKK,

así como también USP20, USP2a, USP21 y USP4 que reprimen la activación de NF- $\kappa$ B [75, 76]. Por otro lado, la vía no canónica, a diferencia de la anterior, es que la señalización permite activar una quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (del inglés "NF- $\kappa$ B-inducing Kinase"; NIK), la cual fosforila y activa el complejo IKK $\alpha$  y a través de la fosforilación de dos serinas de p100, provocando su proteólisis limitada a nivel del proteasoma e inducida por ubiquitinación, así como la consecuente generación de p52 que se transloca en forma activa hacia el núcleo (Figura 6 derecha) [73].



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de señalización de NF- $\kappa$ B por medio de la vía canónica (Izquierda) y no canónica (Derecha). Imagen tomada de Gilmore T.D., 2006, *Oncogene*.

Por todo lo mencionado, la activación de **NF- $\kappa$ B es esencial para el cebado transcripcional, el cual es necesario en condiciones habituales en macrófagos para el ensamblado del inflamasoma NLRP3.**

**Otras formas de regulación del cebado del inflamasoma NLRP3**

A nivel postranscripcional, se han identificado ciertos **micro ARNs (miARNs)** como reguladores del cebado del inflamasoma NLRP3, los cuales regulan negativamente la expresión de genes involucrados en inflamación y respuesta inmune. El miR-223, un miARN específico de células mieloides, se une a la región 3'-UTR del ARN mensajero de NLRP3, impidiendo de esta manera que esta proteína se exprese [77, 78].

El ya mencionado cebado no transcripcional en respuesta a la primera señal mediante TLR4-MyD88 licencia el ensamblado a partir de NLRP3 que ha sido



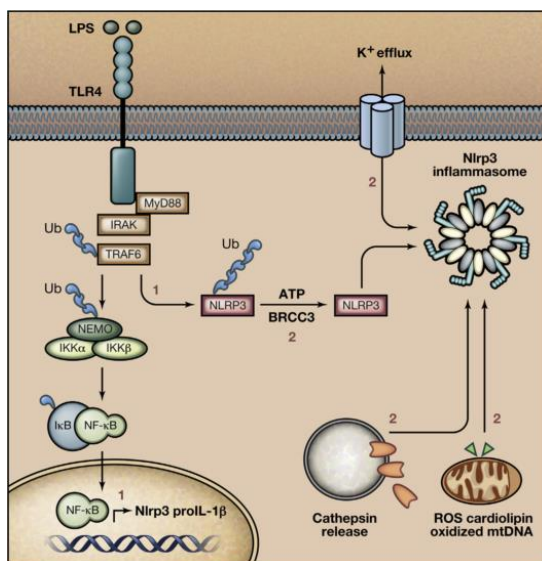
expresado a nivel basal o como causa del cebado transcripcional, pero debe notarse que es independiente de este último [60]. En este mecanismo existiría un importante mecanismo regulatorio a través de la modulación de la **ubiquitinación y acción de DUBs**, regulando en forma negativa y positiva respectivamente. La ubiquitinación de NLRP3 en lisinas del dominio LRR mantendría inactiva a esta proteína en el citosol que puede luego ser sujeta a degradación proteosómica, pero la segunda señal rápidamente induciría la deubiquitinación de NLRP3, lo que sugiere que este proceso mediante la actividad de DUBs es necesario para el ensamblado del inflamasoma NLRP3 [62, 63], habiéndose identificado a la deubiquitinasa BRCC3 en la deubiquitinación directa del dominio LRR de NLRP3 como ya se mencionó [61].

### 2.2.6. Regulación del inflamasoma a nivel del ensamblado

Una vez que la expresión de NLRP3 es inducida en forma transcripcional, desbloqueada a nivel postranscripcional y su vida media incrementada posiblemente por regulación postraduccional, debe ocurrir un segundo estímulo que permita su oligomerización y el ensamblaje con oligómeros de ASC para luego activar procaspasa-1.

Se han estudiado mejor cinco estímulos activadores de NLRP3: 1) Eflujo de K<sup>+</sup>; 2) producción de ROS mitocondrial, 3) ADN mitocondrial y cardiolipinas, 4) relocalización yuxtamitocondrial y 5) daño lisosomal con liberación de catepsinas [41, 72] (Ver figura 7).

Algo importante a destacar es que estas vías de señalización que promueven el ensamblado del inflamasoma se relacionarían entre sí debido a que el eflujo de K<sup>+</sup> y el daño lisosomal provocan un aumento en la producción de ROS [72].



**Figura 7. Regulación positiva del inflamasoma.** Se observan las distintas formas de regulación a nivel de la primera señal (indicado con 1) y de la segunda (indicado con 2).

Por un lado sobre la primera señal tenemos el cebado transcripcional mediado por NF-κB que promueve la expresión de proIL-1β y NLRP3, y por otro, el cebado no transcripcional que activa NLRP3 citosólico que posteriormente será activado por la acción de DUBs como BRCC3.

A nivel de la segunda señal se observan los principales mediadores y reguladores positivos de la activación, donde tenemos el eflujo de K<sup>+</sup>, la liberación de catepsinas producto del daño lisosomal y los mediadores mitocondriales como ROS, mtADN y cardiolipina productos de la disfunción de la mitocondria. Imagen tomada de Lamkanfi M., 2014, Cell.

### Eflujo de K<sup>+</sup>

**Múltiples líneas de evidencia soportan la hipótesis de que la homeostasis de potasio está involucrada en el gatillado del ensamblaje del inflamasoma NLRP3.** La baja concentración de K<sup>+</sup> intracelular sería una condición necesaria y suficiente para que se active el inflamasoma NLRP3 y además podría ser el desencadenante común de activación por diversos compuestos que sirven como segunda señal [67, 68]. En cuanto al mecanismo y base molecular del eflujo de potasio sobre la activación es aún un enigma que podría estar resolviéndose [69]. En particular el ATP extracelular es uno de los activadores del inflamasoma conocido que actúa induciendo al receptor purinérgico P2X7R que provoca la apertura de canales catiónicos permitiendo así el eflujo del potasio intracelular [79], aunque se ha reportado que la activación de Caspasa-1 cuando el cebado es LPS depende de P2X7R, pero no lo es cuando son otros los responsables del cebado [80]. El eflujo de potasio también es provocado directamente por toxinas formadoras de poros tales como la nigericina [45]. Además de la influencia de la disminución del potasio intracelular, se ha sugerido que durante el incremento del volumen celular en los macrófagos la formación de asteriscos y oligomerización de ASC comparte la misma vía de señalización que la activación del inflamasoma NLRP3, incluyendo esta la activación de canales TRP (del inglés “Transient Receptor Potential”) y el incremento de calcio intracelular [69].

### ADN mitocondrial y cardiolipinas

Además de producir mtROS, cuando la membrana pierde su potencial, la mitocondria libera ADN oxidado al citoplasma. El ADN mitocondrial oxidado sirve como activador del inflamasoma interaccionando y co-localizándose con NLRP3, incluso además puede activarlo cuando se programa apoptosis [81, 82].

Por otro lado, las cardiolipinas, un tipo de fosfolípido específico de la mitocondria, también serían mediadores de la activación del inflamasoma en respuesta a varios tipos de activadores. Estas actúan de forma directa uniéndose al dominio LRR de NLRP3 siendo un proceso independiente de mtROS pero también en un contexto de disfunción mitocondrial [83]. La cardiolipina es un lípido negativo similar al LPS y en condiciones normales está presente en forma exclusiva en la membrana mitocondrial interna. *La exposición de cardiolipina y la salida de citocromo C son huellas y también causa de disfunción mitocondrial debido a que ambos están muy involucrados en proceso de muerte celular apoptótica* [84]. Algunos trabajos indican que el LPS se une directamente a Caspasa-11 murina y a Caspasa-4 y/o -5 humana en el citosol, existiendo también pruebas de activación de Caspasa-11 [85].

### **Relocalización mitocondrial y rol de las sirtuinas en la activación del inflammasoma.**

*Un acontecimiento importante que también influye para la activación del inflammasoma sería la colocalización de NLRP3 y la mitocondria. Se ha reportado que el daño mitocondrial reduce los niveles de NAD<sup>+</sup> y esto provoca la inhibición de la deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> sirtuina-2, causando la acumulación de  $\alpha$ -tubulina acetilada que favorece la acción de la dineína y permite el movimiento de mitocondrias hacia el área perinuclear donde se encuentra NLRP3 y ASC, facilitando así la activación del inflammasoma tanto por mtROS o cardiolipinas [45, 86]. Además, un adaptador asociado a la mitocondria denominado MAVS (del inglés Proteína de Señalización Antiviral Mitocondrial), estaría involucrado en el reclutamiento de NLRP3 hacia la mitocondria participando junto con ASC en contexto de respuestas antivirales [70]. Por tanto, la colocalización de NLRP3 y la mitocondria, así como la participación de todos estos componentes (micotúbulos y MAVS) podrían ser reguladores positivos de la activación del inflammasoma NLRP3.*

### **Daño lisosomal y catepsinas**

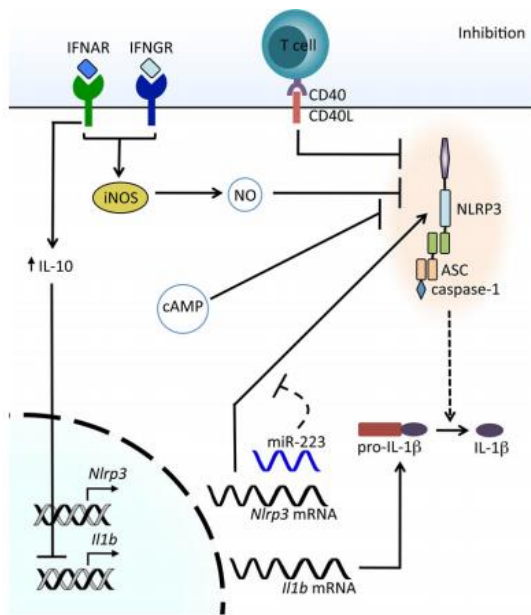
La ruptura de las membranas lisosomales provoca que su contenido y componentes de la propia membrana lisosomal sean vertidos al citosol, provocando indirectamente la activación del inflammasoma. El daño lisosomal/fagolisosomal es provocado principalmente por partículas cristalinas como sílica, sales de aluminio, colesterol o de urato. Estas "partículas" son fagocitadas y rompen la membrana lisosomal promoviendo aparentemente la activación del inflammasoma NLRP3 [25, 66, 87, 88].

Las catepsinas son cisteína proteasas lisosomales que son activas a pH ácidos, razón por la cual actúan dentro del lisosoma/fagolisosoma. Justamente cuando los activadores producen ruptura de la membrana fagolisosomal se liberan catepsinas al citosol y promueven la activación del inflammasoma [87, 89].

### **2.2.7. Regulación negativa del inflammasoma**

Los procesos inflamatorios no siempre son beneficiosos para el organismo, tal es el caso de las enfermedades autoinmunes o aterosclerosis donde la inflamación es un factor perjudicial porque ella está exagerada y prolongada en el tiempo o simplemente porque está desregulada. Por eso es que ***el organismo posee mecanismos regulatorios que frenan la respuesta inflamatoria.***

A nivel del inflammasoma también existen formas de regulación negativa que suprimen su acción, destacándose la acción de la IL-10, del óxido nítrico (NO), del miARN miR-223, del AMP cíclico (cAMP) y de la interacción de las células T por medio de CD40 y su ligando [45] (Ver figura 8).



**Figura 8. Inhibidores propuestos del inflamasoma.** Se han estudiado algunos elementos y señalizaciones que son capaces de inhibir la activación del inflamasoma como lo es el aumento de nivel intracelular de IL-10 a causa de los receptores de interferones de tipo I que reconocen IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , siendo esta interleuquina una de las que ejerce actividad antiinflamatoria inhibiendo la expresión génica de proIL-1 $\beta$ . Los receptores de IFN también son capaces de activar la NO sintasa (iNOS) que produce óxido nítrico (NO) que se ha reportado que inhibe la activación del inflamasoma. El miARN miR-223 también se ha visto que se une a la región 3'-UTR del ARNm de NLRP3 impidiendo la traducción, así como también la interacción de los linfocitos T mediante CD40-CD40L inhiben el inflamasoma. Imagen tomada de Sutterwala, F. S., 2014, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

Por un lado, ya hemos mencionado la acción de miR-223 que se une al extremo 3'-UTR del ARN mensajero que expresa NLRP3, provocando la supresión de la traducción de esta proteína [77, 78]. Por otra parte, los interferones (IFNs) de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) son reconocidos por sus receptores y esto puede provocar una regulación negativa a nivel del cebado transcripcional. A nivel transcripcional, estos IFNs estimulan la producción de IL-10 que es una citoquina capaz de inhibir la expresión de otras citoquinas proinflamatorias [90] como la IL-1 $\beta$ , lo que suprime la expresión de proIL-1 $\beta$  [91]. Por otra parte, los IFNs de tipo I y el IFN- $\gamma$ , al interaccionar con sus receptores, inducen la actividad de la enzima NO sintasa (iNOS) que genera óxido nítrico ( $\cdot$ NO). Este es un regulador negativo de la activación del inflamasoma debido a que induciría la nitrosilación de NLRP3 que impide el ensamblaje y bloquea la activación del inflamasoma [92, 93].

La inmunidad adaptativa también regula a la baja la acción proinflamatoria del inflamasoma mediante las células T CD4+, debiendo ocurrir la interacción linfocito-macrófago mediante el receptor CD40 de la célula T y su ligando CD40L en el macrófago, así como también con otros ligandos de la familia de factores de necrosis tumoral [94].

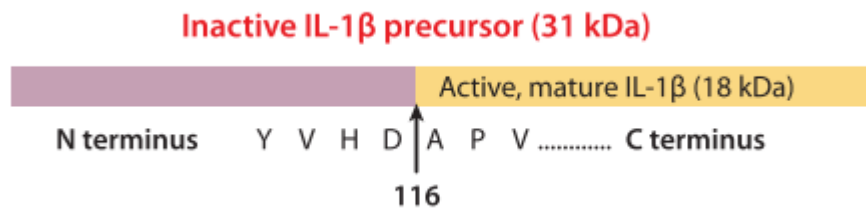
Se ha propuesto también que el sistema ubiquitina proteasoma juega un rol central en la terminación del proceso inflamatorio [95].

### 2.2.8. Rol proinflamatorio del inflamasoma

El inflamasoma NLRP3 activa Caspasa-1 la cual procesa proIL-1 $\beta$  y proIL-18 a IL-1 $\beta$  e IL-18 maduras respectivamente. Estas son dos potentes citoquinas proinflamatorias pertenecientes a la familia de interleuquina IL-1, ligandos de receptores de interleuquina en células inmunes que desencadenan señalizaciones y estimulan la producción de más citoquinas proinflamatorias. Además, la activación de Caspasa-1 por el inflamasoma también ocasiona piroptosis, un tipo de muerte celular lítica regulada que provoca inflamación por liberación de DAMPs e IL-1 $\alpha$ .

#### IL-1 $\beta$

Se expresa como una proforma de un tamaño de 31 kDa a la que denominamos proIL-1 $\beta$  y es inactiva. Como también ya se mencionó en la descripción de los mecanismos de activación y ensamblado del inflamasoma, *la expresión de esta citoquina no es constitutiva, sino que es inducible*. Para que esta citoquina sea activa debe clivarse removiéndose el extremo N-terminal con un corte proteolítico en el enlace entre los residuos de Alanina 116 y Aspartato 117, dejando así el fragmento C-terminal de 17.5 kDa que se trata de la IL-1 $\beta$  madura [96] (Ver figura 9).

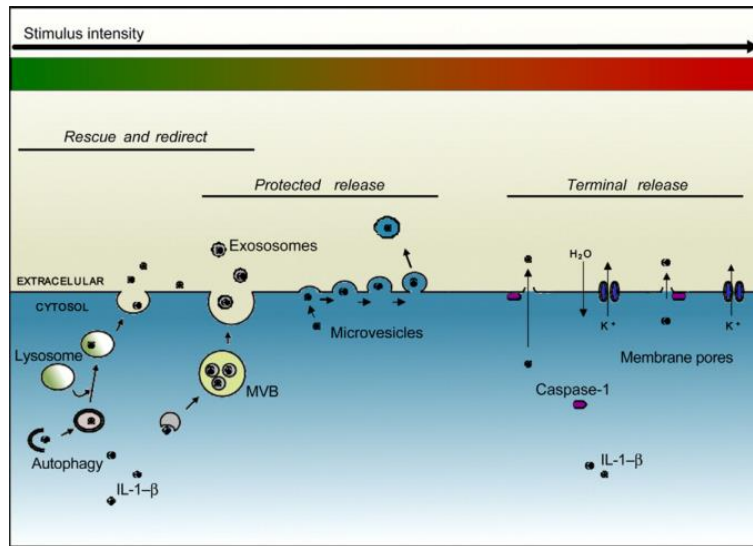


**Figura 9.** En la figura se muestra un esquema de la estructura del precursor inactivo de la IL-1 $\beta$  donde se indica con la flecha el sitio donde Caspasa-1 lo cliva (Ala 116- Asp 117). Este corte deja al fragmento de 18 kDa C-terminal mostrado en color beige que corresponde a la IL-1 $\beta$  madura proinflamatoria. Imagen tomada de *Dinarelli C.A., 2009, Annu. Rev. Immunol.*

**Este procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  es llevado a cabo por la enzima Caspasa-1 la cuál es activada gracias al ensamblado del inflamasoma [42, 43], clivando así la pro-IL-1 $\beta$  presente en el citosol.** Una vez que es producida, la forma activa de IL-1 $\beta$  es liberada hacia el exterior de la célula y lo hace de una forma no convencional distinta a la vía clásica de secreción de proteínas (retículo endoplásmico-Golgi-exocitosis) [97]. Los mecanismos de secreción de la IL-1 $\beta$  son muy discutidos, destacándose tres posibles: 1) rescate y redireccionamiento, 2) liberación protegida y 3) liberación terminal [97].

El primero consiste en que cuando la IL-1 $\beta$  es destinada a degradación lisosomal por autofagia, una fracción contenida en las vesículas lisosomales es rescatada para ser dirigida a la liberación por exocitosis. El segundo mecanismo consistiría

en una secreción de IL-1 $\beta$  contenida en microvesículas de membrana plasmática o de exosomas como forma de protección de la citoquina. Por último, el tercer mecanismo de liberación terminal está relacionado a la piroptosis provocada por la activación de Caspasa-1 que ocasiona la formación de poros en la membrana celular que provocan lisis osmótica y consecuente expulsión al espacio exterior de la IL-1 $\beta$  madura presente en el citosol junto al resto del contenido intracelular (Ver figura 10).

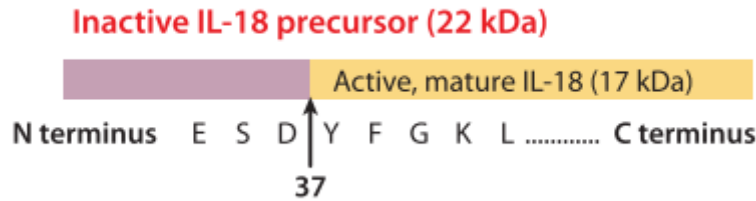


**Figura 10. Mecanismos propuestos de liberación de IL-1 $\beta$ .** Se muestra en la imagen los tres posibles mecanismos de liberación de la IL-1 $\beta$ : Rescate y redireccionamiento, liberación protegida y liberación terminal. En la barra superior se muestra la intensidad del estímulo que induce la liberación en forma creciente indicado por el sentido de la flecha, lo que muestra la relación entre esto y los mecanismos de liberación descritos. Imagen tomada de López-Castellón G., 2011, Journal Article.

***Una vez secretada, esta citoquina se une a receptores de superficie celular IL-1R (“IL-1 receptor”) iniciando cascadas de señalización pro-inflamatorias con subsecuentes efectos pirógenos, celulares y sistémicos [72, 96].***

## **IL-18**

La interleuquina 18 tiene características comunes a la IL-1 $\beta$  (ambas pertenecen a la familia IL-1), siendo que esta citoquina también es expresada como un precursor inactivo (proIL-18) de 22 kDa y es clivada por Caspasa-1 a su forma madura y activa de 17 kDa (IL-18) como se muestra en la figura 11 [96].



**Figura 11. Esquema del precursor inactivo de IL-18.** Se indica con la flecha el sitio de clivaje que ejecuta Caspasa-1. La zona de color beige corresponde al fragmento C-terminal de IL-18 madura y activa que es secretado. Imagen tomada de Dinarello C.A., 2009, *Annu. Rev. Immunol.*

Sin embargo, IL-18 presenta muchas diferencias con la IL-1 $\beta$ . Una de ellas, por ejemplo, es el patrón de expresión siendo que el gen que codifica para proIL-18 es constitutivo en casi todas las células y por lo tanto no necesita del cebado transcripcional [58, 98]. Esta citoquina también tiene un rol proinflamatorio cuando es secretada pero un aspecto particular es que la IL-18 induce la producción de IFN- $\gamma$  para promover la diferenciación de linfocitos T CD4+, generación de memoria de linfocitos T CD8+ citotóxicos y células Natural Killer, potenciando así la inmunidad [58, 72]. Cuando la IL-18 es secretada es reconocida por los receptores IL-18R (compuestos por las subunidades IL-18R $\alpha$  y IL-18R $\beta$ ) los cuales desencadenan las cascadas de señalización proinflamatoria [96].

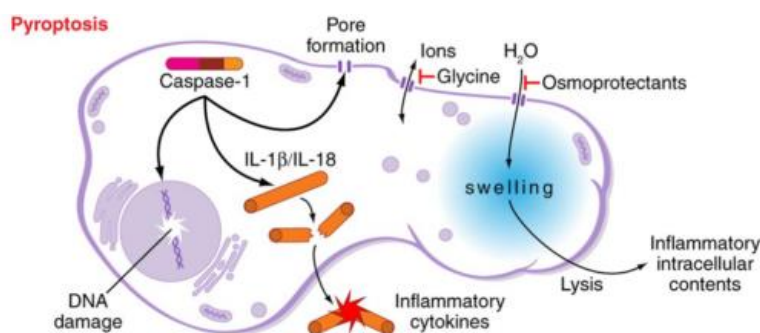
### **Piroptosis (Necrosis regulada)**

*Como ya mencionamos, la piroptosis es un tipo de muerte celular inflamatoria programada dependiente de Caspasa-1 [35, 72]. Esta muerte se caracteriza por ser lítica (ruptura de membrana) y liberar mediadores inflamatorios como IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-18, señales de tipo DAMPs y también está acompañada de fragmentación del ADN, una característica de la apoptosis. Por esa razón, es un tipo de muerte proinflamatoria, además que las células piroptóticas son atacadas por fagocitos debido a que la piroptosis expone fosfatidil serina (fosfolípido de membrana) que es una señal de “eat me” para ser fagocitado por macrófagos [99].*

*El mecanismo que desencadena este tipo de muerte no es totalmente conocido aún, pero sí se sabe que Caspasa-1 tiene un rol clave en ella. Se ha propuesto que la causa de la lisis por piroptosis se debe a la formación de poros en la membrana celular de aproximadamente 1 a 2.5 nm de diámetro lo que provoca lisis osmótica. Esto ha sido reportado en macrófagos infectados con toxina letal de Anthrax o con Salmonella. Si bien se activan distintos inflamasomas, ambas señales logran activar Caspasa-1 y convergen en una vía común de muerte por piroptosis [100]. Por lo tanto, si bien Caspasa-1 puede activarse por varias vías (inflamasomas canónicos), todas las formas confluyen en un mecanismo común de muerte celular por piroptosis, además del procesamiento de IL-1 $\beta$  e IL-18. Se ha sugerido también que se encuentra involucrado un complejo supramolecular formado por oligómeros de ASC que forma dímeros mediante el dominio PYD que*

se denomina Piroptosoma. Este es distinto del inflamasoma y se ensambla en condiciones intracelulares con baja concentración de potasio, siendo capaz de activar Caspasa-1 y producir piroptosis [101]. La bomba de sodio y potasio ATPasa podría estar implicada en la muerte piroptótica debido a que se ha reportado que luego de la inflamación la inhibición de la bomba de Na/K provoca muerte celular porque no se logran balancear los niveles intracelulares de sodio y el gradiente osmótico favorece la entrada de agua a la célula, culminando en considerable aumento de volumen y lisis celular [102].

Una característica de la piroptosis es que comparte similitudes tanto con la apoptosis y la necrosis. Con la apoptosis comparte que se trata de una muerte programada dependiente de la activación de Caspasa-1, aunque en el caso de la apoptosis son otras las Caspasas iniciadoras que intervienen. Sin embargo, la piroptosis difiere en gran medida con la apoptosis en que se trata de una muerte que promueve inflamación, asemejándose en este sentido a la necrosis, siendo que la apoptosis es clásicamente reconocida como una muerte celular antiinflamatoria. En la figura 12 se observan las características principales y lo que se conoce hasta el momento acerca de este tipo de muerte celular.



**Figura 12. Eventos que ocurren en la piroptosis.** En la imagen se muestra un macrófago piroptótico en el cual Caspasa-1 se activó y desencadena por un lado el procesamiento de IL-1β/IL-18 y por otro ocasiona daño al ADN y la formación de poros en la membrana. Estos poros favorecen el libre tráfico de iones y la entrada de agua, aumentándose así la presión osmótica que ocasiona la lisis celular y liberación de contenidos inflamatorios intracelulares. Imagen tomada de *Fink, S.L., 2008, PNAS*.

### **2.3. Nitroalquenos**

En nuestro laboratorio nos encontramos trabajando con compuestos moduladores de la inflamación: nitroalquenos endógenos y de síntesis.

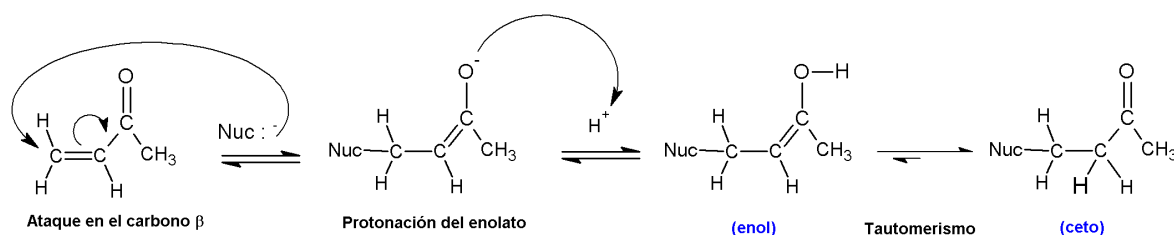
Durante estos últimos años varios grupos han trabajado con diversos nitroalquenos y en nuestro caso prestamos especial interés a los derivados de la vitamina E desarrollados por nuestro grupo (nitroalquenos de segunda generación [22]). En lo que respecta a esta tesina y otros trabajos realizados en nuestro laboratorio también se ha tenido interés en el ácido nitro-oleico (OA-NO<sub>2</sub>) y beta-nitro-estireno (β-NO<sub>2</sub>-E).



### 2.3.1. Definición

Se denomina nitroalquenos a las moléculas orgánicas compuestas por alquenos que tienen un grupo nitro unido a un carbono del doble enlace. Este grupo nitroalqueno deja al carbono beta adyacente al grupo nitro como centro atrayente de electrones ocasionando así que estos compuestos sean potentes electrófilos. Esta propiedad permite que los nitroalquenos puedan formar aductos de forma reversible mediante la reconocida reacción de "adición de Michael" con tioles de bajo peso molecular, residuos nucleofílicos de proteínas (residuos de cisteína o histidina) [103].

Llamamos **nucleófilo** o base de Lewis a las moléculas orgánicas que tienen disponible un par de electrones para donarlos a otra molécula que contiene un orbital vacío y así formar nuevos enlaces covalentes, mientras que la molécula que es capaz de aceptar los electrones del nucleófilo se la denomina **electrófilo** o ácido de Lewis [104]. La **reacción de adición de Michael** es una adición 1,4 (adición conjugada) de un carbanión (nucleófilo donador de Michael) a un doble enlace de un compuesto  $\alpha,\beta$  insaturado (electrófilo aceptor de Michael), reacción mostrada en la Esquema 1 [105, 106].



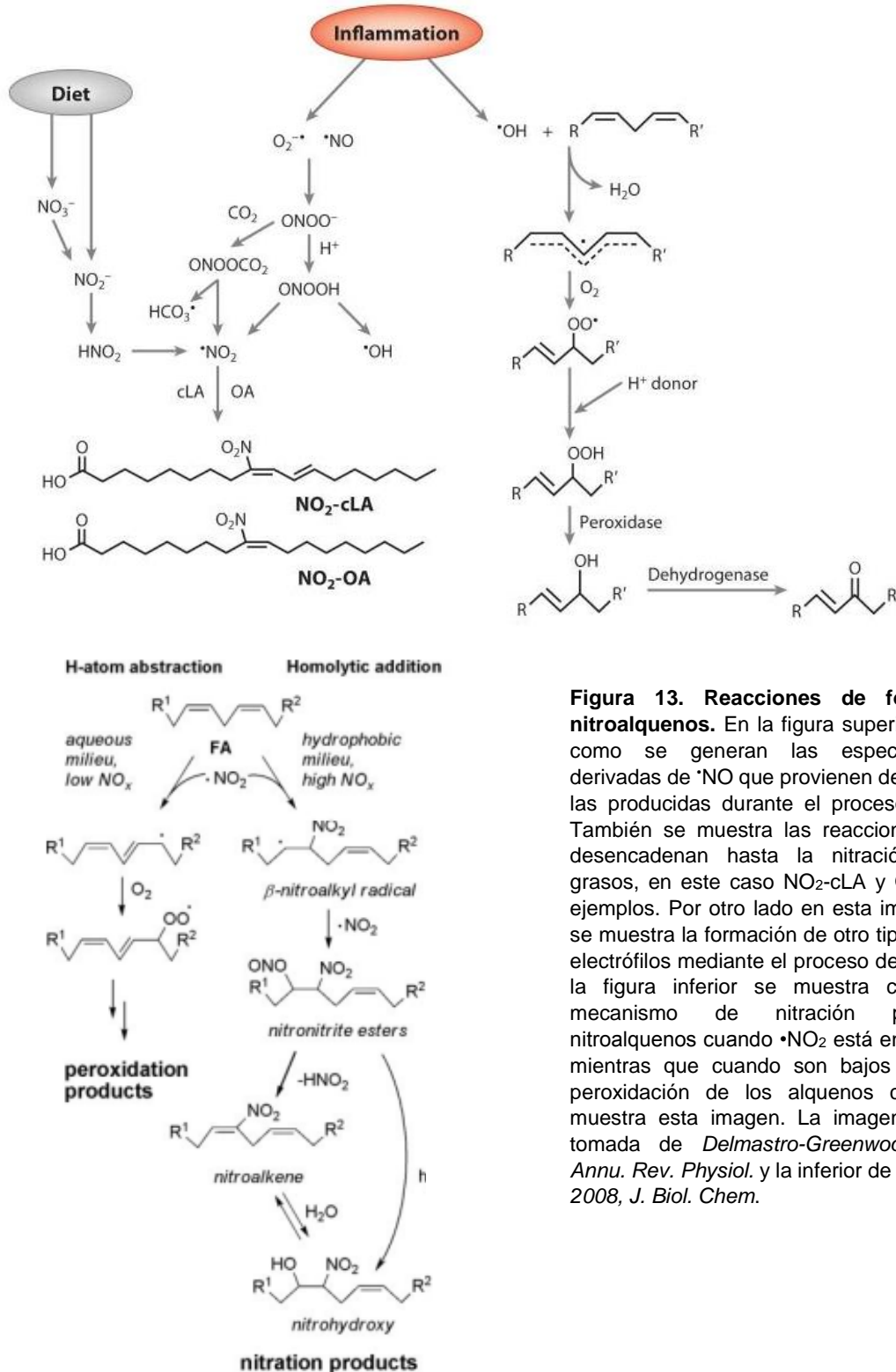
Esq. 1. Reacción de adición de Michael, adición 1,4 o adición conjugada. Tomada de *Wade. L.G., 2012, Pearson.*

### 2.3.2. Características químicas

#### Formación

Los precursores orgánicos naturales capaces de formar nitroalquenos más estudiados hasta el momento son los ácidos grasos poliinsaturados y con dobles enlaces conjugados (en particular está bien demostrada la nitración endógena del cLA (del inglés "conjugated Linoleic Acid"). Estos son nitrados mediante reacciones con  $\cdot\text{NO}$  (radical óxido nítrico) y óxidos de nitrógeno derivados del  $\cdot\text{NO}$ , del  $\text{ONOO}^-$  (peroxinitrito) y del ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) como el radical dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ); junto a mediadores inflamatorios derivados del oxígeno como radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y radicales peroxilo lipídicos ( $\text{LOO}^{\cdot}$ ) [107]. Los ácidos grasos y el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ , base conjugada del  $\text{HNO}_2$ ) pueden ser provenientes de la dieta o pueden ser de fuentes endógenas. En condiciones inflamatorias y dependiendo de los niveles de oxígeno ocurren

distintos procesos, a baja concentración de O<sub>2</sub> es cuando predomina la nitración de ácidos grasos y a altas, la peroxidación lipídica [108]. El •NO<sub>2</sub> generado a partir de las reacciones entre las especies derivadas del •NO como se muestra en la figura 13 reacciona con electrones π de alquenos mediante reacción de adición y todos estos procesos ocurren de forma endógena en el organismo [108, 109].



**Figura 13. Reacciones de formación de nitroalquenos.** En la figura superior se muestra como se generan las especies reactivas derivadas de •NO que provienen de la dieta como las producidas durante el proceso inflamatorio. También se muestra las reacciones que estas desencadenan hasta la nitración de ácidos grasos, en este caso NO<sub>2</sub>-cLA y OA-NO<sub>2</sub> como ejemplos. Por otro lado en esta imagen también se muestra la formación de otro tipo de alquenos electrófilos mediante el proceso de oxidación. En la figura inferior se muestra con detalle el mecanismo de nitración para formar nitroalquenos cuando •NO<sub>2</sub> está en altos niveles, mientras que cuando son bajos predomina la peroxidación de los alquenos como también muestra esta imagen. La imagen superior fue tomada de *Delmastro-Greenwood M., 2014, Annu. Rev. Physiol.* y la inferior de *Freeman B.A., 2008, J. Biol. Chem.*

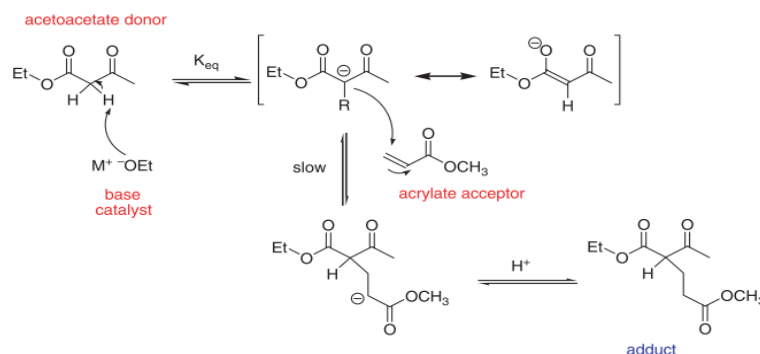
Además de la nitración los ácidos grasos pueden sufrir otras modificaciones que generan ácidos grasos electrofílicos, siendo una de ellas la oxidación de ácidos grasos como se muestra en la figura 13.

Existen múltiples mecanismos que median la nitración de biomoléculas y son múltiples los factores que influyen en la formación de nitroalquenos. El peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) reacciona con ácidos de Lewis como el  $\text{CO}_2$  para dar el anión nitrosoperoxocarbonato ( $\text{ONO-OCO}_2^-$ ) y protones para dar ácido peroxinitroso ( $\text{ONO-OH}$ ), ocurriendo que ambos formados predominantemente en medios inflamatorios rinden el radical dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) por homólisis de sus débiles enlaces peroxo [110]. Otros mecanismos de nitración son: 1) acción de peroxidases que catalizan la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\cdot\text{NO}_2$ , 2) la protonación de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) en ambientes con pH bajo (ejemplo el compartimiento gástrico donde se favorece la nitración de ácidos grasos provenientes de la dieta), y 3) reacciones aerobias del  $\cdot\text{NO}$ .

### Reactividad de los nitroalquenos con residuos de Cys e His: reacción de adición de Michael.

Los nitroalquenos son compuestos electrofílicos debido a que el grupo nitro es un fuerte aceptor de electrones y genera en el carbono beta adyacente un centro electrón-atrayente capaz de formar aductos con nucleófilos mediante reacción de adición de Michael [103, 105, 111].

Esta reacción consiste en una adición conjugada o adición 1,4 donde participa un nucleófilo denominado dador de Michael para formar un aducto con un electrófilo o aceptor de Michael. Un ejemplo clásico de dador son los aniones enolato pero también hay compuestos sin carbono que tienen rol de dador de Michael tales como los tioles y las aminas, mientras que los aceptores pueden ser compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados o que contengan grupos aceptores de electrones como lo tienen los nitroalquenos (ver figura 14) [105].



**Figura 14. Esquema de la reacción de adición de Michael y su mecanismo.** Se muestra en forma genérica la reacción global de adición de Michael donde por un lado tenemos al nucleófilo dador que puede ser cualquier cadena carbonada con un grupo donador de electrones como pueden ser los enolatos, aminas o tioles. Por otro lado tenemos al aceptor que es el electrófilo que consiste en un alqueno donde el doble enlace está conjugado a un grupo funcional aceptor de electrones. Aquí se forma el aducto que se muestra. Además se muestra el mecanismo de adición de Michael tomando como ejemplo la reacción de acetoacetato como dador y acrilato como aceptor. Imagen tomada de Mather B.D., 2006, *Progress Polymer Science*.

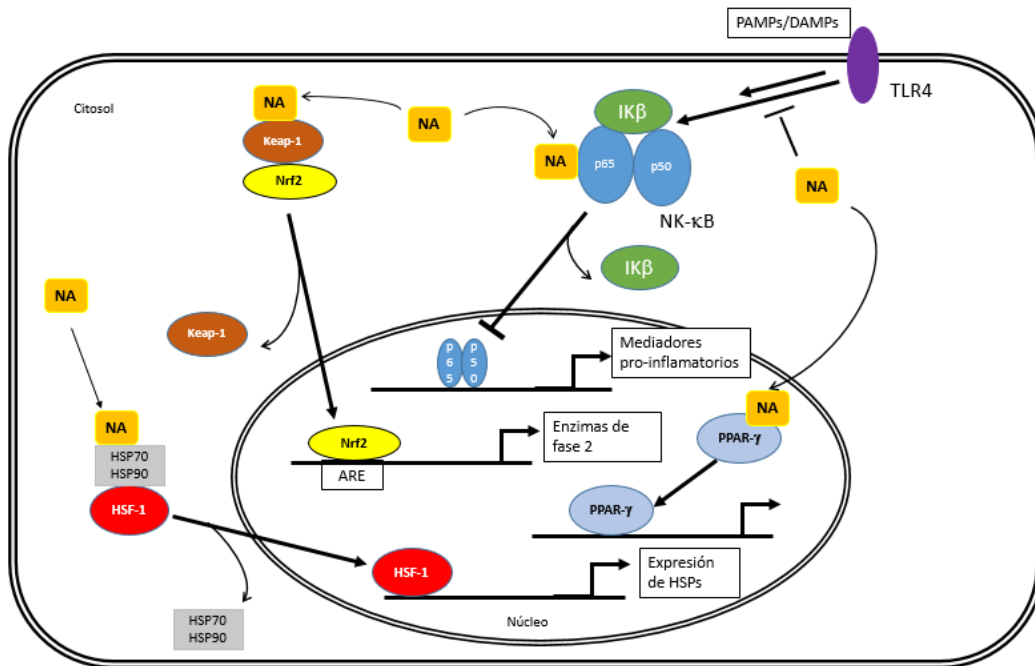
Como se muestra en la figura 14, el mecanismo, consiste en un primer paso de generación del anión del dador de Michael en equilibrio y este hace una adición 1,4-conjugada con el aceptor de Michael para formar el aducto covalente. En la figura 14 se muestra como ejemplo de mecanismo de adición de Michael la reacción del acetoacetato como dador con acrilato como aceptor. El paso determinante en esta reacción es el ataque del anión, donde la velocidad de reacción es de segundo orden global y de primer orden respecto al paso de formación del aducto [105].

Las aminas y los tioles son también buenos dadores en la adición de Michael y esto es importante porque este tipo de compuestos están presentes en muchas proteínas de relevancia biológica. Las aminas pueden formar aductos con electrófilos y difieren en cuanto a la cantidad de sustituyentes que tengan, siendo así las aminas secundarias más nucleofílicas y por tanto más reactivas que las primarias, aunque estas últimas pueden reaccionar con dos equivalentes de aceptor [105]. Los tioles cuando se encuentran como anión tiolato también son buenos dadores en esta reacción y son mejores nucleófilos que las aminas. El incremento del pH favorece a que los tioles se desprotonen y haya alta concentración de tiolato, favoreciendo entonces la reacción [105, 111], siendo mejores nucleófilos los tioles con  $pK_a$  más alto [112]. Este tipo de dador de Michael se encuentra presente en proteínas formando parte de los residuos de cisteínas y los nitroalquenos como compuestos electrófilos aceptores son capaces de formar aductos con tioles. Se ha trabajado utilizando los ácidos grasos nitrados OA-NO<sub>2</sub> y LNO<sub>2</sub> haciéndolos reaccionar con glutatión (GSH) que es una molécula relativamente pequeña con una cisteína y fueron detectados por espectrometría de masa, análisis cinéticos y espectrofotométricos los aductos GS-OA-NO<sub>2</sub> y GS-LNO<sub>2</sub> [103, 111]. Estos nitroalquenos también se han hecho reaccionar con la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) debido a que su sitio catalítico contiene una cisteína (Cys-149), donde se ha visto que OA-NO<sub>2</sub> y LNO<sub>2</sub> formaron aducto a ella y provocaron la inhibición de la actividad enzimática, lo que indica que estos nitroalquenos son especies capaces de reaccionar con tiolatos [103, 111].

En resumen en cuanto a la reactividad química de los nitroalquenos, estos funcionan como electrófilos aceptores en la adición de Michael y pueden formar aducto a tioles y aminas (por ejemplo dimetilamina) y en proteínas con residuos de cisteínas e histidinas, pudiendo alterar el funcionamiento de estas y mediar efectos biológicos debido a que estos aminoácidos están presentes en muchos sitios claves (sitios activos y reguladores) en proteínas.

### 2.3.3. Acciones biológicas

Debido a la reactividad con cisteínas e histidinas los nitroalquenos causan efectos biológicos actuando sobre proteínas que resultan importantes en determinado contexto. A lo largo de estos años, se ha demostrado que los compuestos nitroalquenos derivados de ácidos grasos tienen potentes acciones antiinflamatorias debido a que actúan sobre componentes de distintas vías de señalización implicadas en los procesos inflamatorios. Como se muestra en la figura 15 hasta el momento se ha estudiado que actúan sobre las siguientes vías de señalización y de la siguiente forma: 1) Inhibición de NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), 2) Activación de Nrf2-Keap1 [Nuclear Factor (Erythroid-derived 2) like 2] - (Kelch-like ECH-associated protein 1) [113], 3) Activación de PPAR- $\gamma$  (proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) [114] y 4) Activa HSF-1 (Heat Shock Factor 1) [115].



**Figura 15. Esquema de vías de señalización celular involucradas en procesos inflamatorios donde los ácidos grasos nitrados actúan.** Por un lado los nitroalquenos atacan cisteínas críticas de Keap1 provocando la disociación de Nrf2 que se transloca al núcleo promoviendo la expresión de genes de enzimas de fase 2 antioxidantes y detoxificantes. También se muestra que estos inhiben NF- $\kappa$ B, provocando entonces la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios. Por último se observa que los nitroalquenos actúan sobre PPAR- $\gamma$  promoviendo su activación, así como también activa la expresión de HSP dependiente de HSF-1.

### **Inhibición de la vía pro-inflamatoria NF- $\kappa$ B**

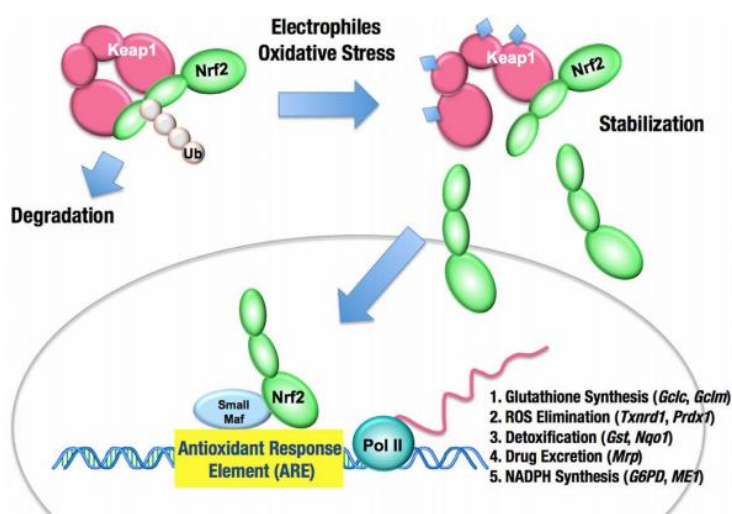
En la sección 2.2.5 cuando se describió la regulación del inflamasoma NLRP3 a nivel de la primera señal, se profundizó en la vía proinflamatoria NF- $\kappa$ B la cual está muy involucrada en el cebado transcripcional, siendo el nexo entre la señal de peligro detectada por los TLR y la expresión génica de proIL-1 $\beta$  y NLRP3. Los nitroalquenos derivados de los ácidos grasos se han caracterizado como potentes compuestos antiinflamatorios, para lo que se considera clave su capacidad de alquilar la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, lo sugiere que podría impedir que esta se una a sitios reguladores de genes que promueven la inflamación [107, 108, 116]. Esto se ha comprobado usando OA-NO<sub>2</sub> y LNO<sub>2</sub> que al aplicarlos sobre macrófagos estimulados con LPS disminuyeron la secreción de citoquinas proinflamatorias dependientes de la vía NF- $\kappa$ B, aparte del resultado experimental *in vitro* que mostró la nitroalquilación de p65 [116]. Recientemente, se ha estudiado que los nitroalquenos también interrumpen la señalización de TLR4 inducida por LPS a partir de experimentos realizados con OA-NO<sub>2</sub> que mostraron inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B mediante la interrupción de IKK $\beta$  (responsable de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ ) [117].

### **Activación de la vía antioxidante/detoxificante Nrf2-Keap1**

La vía de señalización Nrf2/Keap1 es uno de los principales sistemas de citoprotección que poseen los vertebrados contra diversos agentes causantes de estrés (patógenos, sustancias tóxicas, radiación, etc.) capaces de provocar daño celular y por ende al organismo.

La proteína Nrf2 [Nuclear Factor (Erythroid-derived 2) like 2] se trata de un factor de transcripción que se une al ADN sobre el elemento de respuesta antioxidante ARE ("Antioxidant Response Element") para inducir la expresión de aproximadamente 100 enzimas de fase 2, las cuales desempeñan roles antiinflamatorios o detoxificantes [118-120]. En condiciones normales se encuentra unido a Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), proteína homodimérica que lo mantiene secuestrado en el citosol impidiendo que se traslade al núcleo y se una al ADN, manteniendo silenciada la expresión de enzimas detoxificantes y antioxidantes. En condiciones normales, Keap1 junto con la proteína Cul3, se comportan como un adaptador de ubiquitinación para Nrf2 y así permiten la degradación proteosomal de Nrf2 [121, 122]. Además Keap1 funciona como sensor de electrófilos (derivados de condiciones de estrés oxidativo y de xenobióticos) gracias a los residuos de cisteínas ultrasensibles a este tipo de moléculas que posee Keap1, aunque se mostró que la activación de Nrf2-Keap1 es independiente de la Cys151 de Keap-1 [113]. Al unirse uno o más electrófilos a los residuos de Cys reactivas, ocurre un cambio conformacional en Keap1 que permite liberar a Nrf2, lo que hace que este se traslade hacia el núcleo para unirse a AREs y así inducir la expresión de genes de enzimas de fase 2 [118-120, 123]. Los nitroalquenos, por su carácter electrofílico, logran formar aductos

con los tioles de las cisteínas de Keap1, siendo reportado que las cisteínas 38, 226, 257, 273, 288 y 489 fueron muy reactivas con el OA-NO<sub>2</sub> [113]. Por lo tanto, los nitroalquenos son capaces de activar la vía Nrf2-ARE como consecuencia de la modificación de Keap1 [124], promoviendo la expresión génica de enzimas de fase 2, de las cuales se destacan: la hemoxigenasa-1 (HO-1), la NAD(P)H quinona deshidrogenasa-1 (NQO1), subunidades moduladora y catalítica de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa (GCLM y GCLC) involucradas en la síntesis de GSH, glutatión S-transferasa (GST) y otras que se muestran en la figura 16. [118].



**Figura 16 Esquema de la vía Nrf2-Keap1.** Se muestra por un lado a Nrf2 unido a Keap1 en condiciones basales, donde Nrf2 es ubiquitinada para ser sometido a degradación proteasomal. En condiciones de estrés oxidativo, moléculas electrófilas (entre ellas los nitroalquenos) reaccionan formando aductos con residuos de cisteínas reactivas de Keap1 provocando la liberación de Nrf2, que se traslada hacia el núcleo para unirse al ADN en el elemento ARE con la colaboración de proteínas Small Mafs. Esto induce la expresión génica de enzimas antioxidantes/detoxificantes de fase 2 como las que se muestran descritas en la figura. Imagen tomada de *Mitsuishi Y., 2012, Front. Onc.*

### Acción sobre PPAR- $\gamma$ y HSF-1

Los PPARs (“proliferator-activated receptors”) pertenecen a la familia de factores de transcripción inducibles por ligandos. Existen tres tipos de PPARs: PPAR- $\alpha$ , PPAR  $\delta/\beta$  y PPAR- $\gamma$ . Todos ellos están involucrados en inducir expresión de genes involucrados en funciones como la adipogénesis, metabolismo lipídico, inflamación y mantenimiento de la homeostasis. Específicamente PPAR- $\gamma$  es el más altamente expresado en tejido adiposo, tanto blanco como pardo, sitio donde es el principal mediador de la adipogénesis, el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina [125]. Además, PPAR- $\gamma$  se expresa en otros tejidos donde

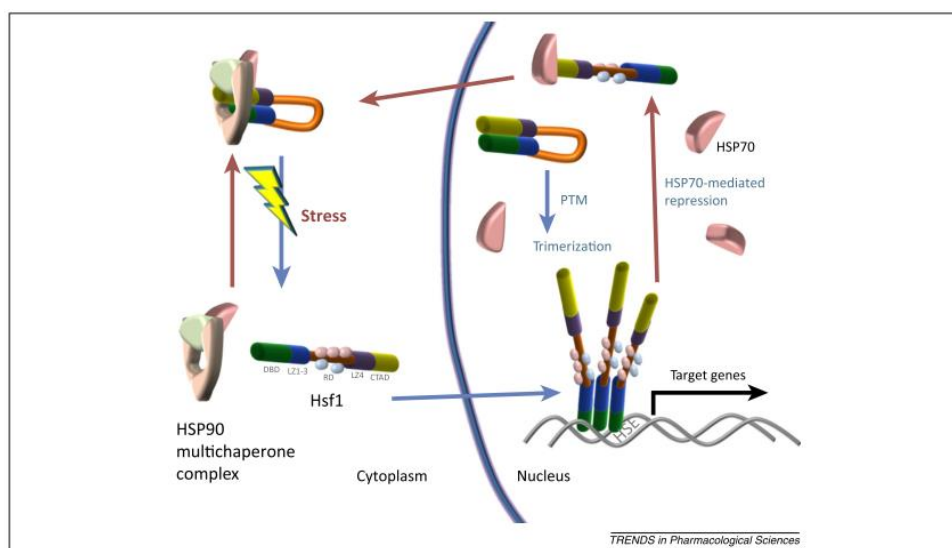
regula la señalización inflamatoria debido a que en células mieloides como los macrófagos suprime la expresión de mediadores proinflamatorios como el IFN- $\gamma$ , así como también suprime la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [108].

Este factor de transcripción es inducible por ligandos como metabolitos lipídicos (ej. ácidos grasos poliinsaturados, oxidados o nitrados) los cuales son reconocidos al unirse al dominio de unión a ligandos (LBD). Se ha mostrado mediante caracterización estructural que el nitroalqueno LANO<sub>2</sub> interacciona con los residuos Arg288 y Glu343 por enlaces de hidrógeno y a través de una reacción de adición de Michael con el residuo Cys285 presente también en este dominio de PPAR- $\gamma$ . La modificación de este residuo también ha sido reportado para el caso de otros electrófilos similares a los nitroalquenos, tratándose justamente de ácidos grasos endógenos reportados como activadores de PPAR- $\gamma$  [114, 126]. Posteriormente se reportó que el OA-NO<sub>2</sub> es más potente que el LANO<sub>2</sub> como activador de PPAR- $\gamma$  [127]. Estas observaciones se han hecho *in vitro* y aún no han sido verificadas de forma convincente *in vivo*. **Desde nuestro punto de vista y tomando en cuenta los efectos antiinflamatorios que PPAR- $\gamma$  ejerce a nivel de los macrófagos y otros componentes del sistema inmune, su activación mediada por nitroalquenos sería una acción importante que contribuiría a la modulación de la inflamación por estos compuestos.**

“Heat Shock Factor 1” (HSF-1) es también un factor de transcripción que promueve respuestas citoprotectoras regulando la expresión de proteínas del choque de calor (“Heat Shock Proteins”, HSP). Estas se tratan de chaperonas que participan en el plegamiento y translocación de péptidos a través de membranas expresadas en respuesta a situaciones de estrés. Existen varios tipos de HSPs las cuales se clasifican en grupos de acuerdo a su peso molecular. Sus funciones son diversas dependiendo del tipo de HSP [128]. Estas representan una potencial causa de inflamación en aterosclerosis y donde estaría especialmente involucrada la HSP60 [129]. Estas proteínas también son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T desencadenando así respuesta inmune [130]. Las HSP pueden ser liberadas al medio extracelular a partir de células necróticas o por actividad exosomal, provocando activación de la inmunidad innata debido a que son ligandos de TLRs [131, 132].

HSF-1 se une al “Heat Shock Element” (HSE) y así promueve la transcripción de las HSPs [128]. Esta actividad del HSF-1 es suprimida por unión a las chaperonas HSP70 [133] y la HSP90 [134]. En condiciones de estrés, HSF-1 es disociado de estas chaperonas siendo sometido a modificaciones post traduccionales que impulsan su acumulación en el núcleo y así su interacción con el ADN [135]. El mecanismo de regulación y acción de HSF-1 se muestra en la figura 17.





**Figura 17. Regulación de Heat Shock Factor 1 y su respuesta al estrés.** En condiciones basales HSF-1 se encuentra unida al complejo multichaperona compuesto por HSP70 y HSP90 que lo mantienen inactivo. En condiciones de estrés el complejo multichaperona se disocia de HSF-1 y este se despliega quedando como monómero susceptible a sufrir modificaciones postraduccionales (representadas como bolas celestes y rosadas). Esto promueve que se traslade hacia el núcleo y se una al ADN sobre el HSE homotrimerizándose, lo que induce la expresión de HSPs citoprotectoras. Esta acción puede ser reprimida por la HSP70 que nuevamente vuelve a secuestrarla formándose el complejo multichaperonas HSP90-HSP70. Las flechas azules indican el sentido de la activación de HSF-1 y las rojas la supresión. Imagen tomada de Dayalan Naidu, S., 2015, *Trends Pharmacol Sci*.

Esta vía de señalización también ha sido descubierta como blanco de nitroalquenos aunque no está claro aún el mecanismo de acción. Mediante técnicas de microarreglos de RNA en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) tratadas con OA-NO<sub>2</sub> se descubrió que el cambio transcriptómico más importante inducido por este nitroalqueno es la sobreexpresión de genes relacionados a la respuesta al choque de calor (“Heat Shock Response”, HSR), blancos de HSF-1. Esto llevó a plantearse que los nitroalquenos pueden formar aductos con cisteínas críticas de HSF-1 o con las chaperonas HSP70 y HSP90 que lo mantienen inactivo, lo que promovería así la activación de HSR mediante HSF-1 [115].

### **Otras acciones de los nitroalquenos derivados de ácidos grasos**

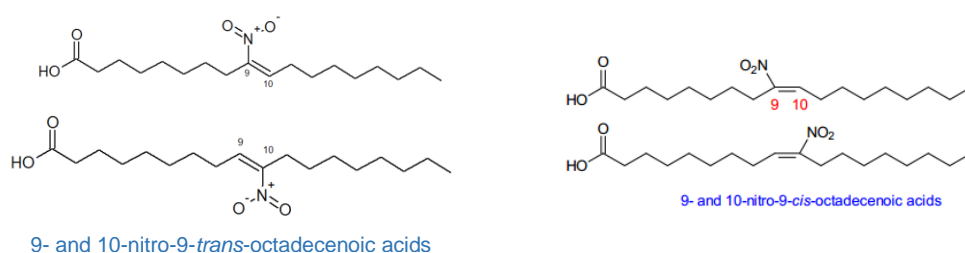
En lo que respecta a los compuestos nitroalquenos derivados de ácidos grasos se han reportado recientemente diferentes acciones biológicas. El OA-NO<sub>2</sub> y nitroalquenos derivados de ácidos grasos regulan el transporte de calcio (Ca<sup>2+</sup>) modulando canales iónicos TRP (del inglés “Transient Receptor Potential”), siendo esto relevante en contextos inflamatorios [136]. Por otro lado el OA-NO<sub>2</sub> inhibe también la proliferación de células de músculo liso de la arteria pulmonar así como también disminuye la producción de ROS generadas por los macrófagos activados [137], además los ácidos grasos nitrados inhiben de forma directa e irreversible la actividad de la enzima 5-lipooxigenasa (relacionada con inflamación por catalizar

síntesis de leucotrienos), atenuando así respuestas inflamatorias agudas [138]. Se ha estudiado en ratones que nitroalquenos derivados del OA-NO<sub>2</sub> inhibieron la falla multiorgánica inducida por el efecto del LPS [139] y también reducen los niveles de triglicéridos y normalizan los de ácidos grasos en el plasma, además de incrementar los niveles plasmáticos de lipoproteína de alta densidad (HDL) [140].

#### 2.3.4. Nitroalquenos estudiados en nuestro laboratorio

##### Ácido nitro-oleico (OA-NO<sub>2</sub>)

Este nitroalqueno es derivado de un ácido graso insaturado, el ácido oleico. En el laboratorio se sintetiza por medio de la reacción de nitroselenización y si bien se ha reportado su formación *in vivo*, está es al menos cuestionable. Existen dos especies de ácido nitro oleico, una con el grupo nitro en el C9 y otra en el C10 como se muestra en la figura 18 con su respectivo nombre IUPAC. Además de la isomería posicional, existen dos estereoisómeros Z (*cis*) y E (*trans*), también representados en la figura 18.



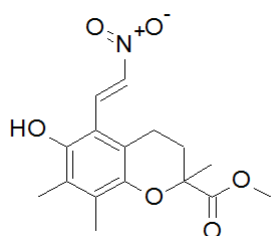
**Figura 18. Estructura química y nombre IUPAC del OA-NO<sub>2</sub>.** Las dos estructuras a la izquierda corresponden a la especie de ácido nitro-oleico con el grupo nitro en el C9 (ácido 9-nitro-9-*trans*-octadecenoico) y en el C10 (ácido 10-nitro-9-*trans*-octadecenoico). Las estructuras a la derecha difieren de las anteriores en la estereoisomería *cis*. Las estructuras de la izquierda fueron tomadas de <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/nitrofa/file.pdf>.

***Este nitroalqueno junto a otros ácidos grasos nitrados como el nitro-linoleico (LANO<sub>2</sub>), han sido muy estudiados como compuestos anti-inflamatorios por todos los efectos que ejercen sobre vías de señalización involucradas en estos procesos, como se mostró en la sección anterior.***

Si bien los ácidos grasos nitrados son beneficiosos en su efecto antiinflamatorio, tienen la desventaja de estar sometidos a un rápido catabolismo por  $\beta$ -oxidación y saturación, así como a aducción a tioles de proteínas plasmáticas (por ejemplo albúmina), disminuyendo su biodisponibilidad [141]. Esto limitaría sus acciones biológicas y su uso como fármaco para tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, surgiendo la necesidad de crear nuevas estrategias que prolonguen y/o dirijan la acción de los nitroalquenos.

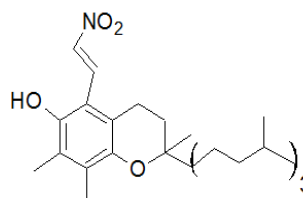
## **Nitroalquenos de 2ª generación (NATxME y NA- $\alpha$ -TOH)**

Integrantes de nuestro grupo de trabajo han investigado, desarrollado y sintetizado nuevos nitroalquenos análogos/derivados del  $\alpha$ -tocoferol (más conocido como Vitamina E) [22]. La estrategia fue la adición de un grupo funcional nitroalqueno a la estructura de la vitamina E, diseñándose el compuesto Nitroalqueno del  $\alpha$ -Tocoferol (NA- $\alpha$ -TOH) protegido bajo patente internacional en Estados Unidos [22]. Por otro lado, en nuestro grupo también diseñamos y sintetizamos el derivado hidrosoluble de este compuesto denominado Nitroalqueno del Trolox metil éster (NATxME), el cual consiste en la misma estructura cromanólica modificada del NA- $\alpha$ -TOH, pero en lugar de la cola isoprenoide (cadena hidrocarbonada) tiene un grupo éster metílico. Las estructuras moleculares de ambos compuestos son mostradas en la Figura 19.



**NATxME**

Nitroalqueno Trolox-metil-éster  
*6-hidroxi-2,7,8-trimetil-5-nitroetenil-cromancarboxilato de metilo*



**NA- $\alpha$ -TOH**

Nitroalqueno  $\alpha$ -tocoferol  
*5-nitroetenil-2,7,8-trimetil-2-[4,8,12-trimetiltridecil]-3,4-dihidrocroman-6-ol*

**Figura 19. Estructuras moleculares de los nitroalquenos de 2ª generación análogos de la Vitamina E.** Se muestra en ambos la sigla arriba en negrita, el nombre en segundo lugar y abajo en letra itálica el nombre IUPAC.

La vitamina E es liposoluble y una vez absorbida en el intestino es transportada hacia el hígado por los quilomicrones y ahí es captada por proteínas transportadoras, siendo una de las más importantes la Proteína Transportadora de  $\alpha$ -tocoferol (“alpha tocopherol transfer protein”,  $\alpha$ -TTP) debido a que lo une con alta afinidad y especificidad. Luego es distribuida hacia los tejidos por la LDL y una vez allí es reconocida por transportadores presentes en las células como la PLTP (Phospholipids Transfer Protein) y la proteína de unión a tocoferoles (“Tocopherol-binding Proteins” TAPs) para su incorporación intracelular [142].

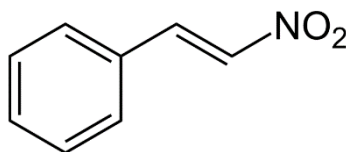
La idea detrás del diseño y síntesis de estos compuestos fue desarrollar una nueva estrategia farmacológica para el tratamiento de la aterosclerosis (y otras enfermedades inflamatorias relacionadas), diseñada a partir del conocimiento del rol patogénico crítico que juegan la LDL y la respuesta inflamatoria crónica vascular en la aterogénesis. Esta novedosa estrategia farmacológica parte de la premisa que los nitroalquenos análogos del tocoferol serán incorporados en las lipoproteínas durante el metabolismo normal de las mismas y debido a la

presencia del tocoferol en la molécula, el que es selectivamente reconocido por diferentes receptores involucrados en el metabolismo de la Vitamina E. Por otro lado, el raciocinio de nuestra estrategia farmacológica hipotetiza que una vez en la LDL, esta partícula lo transportará a todo el organismo, incluyendo a las lesiones ateroscleróticas donde el compuesto híbrido ejercerá las propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas de los nitroalquenos y antioxidantes de la vitamina E.

Además de su ventaja metabólica, otra ventaja potencial de estos nitroalquenos derivados del tocoferol, es que a diferencia de los ácidos grasos nitrados no sufren  $\beta$ -oxidación y podrían seguir la ruta metabólica de la Vitamina E, facilitando la llegada del compuesto a los tejidos.

### **$\beta$ -Nitro-estireno**

Nitroalqueno y nitrovinilo son términos sinónimos que sin embargo se usan preferentemente en la literatura biomédica y química, respectivamente. Este nitroalqueno se trata de un compuesto aromático que se encuentra disponible comercialmente. Su estructura es simplemente un benceno con un grupo nitroalqueno como sustituyente (Figura 20).

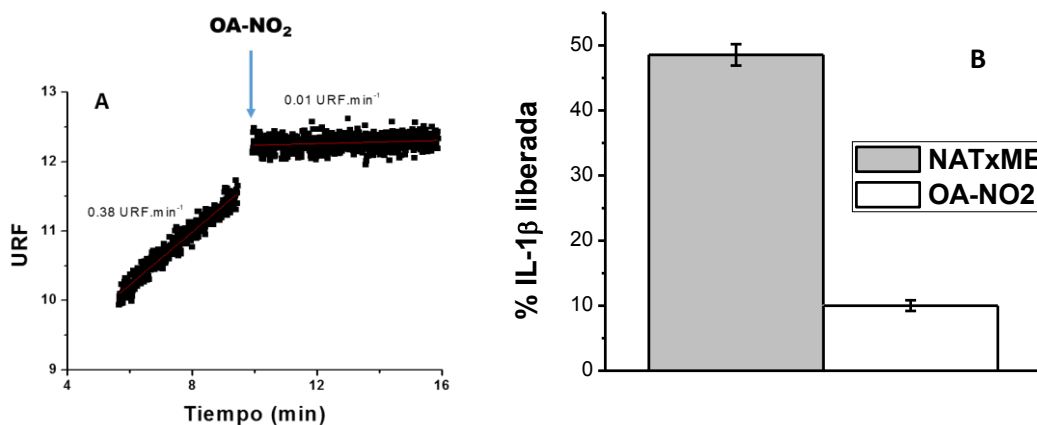


**Figura 20. Estructura molecular del  $\beta$ -nitro-estireno.** Nombre IUPAC, *2-nitro-vinil-benceno*. Masa molar: 149.15 g.mol<sup>-1</sup>.

La inclusión de este compuesto en los experimentos de esta tesina se debe a que él y un derivado, el 3,4-metilendioxi- $\beta$ -nitro-estireno, mostraron ser capaces de inhibir al inflamasoma NLRP3 [143]. Se ha reportado que estos nitroalquenos bloquean la oligomerización de ASC dependiente de NLRP3 sin afectar el eflujo de potasio [143]. Existen múltiples reportes sobre una variada gama de efectos biológicos algunos nitroalquenos derivados del  $\beta$ -nitro-estireno. Entre ellos mencionamos la inhibición de la señalización inducida por unión de ligandos a TLR4 mediada por TRIF [144], unión a tubulina y bloqueo del ciclo celular [145] y la inhibición de la despolimerización de tubulinas [146].

## Posibles blancos de nitroalquenos sobre el inflamasoma NLRP3

La inhibición directa ocurriría sobre cualquiera de los componentes principales o accesorios del inflamasoma NLRP3. Un primer y claro blanco hipotético es la enzima Caspasa-1 debido a que su sitio catalítico se compone de la cisteína 285 altamente reactiva y la histidina 237 que modula dicha reactividad [43]. Debemos señalar que consideramos a Caspasa-1 como el blanco directo preferencial de los nitroalquenos en base a consideraciones cinéticas: el blanco principal es aquel que siendo funcionalmente crítico, reacciona más rápido con el nitroalqueno. El bloqueo de la Cys285 en Caspasa-1 es un mecanismo bien estudiado de inhibición enzimática [43, 147]. La reacción de Caspasas con peróxido de hidrógeno, el cual es un oxidante que reacciona con tioles, muestra una pérdida de actividad y se reportó una constante de velocidad de segundo orden  $k^{\text{pH } 7.25} = 750 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para la reacción entre Caspasa-3 y peróxido de hidrógeno [148]. Dicha inhibición bloquearía la actividad proteolítica y así impediría la generación de IL-1 $\beta$  e IL-18 activas. Experimentos preliminares *in vitro* realizados en nuestro laboratorio con OA-NO<sub>2</sub> reflejaron que la actividad de Caspasa-1 es inhibida por este nitroalqueno, pero no hubo ningún efecto con los derivados de la vitamina E (Figura 21).



**Figura 21. Medida de fluorescencia para el estudio de la actividad Caspasa-1.** A. Se preparó una dilución de Caspasa-1 recombinante ( $1.54 \times 10^{-3}$  UE/ $\mu\text{L}$ ) y se utilizó sustrato fluorescente de un kit para la medida de actividad Caspasa-1 (WEHD-AFC 1)  $38.46 \mu\text{M}$ , en un buffer de reacción que también pertenecía al kit. No se agregó DTT. Una vez preparada la mezcla de reacción se midió fluorescencia (excitación  $\lambda = 400 \text{ nm}$ , emisión  $\lambda = 505 \text{ nm}$ , 600 V,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). A los 10 minutos se agregó OA-NO<sub>2</sub>  $10 \mu\text{M}$ . B. Se diferenciaron células THP-1 a macrófagos y se estimularon con LPS ( $250 \text{ ng/mL}$ ), se incubaron 3 horas y luego se adicionó ATP ( $5 \text{ mM}$ ) dejando 45 minutos más. Además las células fueron tratadas con NATxME o OA-NO<sub>2</sub> ( $10 \mu\text{M}$ ) aplicado junto al ATP. Por último se guardó el sobrenadante y se cuantificó IL-1 $\beta$  por ELISA.

Por tanto, si el NATxME puede inhibir al inflamasoma (Fig. 21B), ello no debería ocurrir por acción directa sobre Caspasa-1.

Además, fue reportado que un compuesto nitroalqueno derivado del beta nitroestireno, el 3,4-metilendioxi-beta-nitro-estireno inhibe la activación del

inflamasoma NLRP3 [143]. En el mismo trabajo se reporta que el NLRP3 sufre modificaciones en presencia del nitroalqueno y se propone que el 3,4-metilendioxi-beta-nitro-estireno inhibe el ensamblado del inflamasoma mediante esta modificación. NLRP3 puede ser un blanco para nitroalquenos debido a que esta proteína (Q96P20) contiene en su estructura primaria 45 cisteínas. Resultados cristalográficos indican que un par de ellas formaría un puente disulfuro *in vitro* (Cys8 y Cys108) [149].

Por otra parte, se han realizado trabajos con una serie de compuestos electrófilos que al igual que los nitroalquenos hacen reacción de Michael y se reportaron algunos de ellos como antipiroptóticos inhibiendo la actividad enzimática de Caspasa-1 [150], pero no se deja en claro el blanco específico en el cual podrían actuar para bloquear el ensamblado del inflamasoma NLRP3 y por ende inhibir la actividad Caspasa-1 y la piroptosis.

***Las deubiquitininas cumplen un rol regulador importante en la actividad del inflamasoma, formando parte del cebado no transcripcional*** [60, 62] y posiblemente puedan ser un blanco preferencial de nitroalquenos debido a que algunas de ellas y particularmente la reportada BRCC3 que removería ubiquitina de NLRP3 son metaloproteasas [61]. Se ha reportado que la presencia de centros metálicos en proteínas favorece la reactividad con los nitroalquenos, como ocurrió con la proteína PknG de *Mycobacterium tuberculosis* donde el OA-NO<sub>2</sub> reaccionó con cisteínas coordinadas por un átomo de hierro [151] y con la Xantina Oxidasa [152].

Lo mencionado anteriormente se refiere a posibles blancos de los nitroalquenos no asociados al cebado transcripcional, pero también perfectamente puede ocurrir que estos compuestos inhiban al inflamasoma secundariamente a la inhibición de NF-κB, lo cual ya ha sido reportado [117] y se trata de una vía involucrada directamente en el cebado transcripcional. Además, los nitroalquenos podrían actuar sobre el cebado no transcripcional (e independiente de NF-κB).

## 2.4. Hipótesis

***En base a la relevancia de los inflamasomas en la regulación de la inflamación y la potencia antiinflamatoria de los nitroalquenos, así como a resultados previos del grupo (no publicados) y de la literatura [143], hipotetizamos que los nitroalquenos lipídicos regulan al inflamasoma NLRP3.***

En base a la bioquímica y reactividad química de los nitroalquenos nos planteamos como hipótesis que estos compuestos son capaces de formar aductos con cisteínas y/o histidinas críticas de componentes del inflamasoma o de sus reguladores y así modular la liberación de IL-1β y otros procesos pro-inflamatorios asociados a la activación del inflamasoma NLRP3. ***De esta forma, los nitroalquenos serían moduladores de la inflamación al regular en forma directa o indirecta la inhibición del ensamblado y/o la activación del***

***inflammasoma. Sin embargo, la presencia de residuos altamente reactivos de cisteína en componentes del inflammasoma y sus reguladores, nos hacen especular que el efecto de los nitroalquenos sobre el inflammasoma se deba a acciones indirectas, particularmente acciones sobre el sistema ubiquitina proteasoma (SUP).***

## **2.5. Estrategia de la investigación.**

***Nos enfocaremos en describir los efectos que la exposición a nitroalquenos produce sobre macrófagos estimulados para liberar IL-1 $\beta$ .*** En este trabajo se utilizará como modelo celular la línea THP-1 que consiste en monocitos humanos derivados de un paciente con leucemia monocítica aguda. Los THP-1 se diferencian a macrófagos mediante el agregado de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) [153]. Aquí se estimulará la activación del inflammasoma NLRP3 usando como primera señal LPS y segunda señal ATP y utilizando como evidencia la detección en forma cuantitativa de IL-1 $\beta$  liberada al medio por los macrófagos [154], así como también la viabilidad y muerte celular de estos luego de todo el tratamiento [155]. Se tomará como variables la concentración/cantidad de nitroalqueno adicionado al medio y el momento en que éste se aplique, ya sea junto a la primera o segunda señal. Por otro lado, se estudiará la citotoxicidad de estos compuestos sobre las células THP-1 con el fin de obtener un control mostrando que estos no causan muerte celular.

## **2.6. Objetivos**

### **2.6.1. Objetivo general**

Estudiar si los nitroalquenos derivados del ácido nitro oleico, del  $\alpha$ -tocoferol y análogos modulan al inflammasoma NLRP3 y/o de sus procesos de regulación.

### **2.6.2. Objetivos específicos**

- Estudiar en forma cuantitativa la liberación al medio de IL-1 $\beta$  en células THP-1 tratadas con nitroalqueno variando el momento de aplicación (cebado versus ensamblado).
- Estudiar la liberación de IL-1 $\beta$  de la misma manera que en el objetivo anterior pero de manera dependiente de la dosis aplicada de nitroalquenos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivo celular, activación con LPS/ATP y tratamiento con nitroalquenos a las células THP-1**

Las células THP-1 (ATCC TIB-202) fueron mantenidas en cultivo a 37 °C en aire suplementado con 5% de CO<sub>2</sub> en un medio líquido completo que consiste en 89 % RPMI 1640 con glutamina (Invitrogen) suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal (SBF) (Pan Biotech) y 1% de antibiótico PenStrep (Penicilina y estreptomicina) (Invitrogen). La densidad de la suspensión celular se mantuvo entre 200.000 y 1x10<sup>6</sup> células por mL.

Al tratarse esta línea de monocitos humanos para la realización de los ensayos se necesitó diferenciarlos a macrófagos. Para los experimentos con estas células se comenzó realizando un conteo de las mismas para luego levantarlas y centrifugarlas a 300 x g, 2 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en medio 89% RPMI 1640 con glutamina, 10% SBF y 1% PenStrep, hasta el volumen que corresponda para tener una densidad celular de 2x10<sup>6</sup> células/mL. Luego se adicionó phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Sigma Aldrich) 200 nM y se sembraron en placas de 48 pocillos 150 µL con 300.000 células por pocillo. En algunos de los experimentos dosis respuesta del NATxME (Sintetizado en nuestro laboratorio) [22] se trabajó con placas de 96 pocillos (75 µL con 150.000 células por pocillo) y en los ensayos de citotoxicidad del NATxME se utilizó placas de 24 (300 µL con 600.000 células por pocillo). Una vez sembradas las células en la placa se incubaron por 48 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Luego de transcurrido el tiempo de diferenciación, las células fueron estimuladas agregando en primer lugar LPS (Sigma Aldrich) 250 ng/mL en medio 97% RPMI 1640, 2% SBF y 1% PenStrep. Se incubó durante 3 horas a iguales condiciones que en la diferenciación y por último se adicionó ATP (Abcam) 5 mM a pH 7.4 en medio 99% RPMI 1640, 1% PenStrep. Se incubaron 45 minutos más en las mismas condiciones y luego se aspiró el medio, se centrifugó a 13.000 rpm, 5 minutos y se guardó el sobrenadante a -20°C que luego fue utilizado para la cuantificación de IL-1β.

Para el tratamiento de las células THP-1 con nitroalquenos se utilizaron los siguientes compuestos: OA-NO<sub>2</sub>, NATxME y β-NO<sub>2</sub>-E (Sintetizado en nuestro laboratorio). Se hicieron substocks en DMSO 100% (Sigma Aldrich) para luego adicionarlos a las células a la concentración final correspondiente de cada experimento en una solución en medio líquido junto con el LPS o junto al ATP, siempre dejando un porcentaje final de DMSO de 0.5%.



### 3.2. Cuantificación de IL-1 $\beta$ por ELISA

La cuantificación de IL-1 $\beta$  secretada por las células THP-1 al medio se realizó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA). Para ello contamos con un kit de ELISA para cuantificar IL-1 $\beta$  humana (BD catálogo n° 557953) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Una variante que añadimos a este protocolo fue el sistema de revelado que lo hicimos con una dilución de: 9 mL de agua miliQ; 1 mL de buffer acetato 1.1 mM, pH 5; 86.5  $\mu$ L de tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Aldrich) 6 mg/mL y por último 10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%. Para el procesamiento de datos se ajustó la curva de calibración estándar a una función no lineal logística (4-parameter logistic, 4PL), procedimiento obtenido de la literatura [156].

### 3.3. Citotoxicidad y sobrevida celular por citometría de flujo

Se realizaron experimentos usando células THP-1 diferenciadas a macrófagos sin estimular (sin LPS y ATP) para evaluar la citotoxicidad del NATxME y las subrutinas de muerte, al menos bajo el criterio clásico de permeabilización de la membrana celular y exposición de fosfatidilserina. Para ello, se diferenciaron las células en placas de 24 pocillos y luego se trataron con distintas concentraciones de NATxME en medio 99% RPMI 1640 con glutamina y 1% PenStrep. Se incubaron 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y luego se procedió a levantar las células adheridas con Tripsina-EDTA (Invitrogen). Primero se guardó el medio en un tubo en hielo y se lavaron las células con 500  $\mu$ L de PBS frío guardándolo luego en el tubo con el resto del medio que fue removido. Se agregó 500  $\mu$ L de Tripsina-EDTA incubando entre 5 y 10 minutos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (observando a los 5 minutos en el microscopio). Luego de que se despegaron las células se neutralizó con 500  $\mu$ L de medio celular con 10% de SBF y se guardó en el mismo tubo donde se colocó el sobrenadante y PBS extraído después del lavado. Se centrifugó el contenido del tubo a 300 x g 5 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en 120  $\mu$ L buffer Anexina 1X (HEPES pH 7.4, NaCl y CaCl<sub>2</sub>) en frío. Para la tinción en las condiciones que se marcaron con Anexina V, se adicionó a esto último 2  $\mu$ L de Anexina V-Alexa 488 (Life Technologies) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Luego de transcurrido el tiempo se agregó 300  $\mu$ L de buffer Anexina mezclándose y manteniéndose en hielo. Por último todas las condiciones se midieron en el citómetro de flujo (CyAN) agregando previamente 2  $\mu$ L de Ioduro de Propidio 250  $\mu$ g/mL, excitando con láser a 488 nm y detectando la fluorescencia del Alexa 488 de la Anexina V con filtro 530/40 y el Ioduro de propidio con 613/20. Para el caso del experimento de sobrevida con células estimuladas con LPS y ATP, el procedimiento de estimulación fue similar al descrito en la sección 3.1 pero el tiempo de incubación entre el LPS y el ATP fue de 4 horas. En este caso las condiciones fueron células

estimuladas con LPS y ATP adicionándoles el vehículo (DMSO 0.5%) junto al ATP, control positivo de apoptosis con staurosporina 50  $\mu\text{M}$ , tratamiento con NATxME 20 y 100  $\mu\text{M}$  en células sin estimular, células sin estimular (Control negativo) y macrófagos estimulados con LPS y ATP tratados con NATxME 10  $\mu\text{M}$  adicionado junto con el ATP. El protocolo de tripsinización de las células y tinción fue igual que con las células sin estimular. En ambos experimentos se tomó un pool de todas las muestras para realizar los controles de autofluorescencia y simple marcado de Ioduro de propidio y Anexina V, además de un control con staurosporina 50  $\mu\text{M}$ .

### 3.4. Procesamiento de datos

Para la medición de IL-1 $\beta$  liberada se obtuvieron datos por triplicado y para graficar se utilizó el valor promedio y desvío estándar como error asociado.

En los ensayos de efectos sobre la liberación de IL-1 $\beta$  dependiente de la dosis de NATxME, el procesamiento de datos consistió en graficar  $[IL-1\beta]_{liberada}$  vs  $\log [NATxME]$  y ajustar a una función dosis respuesta simple (Ec. 4.1). Utilizando el programa Origin 8 se estimó la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ), valor relacionado directamente con la Ec. 1 mediante la Ec. 2.

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{1 + 10^{(LOGx0 - x)p}}$$

**Ecuación 1. Función dosis respuesta simple.** Función utilizada para ajustar los datos obtenidos de los experimentos mediante el programa Origin 8. A1= asíntota inferior; A2 = asíntota superior; LOGx0 = centro (logaritmo del valor de x en el punto de inflexión) y p = pendiente. La representación gráfica de esta función es de forma sigmoidea.

$$IC_{50} = 10^{\log(x_0)}$$

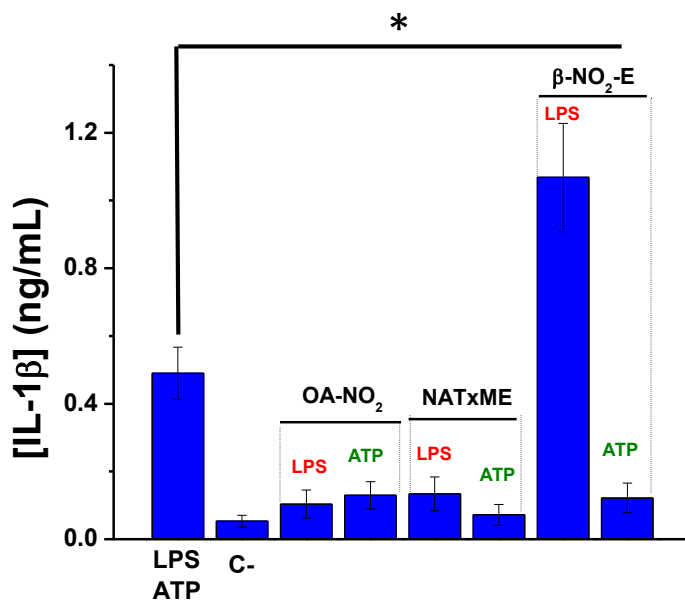
**Ecuación 2.** Relación entre el valor  $IC_{50}$  y  $x_0$  derivado de ajustar la ecuación de la función dosis respuesta simple

Para los experimentos realizados por citometría de flujo se hicieron condiciones por triplicado y se obtuvieron los distintos datos de porcentaje de células con el programa Summit v4.3. En los ensayos de citotoxicidad del NATxME el procesamiento fue idéntico a los ensayos dosis respuesta de NATxME e IL-1 $\beta$  liberada, graficando aquí el porcentaje de células vivas (IP $\cdot$ AV $\cdot$ ), obteniéndose así la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) (Ec. 1 y 2).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensayos con distintos nitroalquenos variando el momento de aplicación

En primer lugar nos planteamos en este trabajo analizar los efectos de varios compuestos nitroalquenos (NA) sobre el inflamasoma. Se realizó un experimento con cuatro de ellos: ácido nitro-oleico (OA-NO<sub>2</sub>), NA-trolox-metil-éster (NATxME) y β-nitro-estireno (β-NO<sub>2</sub>-E). En la Fig. 22 se muestra que los nitroalquenos OA-NO<sub>2</sub> y NATxME disminuyeron significativamente la liberación de IL-1β (Figura 22).



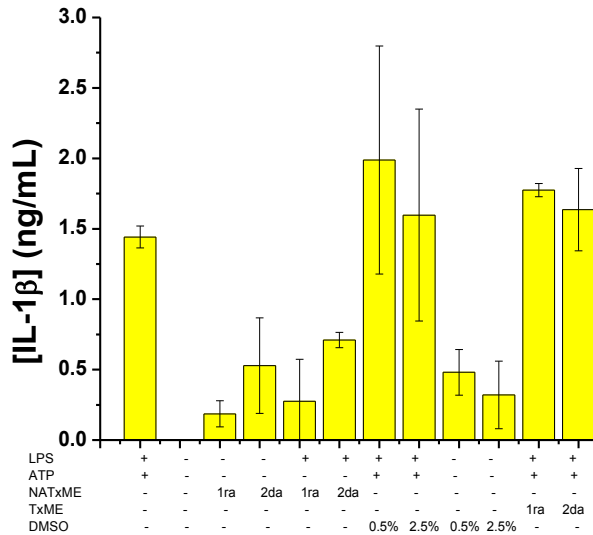
**Figura 22. Estudio del efecto de distintos nitroalquenos aplicados junto a la primera o segunda señal.** Las células THP-1 se cultivaron y diferenciaron. Luego se agregó LPS 250 ng/mL con o sin NATxME, OA-NO<sub>2</sub> o β-NO<sub>2</sub>-E 10 μM. Se incubó 3 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y luego se adicionó ATP 5 mM o ATP con o sin NATxME, OA-NO<sub>2</sub> o β-NO<sub>2</sub>-E 10 μM. Se incubó 45 minutos en las mismas condiciones y luego se guardó el sobrenadante al cual se le midió IL-1β por ELISA. Control + = LPS y ATP, C- = Solo medio celular. El experimento es n = 2 y en cada uno las condiciones se hicieron por triplicado. Los valores están mostrados como promedio ± error estándar de la media. Se analizaron los datos en forma estadística aplicando ANOVA con posterior prueba Sidakholm.

El β-NO<sub>2</sub>-E muestra también un efecto inhibitorio cuando se aplica junto con el ATP, pero aplicado junto con el LPS no se observó inhibición, sino que se muestra un significativo efecto estimulador.

Decidimos no realizar experimentos con el NATOH en este modelo celular de modulación del inflamasoma, por la razón de que se debe optimizar su vehiculización debido a su alta hidrofobicidad. Queda pendiente su aplicación luego de que sea incorporado *in vitro* a partículas de LDL [157] y continuamos nuestro trabajo con el NATxME.

El NATxME tiene una solubilidad baja en solventes acuosos por ende las soluciones stocks y concentradas de trabajo se preparan en DMSO. Se realizaron ensayos controles y exploratorios para evaluar: 1) el efecto del DMSO como vehículo del compuesto de interés sobre la liberación de IL-1β al aplicarlo junto al LPS, 2) el efecto del trolox-metil-éster (TxME, un control negativo que permitiría mostrarnos si la disminución de la secreción de IL-1β ocurre solamente con la

presencia del grupo funcional nitroalqueno; y 3) los efectos del NATxME cuando no se estimulan las células con LPS y ATP o se estimulan parcialmente solo con LPS (Fig. 23).



**Figura 23. Controles de los efectos del DMSO y trolox-metil-éster (TxME) y comparación con efectos del NATxME.** Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos. Luego, se trataron con LPS 250 ng/mL con o sin NATxME 10 μM, TxME 10 μM o DMSO 0.5% o 2.5% en medio RPMI 1640 sin SBF. Las células se incubaron por 3 hs a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego, se agregó ATP 5 mM y/o NATxME 10 μM o TxME 10 μM en medio RPMI 1640 sin SBF. Se incubó 45 minutos en las mismas condiciones y luego se guardó el sobrenadante al cual se le cuantificó IL-1β presente por ELISA. Cada condición se hizo por triplicado expresando los valores como promedio ± desvío estándar.

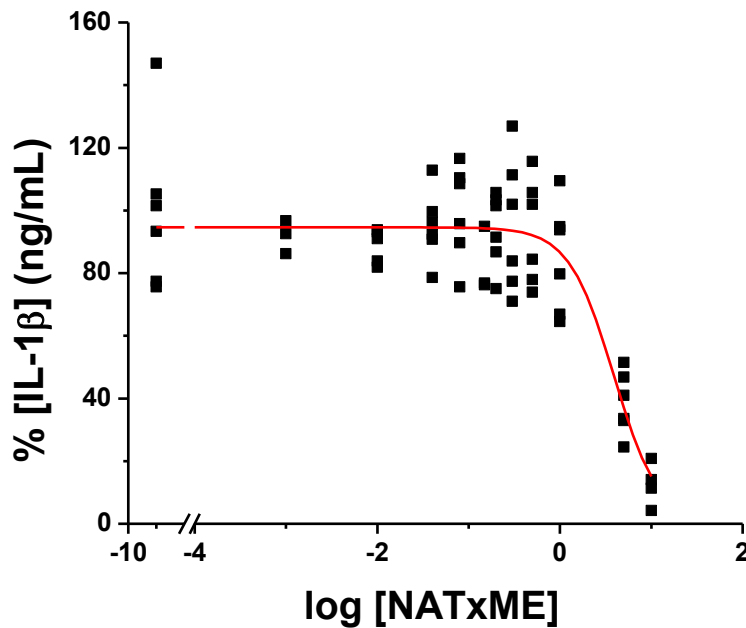
Respecto al DMSO cuando las células no fueron estimuladas con LPS y ATP pero incubadas con DMSO, hubo un leve aumento en la concentración medida de IL-1β liberada al sobrenadante comparado con el control correspondiente, pero que es aproximadamente 3.6 veces inferior con respecto al control positivo y no se observan diferencias significativas al aumentar el porcentaje de DMSO. *Dado que no estudiamos el efecto del DMSO sobre la reacción colorimétrica de lectura del ELISA, ni sobre la reacción de TMB con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por la HRP, no podemos descartar interferencias con el ensayo y por ende no afirmamos que el DMSO estimule la liberación de IL-1β. Sin embargo, queda claro que afecta el resultado.*

En lo que respecta al TxME, el derivado del Trolox sin grupo nitroalqueno, al aplicarlo junto a la primera señal o a la segunda no mostró cambios respecto al control positivo en presencia de una cantidad equivalente de DMSO (Fig. 23). El efecto del TxME en ausencia de estimulación no fue estudiado.

El NATxME aplicado a células sin estimular o tratadas con NATxME y LPS provocó una aparente liberación de IL-1β (Fig. 23).

#### 4.2. Cambios en la liberación de IL-1 $\beta$ inducidos por la exposición a NATxME en conjunto con la primera señal.

A continuación estudiamos cuantitativamente el efecto de los nitroalquenos sobre el inflamasoma NLRP3 al variar la dosis y el momento de aplicación del NATxME. En primer lugar se muestran dos experimentos donde el NATxME es aplicado junto a la primera señal (LPS) (Fig. 24). En la Tabla 1 se muestra el resultado del análisis conjunto de todos los datos de inhibición.



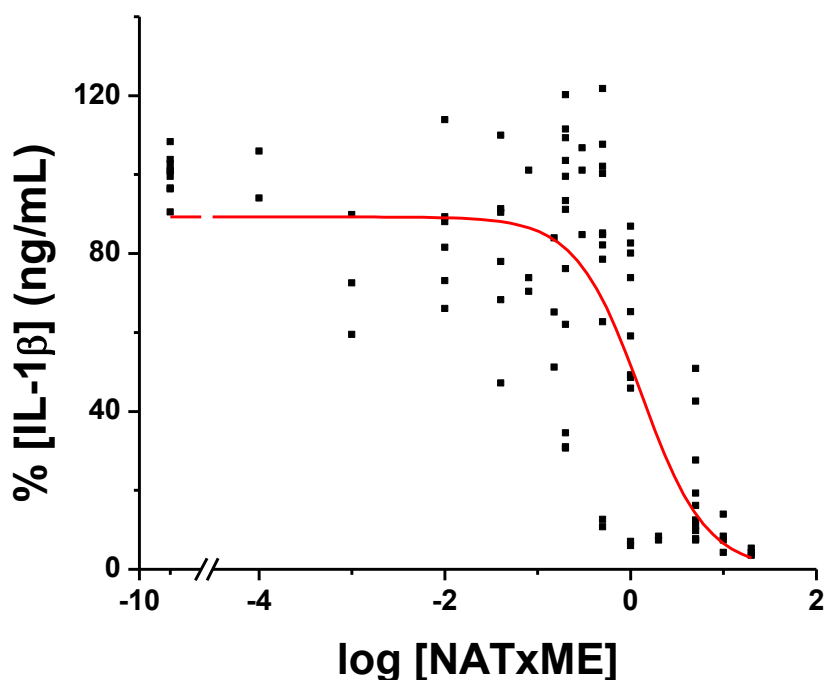
**Figura 24. Curva dosis respuesta del NATxME aplicado sobre la primera señal.** Se cultivaron y diferenciaron las células THP-1. Se aplicó la primer señal (LPS 250 ng/mL) junto a concentraciones crecientes de NATxME en DMSO 0.5% y medio RPMI 1640 libre. En (A) se aplicaron concentraciones de NATxME entre 0.001 y 10  $\mu$ M. En la condición sin nitroalqueno, solo se adicionó DMSO 0.5% junto al LPS. Se incubó 3hs a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y luego se agregó ATP 5 mM incubándose 45 minutos en iguales condiciones. Se guardó el sobrenadante y se cuantificó la IL-1 $\beta$  por ELISA. Cada condición se hizo por triplicado expresando la cantidad de IL-1 $\beta$  como porcentajes respecto al control positivo. Además se hizo en ambos un control negativo sin LPS, ATP ni NATxME en el que no se detectó IL-1 $\beta$  (no mostrado).

R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) (Rango)
0.73095	3.89 (3.33-4.55)

**Tabla 1.** Datos obtenidos de los ajustes dosis respuesta simple de experimentos con tratamiento de NATxME sobre la primera señal. El IC<sub>50</sub> es expresado como el valor junto a su rango de error, este último calculado de la siguiente forma: IC<sub>50</sub> (10<sup>(log x<sub>0</sub> - error)</sup> - 10<sup>(log x<sub>0</sub> + error)</sup>). Los valores de IC<sub>50</sub> y log x<sub>0</sub> con su respectivo error son proporcionados por el software.

#### 4.3. Cambios en la liberación de IL-1 $\beta$ inducidos por la exposición a NATxME en conjunto con la segunda señal.

Al igual que en el resultado anterior, el NATxME se aplicó sobre las células THP-1 diferenciadas a macrófagos y estimuladas, pero esta vez se aplicó junto a la segunda señal: ATP (Figura 25).



**Figura 25. Curva dosis respuesta del NATxME aplicado sobre la segunda señal.** Se cultivaron y diferenciaron las células THP-1. Luego se aplicó LPS 250 ng/mL en RPMI 1640 sin SBF y se dejaron incubando por 3 hs. a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Por último se aplicó ATP 5 mM o ATP con concentraciones variables de NATxME. Se incubó 45 minutos en iguales condiciones y se guardó el sobrenadante al que se le cuantificó IL-1 $\beta$  por ELISA. Las concentraciones de NATxME fueron entre 0.001 y 10  $\mu$ M. A la concentración 0 (Control +) se le adicionó DMSO 0.5% junto al ATP. Se realizó además un control positivo sin DMSO (solo LPS y ATP) y un control negativo. Cada condición se hizo por triplicado expresando la cantidad de IL-1 $\beta$  como porcentajes respecto al control positivo.

En este caso el experimento fue  $n = 4$ . Los IC<sub>50</sub> hallados se muestran en la Tabla 2 junto al resto de los parámetros obtenidos del ajuste dosis respuesta simple. En el experimento mostrado en la Fig. 25A no se mantuvo constante el porcentaje de DMSO superando en algunas condiciones el 1%. Otro inconveniente es que la zona donde está la asíntota superior y la zona previa al punto de inflexión no tiene puntos debido a que la concentración más baja inhibió prácticamente el 50 %.

R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) (Rango)
0.57589	1.29 (1.04 – 1.60)

**Tabla 2.** Datos obtenidos de los ajustes dosis respuesta simple de experimentos con tratamiento de NATxME sobre la segunda señal. El IC<sub>50</sub> es expresado como el valor con su rango de error asociado, este último calculado de la siguiente forma: IC<sub>50</sub> (10<sup>(log x0 - error)</sup> – 10<sup>(log x0 + error)</sup>). Los valores de IC<sub>50</sub> y log x0 con su respectivo error son proporcionados por el software.

## 5. DISCUSIÓN

A partir de los experimentos realizados nos enfocamos en discutir e interpretar los principales resultados originales obtenidos por nuestro grupo en relación a esta tesina, los cuales son enumerados a continuación:

- En primer lugar, resultados previos a esta tesina indicaron que el OA-NO<sub>2</sub> pero no el NATxME, inhibe potentemente la actividad de la cisteína proteasa Caspasa-1; mientras que ambos inhibían al inflamasoma.
- Todos los nitroalquenos que utilizamos inhibieron la liberación de IL-1β mediada por el inflamasoma NLRP3 cuando fueron aplicados junto con la segunda señal y todos, excepto el β-NO<sub>2</sub>-estireno, inhibieron cuando fueron aplicados junto a la primera señal.
- *El NATxME inhibe de forma dosis dependiente la liberación de IL-1β mediada por el inflamasoma NLRP3, siendo el efecto más potente cuando es aplicado junto a la segunda señal.*

### **Inhibición de Caspasa-1 por Nitroalquenos: Un evento posible pero aparentemente innecesario para la inhibición del inflamasoma por el NATxME**

Experimentos previos a esta tesina, en los cuales trabajamos realizando ensayos de actividad de la enzima Caspasa-1 recombinante, mostraron que el OA-NO<sub>2</sub> inhibe potentemente la actividad de esta cisteína proteasa (Fig. 21), mientras que no observamos inhibición por el NATxME (no mostrado). Razonamos que de confirmarse la inhibición del inflamasoma NLRP3 por ambos compuestos, esto sugeriría que Caspasa-1 no sería el único blanco de los nitroalquenos. *En otras palabras, la inhibición de Caspasa-1 por nitroalquenos sería un evento posible pero probablemente prescindible para la inhibición observada del inflamasoma cuando el NATxME se administra junto a la segunda señal.* Es en ese momento, durante el ensamblado secundario a la incubación con ATP, en el que ocurre la mayor parte de la activación de Caspasa-1, a juzgar por los niveles de liberación de IL-1β cuando se expone a ATP vs. cuando éste es omitido [158].

Resultados preliminares de nuestro grupo muestran que el  $\text{OANO}_2$  es ligeramente más potente que el NATxME inhibiendo el inflamasoma (Fig. 21B). Como dijimos antes, el grado de confianza para una afirmación de tal tipo no lo hemos determinado aún y una forma de estimarla podría surgir de comparar las potencias de inhibición de Caspasa-1 y del inflamasoma NLRP3 por OA- $\text{NO}_2$  y por NATxME. Esto permitiría preguntarnos qué tan probable es observar los efectos señalados si el único efecto inhibitorio ocurre a nivel de la actividad de Caspasa-1. Seguramente, estaríamos asumiendo que las inhibiciones enzimáticas en el tubo de ensayo y en las células son proporcionales. Si bien no esperamos que el NATxME sea un inhibidor más potente de Caspasa-1 en células que en el tubo de ensayo, no lo podríamos descartar. El hecho ya señalado de que el OA- $\text{NO}_2$  inhibe la liberación de IL-1 $\beta$  con aparente mayor potencia que el NATxME se reconcilia con nuestra hipótesis, porque sería de esperar que este compuesto inhiba tanto la activación de Caspasa-1 por el inflamasoma como su propia actividad. *He* y *Col.* reportan que los nitroalquenos estudiados por ellos inhiben el inflamasoma NLRP3 por reacción directa con las moléculas de NLRP3 [143], es decir que inhibirían el proceso de activación de Caspasa-1 al impedir el ensamblaje de inflamasomas. Sin embargo, *He* y *Col.* no evalúan otros dos aspectos. Por un lado, no estudian si los nitroalquenos utilizados por ellos inhiben directamente a Caspasa-1; mientras que por otro lado, no analizan si forman aductos con ASC e inhiben su capacidad de autoensamblar o ensamblarse con NLRP3 y procaspasa-1 [143]. ¿Es posible que los nitroalquenos estudiados por *He* y por nosotros estén todos actuando sobre Caspasa-1 activa y no sobre otros blancos? ¿Cuáles podrían ser los blancos adicionales de los nitroalquenos? ***Estas preguntas están abiertas aún y serán abordadas durante mi tesis de posgrado.***

### **Deubiquitininas como otro posible blanco de los nitroalquenos que mediarían la inhibición del inflamasoma**

Una forma de evaluar la respuesta de los macrófagos ante estímulos como LPS y ATP, señales que promueven el ensamblado del inflamasoma NLRP3, es mediante la detección de las citoquinas que son liberadas (IL-1 $\beta$  e IL-18). Hasta el momento no se ha estudiado cabalmente el mecanismo de liberación de IL-1 $\beta$ , pero si se sabe que es dependiente del inflamasoma y de Caspasa-1 [42, 43]. **En este trabajo nosotros nos propusimos evaluar el efecto de diferentes nitroalquenos sobre la producción de IL-1 $\beta$  por macrófagos activados.** En particular OA- $\text{NO}_2$  y NATxME claramente disminuyeron la liberación de esta al medio, lo que parece indicar que ***estos nitroalquenos son capaces de ingresar en las células y bloquear el ensamblado del inflamasoma de manera directa, ya sea reaccionando con NLRP3, ASC o procaspasa-1; o de manera indirecta reaccionando con blancos aún no determinados.*** Por otro lado, estudiamos el efecto del  $\beta$ - $\text{NO}_2$ -estireno. Este nitroalqueno de síntesis ejerce un efecto complejo sobre la actividad del



inflammasoma NLRP3 (Fig. 22). Cuando se aplica junto con el ATP se observa un efecto inhibitorio ([143] y Fig. 22), pero al administrarlo junto con el LPS aparentemente no inhibe (Fig. 22). Dado que no esperamos efectos estimuladores sobre el cebado por acciones directas sobre NF- $\kappa$ B, ya que previamente se ha demostrado que los nitroalquenos son inhibidores de este factor de transcripción [116, 117]; o sobre el ensamblado a nivel de NLRP3 de acuerdo a los estudios [143], **postulamos que los nitroalquenos podrían estar actuando sobre uno o más blancos aún indeterminados**. En este sentido y tomando en cuenta los roles contrarreguladores de A20 [76] y de BRCC3 [60-62] sobre el cebado transcripcional y no transcripcional, *postulamos que las deubiquitininas, cisteína proteasas o metaloproteasas (blancos preferenciales de los nitroalquenos [103, 151, 152], podrían ser un blanco relevante de los nitroalquenos en la regulación del inflammasoma tanto durante el cebado como quizás durante el ensamblado*. Esta hipótesis también será objeto de estudio de mi tesis de Posgrado.

### **Inhibición rápida postranscripcional del inflammasoma NLRP3 por Nitroalquenos**

Enfocando ahora nuestros estudios en los nitroalquenos derivados de la vitamina E, decidimos continuar trabajando con el NATxME por su fácil manejo y solubilidad.

**Los experimentos de dosis respuesta con este compuesto arrojan resultados de un claro efecto inhibitorio dependiente de la dosis**. Al aplicar NATxME junto a la primera señal inhibe al 50% la liberación de IL-1 $\beta$  en un rango entre 2.42 y 4.42  $\mu$ M. El tratamiento con NATxME junto a la segunda señal genera un resultado similar, pero en este caso se inhibe la liberación de IL-1 $\beta$  en un 50% en un rango de concentraciones entre 0.74 y 1.35  $\mu$ M. Por tanto, el IC<sub>50</sub> al aplicar el nitroalqueno junto a la segunda señal es aproximadamente 3 veces menor que cuando se aplica junto a la primera, indicando que **el efecto del nitroalqueno es más potente cuando se aplica junto a la segunda señal**. Si fuera cierto que el eflujo de K<sup>+</sup> es necesario y suficiente para el ensamblado del inflammasoma [67, 68], *el hecho de que todos los nitroalquenos inhiben cuando se los aplica sobre la segunda señal quiere decir que inhiben el ensamblado, lo que sugiere en primer lugar que estos compuestos de alguna manera estarían bloqueando el eflujo de K<sup>+</sup>*. La disminución de K<sup>+</sup> intracelular permitiría que ASC oligomerice de manera más efectiva [101] y por lo tanto la función de la segunda señal es potenciar el ensamblado del inflammasoma inducido por la primera señal, no siendo entonces absolutamente necesaria la segunda. El ATP en particular, que fue la segunda señal aplicada en todos nuestros ensayos, induce al receptor purinérgico P2X7 provocando la apertura de canales iónicos y permitiendo así que los iones K<sup>+</sup> difundan hacia el medio extracelular [79, 158, 159]. Esto sugiere en primera instancia que el NATxME inhibiría la acción de P2X7 impidiendo el eflujo de K<sup>+</sup>, pero en los trabajos de He, 2014, *J. Biol. Chem.* [143] se aplicó también como segunda señal nigericina. Esta actúa de diferente manera que el ATP, siendo una toxina formadora de poros en la membrana celular que permite

el pasaje de iones, entre ellos el  $K^+$  intracelular, hacia el exterior de forma independiente de P2X7 [160]. Los resultados de He, 2014, *J. Biol. Chem.* muestran que la liberación de IL-1 $\beta$  se inhibe también cuando se aplica nigericina como segunda señal. *Con esta información podríamos concluir que los nitroalquenos no necesariamente tendrían que actuar sobre P2X7 y lo harían en otro punto del proceso del ensamblado del inflamasoma.* Las corrientes y los cambios iónicos que siguen a la exposición a ATP o nigericina son complejos y en parte dependientes de canales TRP [69, 161]. Se ha mostrado en neuronas que estos canales en algunas ocasiones son activados por nitroalquenos pero también hay trabajos que muestran que estos los desensibilizan (aumenta la probabilidad de que el canal permanezca cerrado a pesar de la unión de un agonista) [136, 162]. En el trabajo de He, 2014, *J. Biol. Chem.* se realizó la medición de cantidad de potasio intracelular con células estimuladas con LPS y ATP lo cual mostró que el nitroalqueno utilizado por ellos no produjo efectos sobre el eflujo de este ion, no obstante sí observaron bloqueo de la formación de complejos de ASC al tratar con nitroalqueno [143]. Por lo tanto, los nitroalquenos utilizados por los autores no ejercerían ningún efecto sobre el mecanismo de eflujo de  $K^+$  pero de alguna manera están interfiriendo en la oligomerización de ASC. Para ello podrían estar actuando sobre un blanco molecular que se encuentra arriba de la oligomerización de ASC en la cadena de señalización o bien podrían estar ejerciendo efectos a nivel de la maquinaria que provoca el incremento de volumen celular (“swelling”). Con respecto a este último mecanismo, los canales TRP surgen como posibles candidatos. En este sentido, *resultados preliminares de microscopía de transmisión y fluorescencia nos indican que la administración de nitroalquenos disminuye los cambios de volumen que acompañan a la activación del inflamasoma en macrófagos THP-1 (no mostrado).*

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se construyó el siguiente esquema (figura 26), jerarquizándose los blancos sobre los que podrían estar actuando el NATxME y eventualmente otros nitroalquenos:

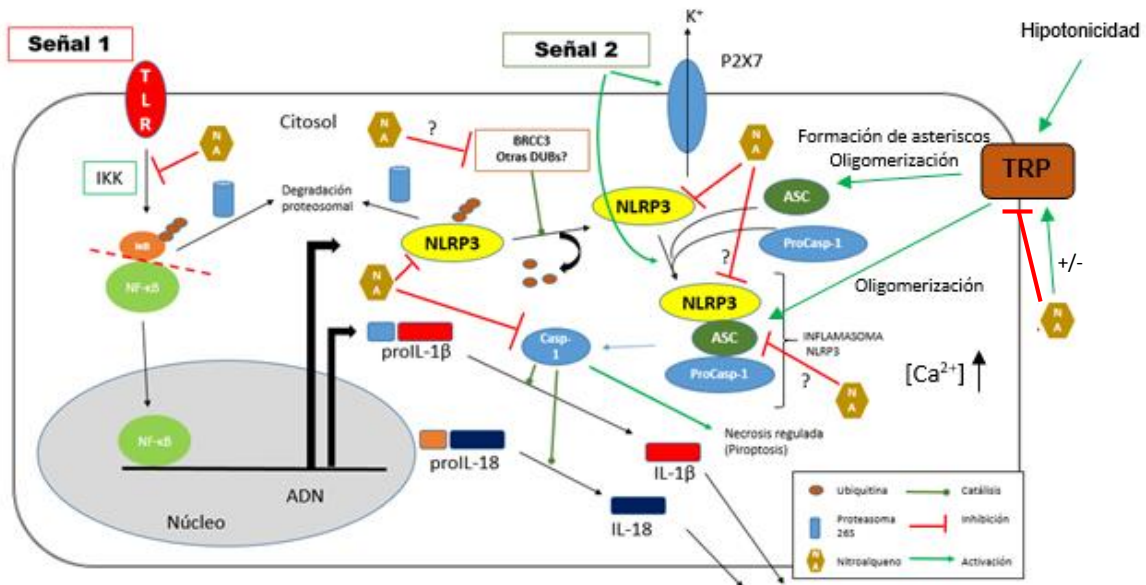


Figura 26. Mecanismos de acción de los nitroalquenos sobre el ensamblado del inflamasoma NLRP3

Nos parece importante destacar que si bien es conocida la inhibición de la señalización dependiente de  $NF-\kappa B$  (que participa en el cebado transcripcional del inflamasoma) por ácidos grasos nitrados [116, 117], los resultados de nuestro trabajo mostraron que la potencia del NATxME fue mayor cuando se lo aplicó junto a la segunda señal. Esto significa que la principal inhibición de  $IL-1\beta$  liberada sería a través de otro mecanismo postranscripcional distinto a  $NF-\kappa B$  y seguramente postraduccional, el cual estaría involucrado en el cebado no transcripcional o en el ensamblado/activación del inflamasoma.

### Limitaciones en los estudios

En varios de los ensayos que se realizaron llamó la atención la baja producción de  $IL-1\beta$  en los controles positivos. En algunos casos la secreción basal de  $IL-1\beta$  fueron cantidades menores a 1 ng/mL (Fig. 22, 24A, 25C y 25D), lo que podría estar indicando un funcionamiento anormal de las células. Esto constituye una limitación debido a que no es totalmente correcto comparar resultados con niveles máximos variables de citoquina, lo que hace necesaria la normalización. De todas formas, los experimentos de las figuras mencionadas tienen réplicas que han revelado mayores cantidades de  $IL-1\beta$  liberada por los controles positivos.

## 6. CONCLUSIONES

***El nitroalqueno derivado del  $\alpha$ -tocoferol NATxME ejerce efectos inhibitorios de forma dosis dependiente sobre la liberación de IL-1 $\beta$  por células THP-1, actuando en distintos niveles pero principalmente sería sobre el mecanismo de ensamblado del inflamasoma NLRP3.***

***Los resultados obtenidos en este trabajo resaltan los efectos antiinflamatorios y el conocimiento generado que contribuiría para una futura aplicación de estos nitroalquenos análogos del  $\alpha$ -tocoferol como posibles fármacos terapéuticos en enfermedades inflamatorias.***

## 7. PERSPECTIVAS

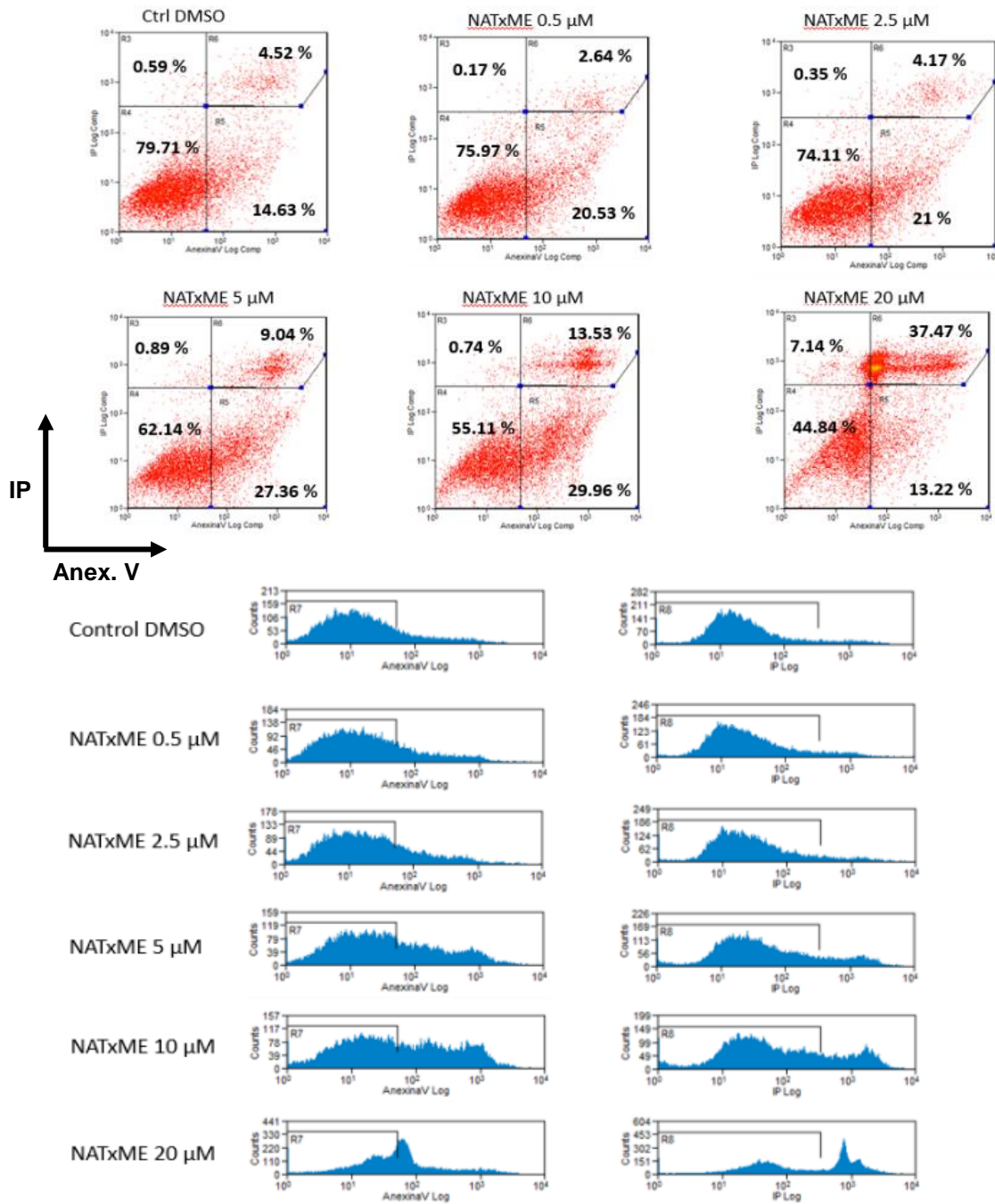
Nos proponemos entender de forma más detallada los mecanismos por los cuales lo nitroalquenos modulan el cebado y el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 de acuerdo a lo planteado en la discusión:

1. Identificar los blancos moleculares de nitroalquenos entre los componentes estructurales del inflamasoma NLRP3 (procaspasa-1, Caspasa-1, ASC y NLRP3), con especial interés en los análogos del  $\alpha$ -tocoferol (NATxME y NA- $\alpha$ -TOH) que causan la disminución de IL-1 $\beta$  liberada dependiente del inflamasoma NLRP3.
2. Estudiar si los nitroalquenos NATxME y NA- $\alpha$ -TOH forman aductos con las principales proteínas del inflamasoma (NLRP3, ASC, Caspasa-1 y Procaspasa-1) y caracterizar estas reacciones desde el punto de vista cinético.
3. Estudiar mediante ensayos de cinética enzimática si NATxME y NA- $\alpha$ -TOH afectan la actividad caspasa-1 y mediante estudios de cristalografía de rayos X estudiar los determinantes estructurales de la interacción de nitroalquenos con Caspasa-1 activa e inactiva.

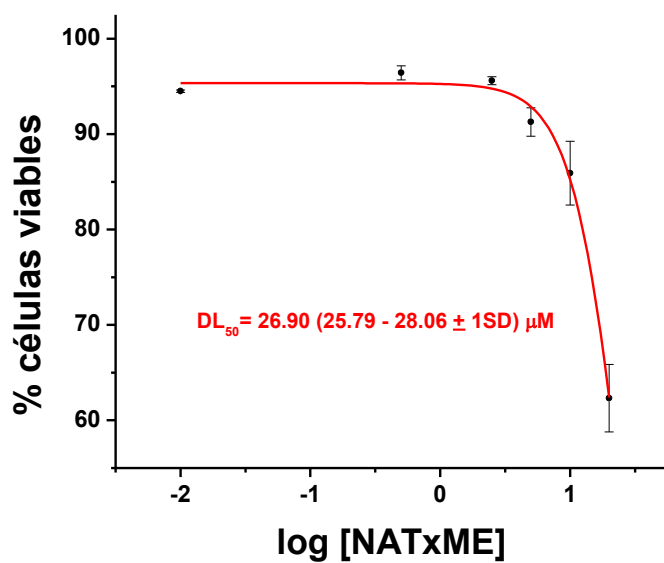
Además, en el presente trabajo de finalización de carrera hemos obtenido resultados preliminares que sugieren un posible efecto modulador de los nitroalquenos sobre la muerte celular en el contexto inflamatorio. En particular hemos observado preliminarmente que NATxME aplicado sobre macrófagos estimulados con LPS y ATP produce una disminución de la muerte por necrosis regulada (piroptosis) y un aumento de la muerte apoptótica. Para ello realizamos ensayos por citometría de flujo marcando con yoduro de propidio y anexina V

conjugada con Alexa 488 y en este momento nos encontramos trabajando en confirmar este resultado. Dados estos resultados preliminares nos preguntamos si los efectos de inhibición del inflamasoma y de estimulación de la muerte apoptótica podrían surgir de una mayor susceptibilidad pro-apoptótica de las células doblemente estimuladas y tratadas con nitroalquenos, eventualmente de acuerdo con evidencias recientes que establecen una coordinación molecular de la activación del inflamasoma y decisiones de muerte celular [46, 163].

**Citotoxicidad del NATxME en THP-1 sin estimular (Fig. 27 y 28)**

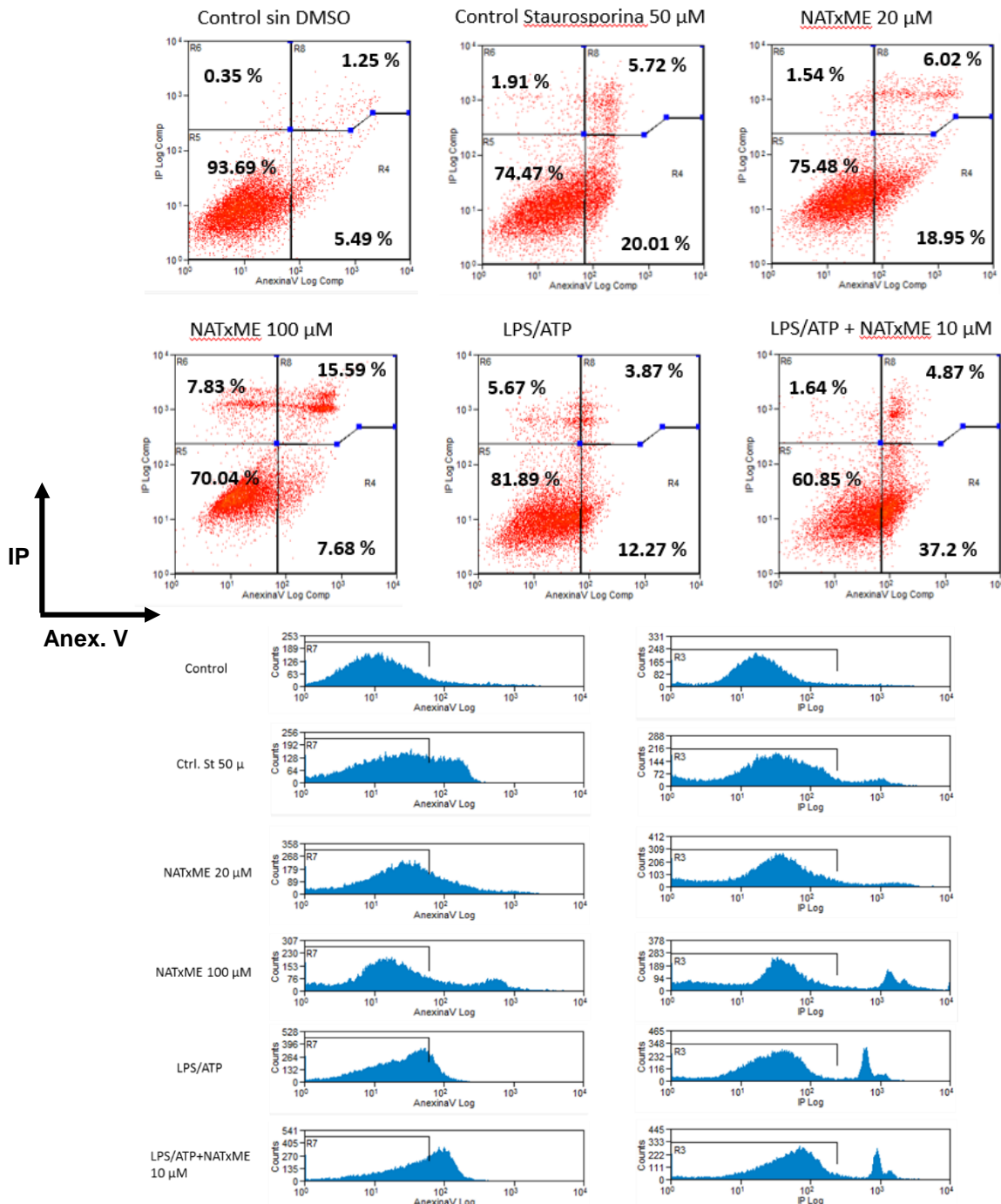


**Figura 27. Dot-plots e histogramas citotoxicidad de NATxME en células THP-1.** Se diferenciaron las células THP-1 y luego se trataron con distintas concentraciones de NATxME (0; 0.5; 2.5; 5; 10 y 20 μM) donde la condición sin nitroalqueno se le aplicó el vehículo (DMSO 0.5%). Se incubaron por 24 hs, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y luego se levantaron las células. Finalmente se analizó por citometría de flujo marcando con Anexina V-Alexa 488 y con Ioduro de Propidio. Cada condición fue por triplicado del cual un monuplicado se marcó con Ioduro de propidio y Anexina V mientras que el duplicado restante solo se marcó con Ioduro de propidio. Los controles para los marcadores se hicieron a partir de un pool de todas las muestras. El procesamiento de datos y construcción de dot-plots e histogramas se hizo con el software Summit v.4.3.



**Figura 28. Curvas de citotoxicidad.** A partir de los datos de porcentajes que surgieron a partir del procesamiento de datos con el programa Summit v.4.3, se graficó con Origin Pro 8 el porcentaje de células viables se graficó el porcentaje de células viables vs  $\log_{10}$  [NATxME], a la cual se le ajustó una función dosis respuesta. Se utilizaron datos por triplicado de eventos negativos para Ioduro de propidio y Anexina V expresándose el valor como promedio  $\pm$  desvío estándar.

**Muerte celular en THP-1 estimuladas con LPS y ATP tratadas con NATxME (Figura 29)**



**Figura 29. Estudio de viabilidad y muerte celular de THP-1 tratadas con NATxME, LPS y ATP.** Se cultivaron y diferenciaron las células THP-1. Una vez diferenciadas se trataron con: NATxME (20 y 100 µM) en DMSO 0.5%, control con el vehículo (DMSO 0.5%), LPS (250 ng/mL) y ATP (5 mM); LPS, ATP y NATxME 10 µM (aplicado junto al ATP). Además se hizo un control negativo (solo células) y otro con Staurosporina 50 mM (inductor de apoptosis). A las condiciones con LPS y ATP se les aplicó el primero y se incubaron 4 hs, luego se aplicó el ATP con o sin nitroalqueno, incubándose 30 minutos. El resto de las condiciones se incubaron por 4 hs y se levantaron las células. Finalmente se analizó por citometría de flujo marcando con Anexina V-Alexa 488 y con Ioduro de Propidio. Cada condición se hizo por triplicado y se marcó con ioduro de propidio y anexina V una única conducción y el duplicado restante solo con Ioduro de Propidio. El procesamiento de datos y construcción de dot-plots e histogramas fue igual que en la figura 27.



## **8. AGRADECIMIENTOS**

- A mis orientadores Carlos Batthyány y Horacio Botti por permitirme trabajar dentro de la línea de investigación que ellos llevan a cabo, así como por la formación práctica, académica y científica que ellos me brindaron.
- A los integrantes de nuestro grupo de trabajo, destacando en particular a Jorge Rodríguez por haberme ayudado en asuntos de trabajo de laboratorio y científico en general.
- A todos los integrantes de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo, lugar donde realicé mis trabajos para la tesina.
- Al Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación del Institut Pasteur de Montevideo (Marcelo Hill, Mercedes Segovia) donde realicé los ensayos de ELISA.
- A la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur Montevideo (Sabina Victoria, Soledad Astrada) donde realicé los experimentos de citometría de flujo.
- A la Facultad de Ciencias por la formación académica para la licenciatura.
- A la ANII por la financiación económica mediante una beca de iniciación a la investigación.

## 9. Referencias bibliográficas:

1. Kumar, V., A.K. Abbas, and J.C. Aster, *Robbins Basic Pathology*. 9th ed. 2013. Elsevier. Chapter 2. Pag. 29-73.
2. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
3. A.K. Abbas, A.H.L., S. Pillai, *Inmunología Celular y Molecular*. 6° ed. 2008. Elsevier. Capítulo 2. Pag. 19-46.
4. Pandey, S., T. Kawai, and S. Akira, *Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(1): p. a016246.
5. Hoving, J.C., G.J. Wilson, and G.D. Brown, *Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity*. Cell Microbiol, 2014. **16**(2): p. 185-94.
6. Motta, V., et al., *NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels*. Physiol Rev, 2015. **95**(1): p. 149-78.
7. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 491.
8. Hartman, J. and W.H. Frishman, *Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy*. Cardiol Rev, 2014. **22**(3): p. 147-51.
9. Esser, N., et al., *Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **105**(2): p. 141-50.
10. Mozaffarian, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2015. **131**(4): p. e29-322.
11. West, K.M. and J.M. Kalbfleisch, *Glucose tolerance, nutrition, and diabetes in Uruguay, Venezuela, Malaya, and East Pakistan*. Diabetes, 1966. **15**(1): p. 9-18.
12. Pisabarro, R., et al., *Segunda Encuesta Nacional de Sobrepeso y Obesidad (ENSO 2) adultos (18-65 años o más)*. Rev Med Urug, 2009. **25**: p. 14-26.
13. Kotas, M.E. and R. Medzhitov, *Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility*. Cell, 2015. **160**(5): p. 816-27.
14. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
15. Caronni, N., B. Savino, and R. Bonecchi, *Myeloid cells in cancer-related inflammation*. Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 249-53.
16. Impellizzeri, D., et al., *Emerging drugs for acute lung injury*. Expert Opin Emerg Drugs, 2015. **20**(1): p. 75-89.
17. Ward, P.A., *Editorial commentary: New strategies for treatment of humans with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(4): p. 596-7.
18. Patschan, D. and G.A. Muller, *Acute kidney injury*. J Inj Violence Res, 2015. **7**(1): p. 19-26.
19. Czaja, A.J., *Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(10): p. 2515-32.

20. Kain, V., S.D. Prabhu, and G.V. Halade, *Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2014. **109**(6): p. 444.
21. Kawabori, M. and M.A. Yenari, *Inflammatory responses in Brain Ischemia*. Curr Med Chem, 2015.
22. Batthyany, C. and G.V. López, *Nitroalkene Tocopherol and Analogs for Use in the Treatment and Prevention of Inflammation Related Conditions*. USA PCT Application.2014.
23. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
24. Frostegard, J., *Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease*. BMC Med, 2013. **11**: p. 117.
25. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
26. Howell, K.W., et al., *Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells*. J Surg Res, 2011. **171**(1): p. e27-31.
27. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
28. Miller, Y.I., et al., *Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity*. Circ Res, 2011. **108**(2): p. 235-48.
29. Botti, H., et al., *Reactivity of peroxynitrite and nitric oxide with LDL*. IUBMB Life, 2005. **57**(6): p. 407-12.
30. Goncalves, I., et al., *Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(6): p. 1505-12.
31. Liu, W., et al., *OxLDL-induced IL-1 beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation*. Inflamm Res, 2014. **63**(1): p. 33-43.
32. Kellner-Weibel, G., et al., *Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(8): p. 1891-8.
33. Lu, X. and V. Kakkar, *Inflammasome and atherogenesis*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(1): p. 108-24.
34. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 33-43.
35. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
36. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): p. 107-20.
37. Kepp, O., et al., *Pyroptosis - a cell death modality of its kind?* Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 627-30.

38. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of regulated necrosis*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **35**: p. 24-32.
39. Vanden Berghe, T., et al., *Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 135-47.
40. Iyer, S.S., et al., *Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(48): p. 20388-93.
41. Lamkanfi, M. and V.M. Dixit, *Mechanisms and functions of inflammasomes*. Cell, 2014. **157**(5): p. 1013-22.
42. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
43. Thornberry, N.A., et al., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 768-74.
44. Dinarello, C.A., *Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(2): p. 447S-455S.
45. Sutterwala, F.S., S. Haasken, and S.L. Cassel, *Mechanism of NLRP3 inflammasome activation*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1319**: p. 82-95.
46. Sagulenko, V., et al., *AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC*. Cell Death Differ, 2013. **20**(9): p. 1149-60.
47. Vanaja, S.K., V.A. Rathinam, and K.A. Fitzgerald, *Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights*. Trends Cell Biol, 2015.
48. Van Opdenbosch, N., et al., *Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3209.
49. Boyden, E.D. and W.F. Dietrich, *Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 240-4.
50. Miao, E.A., et al., *Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3076-80.
51. Broz, P., et al., *Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1745-55.
52. Rathinam, V.A., et al., *The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 395-402.
53. Srinivasula, S.M., et al., *The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21119-22.
54. Lu, A., et al., *Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1193-206.
55. Stehlik, C., et al., *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6154-63.
56. Lamkanfi, M., et al., *Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(12): p. 2350-63.

57. Miggin, S.M., et al., *NF-kappaB activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by caspase-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3372-7.
58. Ozaki, E., M. Campbell, and S.L. Doyle, *Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives*. J Inflamm Res, 2015. **8**: p. 15-27.
59. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 787-91.
60. Juliana, C., et al., *Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation*. J Biol Chem, 2012. **287**(43): p. 36617-22.
61. Py, B.F., et al., *Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity*. Mol Cell, 2013. **49**(2): p. 331-8.
62. Lopez-Castejon, G., et al., *Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and interleukin-1beta secretion via assembly of the inflammasome*. J Biol Chem, 2013. **288**(4): p. 2721-33.
63. López-Castejón, G., *Regulation of NLRP3 activation by the ubiquitin system*. Inflammasome, 2014. **1**(1): p. 15-19.
64. Mayor, A., et al., *A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 497-503.
65. Bryan, N.B., et al., *Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3173-82.
66. Hornung, V. and E. Latz, *Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 620-3.
67. Munoz-Planillo, R., et al., *K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1142-53.
68. Petrilli, V., et al., *Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1583-9.
69. Compan, V., et al., *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD forms specks but does not activate caspase-1 in the absence of NLRP3 during macrophage swelling*. J Immunol, 2015. **194**(3): p. 1261-73.
70. Subramanian, N., et al., *The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation*. Cell, 2013. **153**(2): p. 348-61.
71. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. Nature, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
72. Tsuchiya, K. and H. Hara, *The inflammasome and its regulation*. Crit Rev Immunol, 2014. **34**(1): p. 41-80.
73. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
74. Napetschnig, J. and H. Wu, *Molecular basis of NF-kappaB signaling*. Annu Rev Biophys, 2013. **42**: p. 443-68.

75. Chen, J. and Z.J. Chen, *Regulation of NF-kappaB by ubiquitination*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 4-12.
76. Shembade, N., A. Ma, and E.W. Harhaj, *Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1135-9.
77. Bauernfeind, F., et al., *NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223*. J Immunol, 2012. **189**(8): p. 4175-81.
78. Haneklaus, M., et al., *Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1beta production*. J Immunol, 2012. **189**(8): p. 3795-9.
79. Lister, M.F., et al., *The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation*. J Inflamm (Lond), 2007. **4**: p. 5.
80. Franchi, L., et al., *Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K+ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria*. J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 18810-8.
81. Nakahira, K., et al., *Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 222-30.
82. Shimada, K., et al., *Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 401-14.
83. Iyer, S.S., et al., *Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation*. Immunity, 2013. **39**(2): p. 311-23.
84. Kagan, V.E., et al., *Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(11): p. 1439-53.
85. Kayagaki, N., et al., *Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4*. Science, 2013. **341**(6151): p. 1246-9.
86. Misawa, T., et al., *Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome*. Nat Immunol, 2013. **14**(5): p. 454-60.
87. Hornung, V., et al., *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 847-56.
88. Hendriks, T., et al., *Lysosomal cholesterol accumulation: driver on the road to inflammation during atherosclerosis and non-alcoholic steatohepatitis*. Obes Rev, 2014. **15**(5): p. 424-33.
89. Bruchard, M., et al., *Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth*. Nat Med, 2013. **19**(1): p. 57-64.
90. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
91. Guarda, G., et al., *Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation*. Immunity, 2011. **34**(2): p. 213-23.
92. Mao, K., et al., *Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock*. Cell Res, 2013. **23**(2): p. 201-12.

93. Hernandez-Cuellar, E., et al., *Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome*. J Immunol, 2012. **189**(11): p. 5113-7.
94. Guarda, G., et al., *T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 269-73.
95. Zinngrebe, J., et al., *Ubiquitin in the immune system*. EMBO Rep, 2014. **15**(1): p. 28-45.
96. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.
97. Lopez-Castejon, G. and D. Brough, *Understanding the mechanism of IL-1beta secretion*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. **22**(4): p. 189-95.
98. Puren, A.J., G. Fantuzzi, and C.A. Dinarello, *Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2256-61.
99. Wang, Q., et al., *Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages*. Int Immunol, 2013. **25**(6): p. 363-72.
100. Fink, S.L., T. Bergsbaken, and B.T. Cookson, *Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4312-7.
101. Fernandes-Alnemri, T., et al., *The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1590-604.
102. Paul, D., et al., *Regulation and pharmacological blockade of sodium-potassium ATPase: a novel pathway to neuropathy*. J Neurol Sci, 2014. **340**(1-2): p. 139-43.
103. Batthyany, C., et al., *Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20450-63.
104. L.G. Wade, J., *Química Orgánica*. 7ma. Edición ed. Vol. 1. 2012. Pearson. Pag. 29-30
105. Mather, B.D.V., K.; Miller, K.M.; Long, T.E., *Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies*. Progress Polymer Science, 2006. **31**: p. 487-531.
106. L.G. Wade, J., *Química Orgánica*. 7ma. ed. Vol. 2. 2012. Pearson. Pag. 1081-1082.
107. Freeman, B.A., et al., *Nitro-fatty acid formation and signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15515-9.
108. Delmastro-Greenwood, M., B.A. Freeman, and S.G. Wendell, *Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 79-105.
109. Schopfer, F.J., C. Cipollina, and B.A. Freeman, *Formation and signaling actions of electrophilic lipids*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 5997-6021.
110. Botti, H., et al., *Homolytic pathways drive peroxynitrite-dependent Trolox C oxidation*. Chem Res Toxicol, 2004. **17**(10): p. 1377-84.
111. Baker, L.M., et al., *Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 31085-93.

112. Ferrer-Sueta, G., et al., *Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction*. Chem Res Toxicol, 2011. **24**(4): p. 434-50.
113. Kansanen, E., et al., *Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14019-27.
114. Waku, T., et al., *Structural insight into PPARgamma activation through covalent modification with endogenous fatty acids*. J Mol Biol, 2009. **385**(1): p. 188-99.
115. 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, 2009. **284**(48): p. 33233-41.
116. Cui, T., et al., *Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 35686-98.
117. Villacorta, L., et al., *Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts*. Cardiovasc Res, 2013. **98**(1): p. 116-24.
118. Mitsuishi, Y., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 200.
119. Motohashi, H. and M. Yamamoto, *Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism*. Trends Mol Med, 2004. **10**(11): p. 549-57.
120. Ma, Q., *Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2013. **53**: p. 401-26.
121. Canning, P. and A.N. Bullock, *New strategies to inhibit KEAP1 and the Cul3-based E3 ubiquitin ligases*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(1): p. 103-7.
122. Zhang, D.D., et al., *Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30091-9.
123. Kobayashi, A., et al., *Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 221-9.
124. Villacorta, L., et al., *Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H770-6.
125. Ahmadian, M., et al., *PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 557-66.
126. Li, Y., et al., *Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(8): p. 865-7.
127. Groeger, A.L., et al., *Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(6): p. 433-41.
128. De Maio, A., *Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams*. Shock, 1999. **11**(1): p. 1-12.
129. Pockley, A.G., et al., *Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease*. Hypertension, 2000. **36**(2): p. 303-7.
130. Li, Z., A. Menoret, and P. Srivastava, *Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 45-51.
131. Dybdahl, B., et al., *Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 685-90.



132. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 558-61.
133. Shi, Y., D.D. Mosser, and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors*. Genes Dev, 1998. **12**(5): p. 654-66.
134. Ali, A., et al., *HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in Xenopus oocytes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 4949-60.
135. Dayalan Naidu, S., R.V. Kostov, and A.T. Dinkova-Kostova, *Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(1): p. 6-14.
136. Zhang, X., et al., *Nitro-oleic acid desensitizes TRPA1 and TRPV1 agonist responses in adult rat DRG neurons*. Exp Neurol, 2014. **251**: p. 12-21.
137. Klinke, A., et al., *Protective effects of 10-nitro-oleic acid in a hypoxia-induced murine model of pulmonary hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **51**(1): p. 155-62.
138. Awwad, K., et al., *Electrophilic fatty acid species inhibit 5-lipoxygenase and attenuate sepsis-induced pulmonary inflammation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(17): p. 2667-80.
139. Wang, H., et al., *Nitro-oleic acid protects against endotoxin-induced endotoxemia and multiorgan injury in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F754-62.
140. Wang, H., et al., *Effects of Endogenous PPAR Agonist Nitro-Oleic Acid on Metabolic Syndrome in Obese Zucker Rats*. PPAR Res, 2010. **2010**: p. 601562.
141. Rudolph, V., et al., *Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction*. J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1461-73.
142. Lemaire-Ewing, S., et al., *Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is alpha-tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat?* Mol Nutr Food Res, 2010. **54**(5): p. 631-40.
143. He, Y., et al., *3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 1142-50.
144. Eom, S.H., et al., *Suppression of inducible nitric oxide synthase expression induced by Toll-like receptor agonists by (E)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(2): p. 205-9.
145. Jain, N., et al., *Synthesis and antitumor evaluation of nitrovinyl biphenyls: anticancer agents based on allocolchicines*. ChemMedChem, 2011. **6**(5): p. 859-68.
146. Mohan, R., et al., *Synthesis and evaluation of alpha-hydroxymethylated conjugated nitroalkenes for their anticancer activity: inhibition of cell proliferation by targeting microtubules*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(23): p. 8073-85.
147. Garcia-Calvo, M., et al., *Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32608-13.
148. Hampton, M.B., I. Stamenkovic, and C.C. Winterbourn, *Interaction with substrate sensitises caspase-3 to inactivation by hydrogen peroxide*. FEBS Lett, 2002. **517**(1-3): p. 229-32.

149. Bae, J.Y. and H.H. Park, *Crystal structure of NALP3 protein pyrin domain (PYD) and its implications in inflammasome assembly*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39528-36.
150. Cocco, M., et al., *Electrophilic Warhead-Based Design of Compounds Preventing NLRP3 Inflammasome-Dependent Pyroptosis*. J Med Chem, 2014.
151. Gil, M., et al., *Inhibition of Mycobacterium tuberculosis PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe-S center*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 150-61.
152. Kelley, E.E., et al., *Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36176-84.
153. Park, E.K., et al., *Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli*. Inflamm Res, 2007. **56**(1): p. 45-50.
154. Grahames, C.B., et al., *Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes*. Br J Pharmacol, 1999. **127**(8): p. 1915-21.
155. Le Feuvre, R.A., et al., *Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3210-8.
156. Herman, R.A., P.N. Scherer, and G. Shan, *Evaluation of logistic and polynomial models for fitting sandwich-ELISA calibration curves*. J Immunol Methods, 2008. **339**(2): p. 245-58.
157. Rodríguez, J., *Development of a Novel Class of Anti-atherogenic Agents: Electrophilic Nitroalkene-vitamin E (Alpha-tocopherol) Analogs.*, in 83rd. EAS Congress. 2015: Glasgow, UK.
158. Laliberte, R.E., J. Egger, and C.A. Gabel, *ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 36944-51.
159. Locovei, S., et al., *Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex*. FEBS Lett, 2007. **581**(3): p. 483-8.
160. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway*. J Biol Chem, 2007. **282**(4): p. 2386-94.
161. Zheng, J., *Molecular mechanism of TRP channels*. Compr Physiol, 2013. **3**(1): p. 221-42.
162. Artim, D.E., et al., *Nitro-oleic acid targets transient receptor potential (TRP) channels in capsaicin sensitive afferent nerves of rat urinary bladder*. Exp Neurol, 2011. **232**(1): p. 90-9.
163. Aachoui, Y., et al., *Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection*. Curr Opin Microbiol, 2013. **16**(3): p. 319-26.