



Transglutaminasa tisular en macrófagos: expresión de las variantes de *splicing* durante el proceso de diferenciación y activación celular

Tesina de grado para acceder al título de Licenciado en
Bioquímica

Bach. Federico Calvo

Tutora: Mag. Paula Arbildi

Cátedra de Inmunología - Instituto de Higiene
Facultad de Ciencias/Química
Universidad de la República

Montevideo, Uruguay
2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutora **Paula Arbildi**, por guiarme y acompañarme durante todo este proceso, por su paciencia y disposición desde que entré al laboratorio, y por todo lo que aprendí realizando este trabajo.

A **Ana Hernández** por darme la oportunidad de ingresar al laboratorio y permitirme llevar a cabo este trabajo.

A toda la **Cátedra de Inmunología**, en especial a la "**Casita de Adelante**" (Ana, Pau, Ceci, Vero, Emi, Gus, Clau, Seba, Joaco, Emi, Javier), por su compañerismo y por estar siempre dispuestos a ayudar con cualquier problema. Agradezco que hayan creado un ambiente de trabajo tan cálido, que realmente hace que sea disfrutable estar en el laboratorio.

A "**La Banda de la Entropía**" (Lau y Clau), que me acompañaron en todo el desarrollo de mi carrera, ayudándonos mutuamente para seguir adelante.

A mis amigos de toda la vida, **los de siempre** (Andrés, Julio, Bárbara, Mateo), por el apoyo y por bancarme en momentos de estrés. Gracias por aguantarme cuando les contaba lo que hacía en el laboratorio aunque no entendían.

Por último, a mi **familia**, en especial a mis padres y hermano, por su apoyo incondicional no solo durante mi carrera sino durante toda mi vida, por darme la oportunidad de estudiar y esforzarse para que cuente con todas las herramientas que necesitaba durante este proceso.

A todos ellos, gracias.

RESUMEN

La transglutaminasa tisular (TG2) es una proteína multifuncional y ubicua que participa en diferentes procesos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La TG2 tiene varios dominios funcionales y dos actividades enzimáticas principales que son mutuamente reguladas: aciltransferasa (TGasa) y unión/degradación de GTP (GTPasa). La diversidad funcional se amplifica por la expresión de variantes de *splicing* alternativo (v2, v3, v4a y v4b), que son versiones truncadas en la región C-terminal de la TG2 canónica (v1).

La expresión y actividad de la TG2 en varios procesos biológicos mediados por monocitos y macrófagos estarían condicionadas por el microambiente inflamatorio. Nos propusimos profundizar en el estudio mediante RT-qPCR de las variantes de TG2 en estos tipos celulares, utilizando las células premonocíticas THP-1 como modelo que permite analizar temporalmente la expresión de la enzima durante la diferenciación a macrófago, los cambios de expresión de la enzima frente a estímulos inflamatorios (LPS, TNF α e IFN γ) y en la diferenciación funcional a perfiles de tipo M1 o M2.

Durante la diferenciación hacia macrófagos, se observó un aumento importante (10-100 veces) y progresivo de la expresión de todas las variantes, aunque en diferente magnitud. Respecto al efecto de los estímulos inflamatorios: IFN γ (20 ng/mL) provocó un aumento discreto (4 veces) en la expresión de la forma canónica y de las variantes v3, v4a y v4b. El tratamiento en conjunto con LPS e IFN γ provocó un aumento (4 veces) de la expresión de la forma canónica y de las variantes v4a y v4b. TNF α (10 ng/mL) y LPS (50 ng/mL) no tuvieron efecto significativo en la expresión de ninguna variante de TG2, aunque se observó una tendencia al aumento en las concentraciones ensayadas. El proceso de diferenciación parece ser un evento más importante para la inducción de la expresión de TG2 que los estímulos inflamatorios relacionados a un perfil inflamatorio (M1).

Se llevó a cabo la polarización de los macrófagos derivados de THP-1 hacia los perfiles M1 y M2. Se observó que tanto los mediadores proinflamatorios como los antiinflamatorios utilizados para lograr la polarización hacia dichos perfiles, fueron capaces de regular positivamente la expresión de la TG2. Sin embargo, los mayores aumentos en la expresión de las variantes se observaron en los macrófagos M2, lo que apoya la teoría de que la TG2 podría funcionar como un marcador de polarización de macrófagos para dicho perfil.

Finalmente, se realizó una puesta a punto de la detección de la TG2 a nivel proteico utilizando una línea celular con mayor expresión de TG2 (Swan-71) utilizando distintos anticuerpos específicos para la proteína. Esta etapa del trabajo representa una base para futuros trabajos en las células del tipo monocito/macrófago.

Nuestro trabajo futuro se enfoca en estudiar los cambios inducidos en la función celular como consecuencia de la expresión diferencial de las variantes de TG2.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Transglutaminasa tisular	1
1.1.1	Distribución	1
1.1.2	Funciones	3
1.1.3	Estructura y regulación de la actividad	4
1.1.4	Regulación de la expresión	6
1.1.5	Variantes de <i>splicing</i>	7
1.1.6	TG2 en procesos fisiológicos	10
1.2	Monocitos y macrófagos	14
1.2.1	Plasticidad y polarización de macrófagos	15
1.2.2	Modelos <i>in vitro</i>	17
1.3	Transglutaminasa tisular en monocitos y macrófagos	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo general	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1	Cultivo celular	22
3.2	Diferenciación de THP-1 a macrófagos	22
3.3	Estudio de la respuesta de los macrófagos derivados de THP-1 a estímulos inflamatorios	23
3.4	Polarización de macrófagos derivados de THP-1	23
3.5	Análisis de la expresión de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 ..	24
3.6	Producción de citocinas por macrófagos derivados de THP-1 estimulados con mediadores inflamatorios	26
3.7	Análisis de la expresión de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 a nivel proteico	26
4	RESULTADOS	29
4.1	Diferenciación a macrófagos de células THP-1	29
4.2	Expresión de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 en la diferenciación a macrófagos de células THP-1	29
4.3	Expresión de los ARNm de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 en macrófagos derivados de células THP-1 polarizados	31

4.4	Comparación de la expresión de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 en diferentes perfiles de polarización de macrófagos.....	33
4.5	Expresión de las variantes de <i>splicing</i> de TG2 a nivel proteico	35
5	DISCUSIÓN.....	39
6	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	43
7	BIBLIOGRAFÍA.....	44

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Transglutaminasa tisular

Las transglutaminasas (TGs) son una familia de enzimas relacionadas estructural y funcionalmente que catalizan modificaciones post-traduccionales de proteínas mediante la formación de enlaces covalentes intra- e intermoleculares, lo que se conoce como actividad de entrecruzamiento. El descubrimiento de la transglutaminasa tisular (tTG o TG2) se le acredita a Heinrich Waelsch, quien en 1957 demostró que la incubación de extractos de hígado de cobayo con aminos marcadas radioactivamente resultaba en la incorporación de las aminos a las proteínas del extracto en forma Ca^{2+} dependiente. La proteína fue luego identificada como TG2 [Sarkar, NK. *et al.*, 1957; Katt, WP. *et al.*, 2018].

De todas las TGs de mamíferos, la TG2 ha sido la más estudiada, principalmente debido a su distribución ubicua y sus funciones en múltiples procesos fisiológicos y patológicos.

1.1.1 Distribución

La TG2 es relativamente más abundante que los otros miembros de la familia de las transglutaminasas y la única que se expresa de manera ubicua en el organismo. Aunque inicialmente fue identificada como una proteína citosólica, la TG2 fue posteriormente descrita como una enzima localizada también en otros compartimentos celulares, como el núcleo y la mitocondria, así como en la matriz extracelular [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012] (Figura 1). La translocación de la TG2 hacia distintos compartimentos celulares se encuentra asociada a funciones enzimáticas especializadas [Bianchi, N. *et al.*, 2018].

En la mayoría de las células, la TG2 citosólica comprende la mayor parte de la reserva celular. Desde su descubrimiento en 1957, se ha identificado un gran número de sus sustratos enzimáticos, siendo la mayoría de ellos proteínas citosólicas. En el ambiente intracelular, los principales procesos en los cuales participa la TG2 están representados por la transamidación de proteínas y la actividad en la señalización, que predominan uno sobre el otro cuando la enzima se encuentra presente libre en el citosol o asociada a la superficie interna de la membrana [Bergamini, CM. *et al.*, 2011].

La presencia de TG2 nuclear fue demostrada en varios tipos celulares, representando el 5-7% de la TG celular [Peng, X. *et al.*, 1999]. Aunque no hay

ninguna señal clásica de translocación en la TG2, la proteína se asocia con la mitocondria en varios tipos celulares. Estudios de microscopía revelaron que la mayor parte de la TG2 mitocondrial se encuentra asociada con la membrana externa y el espacio intermembrana, mientras que una menor parte se encuentra en la membrana mitocondrial interna y en la matriz mitocondrial [Park, D. *et al.*, 2010]. En esta localización, TG2 participa en la regulación de la homeostasis del calcio, por ejemplo, por entrecruzamiento de receptores para el inositol 1,4,5-trifosfato [Bianchi, N. *et al.*, 2018].

Mientras que los roles de la TG2 en el citosol son principalmente relacionados a las modificaciones de proteínas en los residuos de glutamina (transamidación o entrecruzamiento), las funciones adicionales relacionadas a la transducción de señales (actuando como proteína G) y de proteína adaptadora para el correcto ensamblaje de la matriz extracelular, son llevadas a cabo mayormente por TG2 ubicada al nivel de la membrana [Bianchi, N. *et al.*, 2018].

La TG2 es externalizada constitutivamente en varios tipos celulares, incluidos fibroblastos, osteoblastos, monocitos/macrófagos, células endoteliales y de músculo liso [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012]. El mecanismo de externalización de la TG2 para alcanzar la matriz extracelular es una vía no convencional que aún no se conoce en detalle. Sin embargo, se han propuesto diferentes teorías, incluida la carga de TG2 en endosomas de reciclaje, secreción de TG2 a través del desprendimiento de vesículas, y secreción a través de exosomas en respuesta a estímulos externos [Bianchi, N. *et al.*, 2018; Savoca, MP. *et al.*, 2018]. De esta manera la TG2 se encuentra asociada a la superficie celular interactuando con la membrana plasmática, y en la matriz extracelular. Diversos sustratos enzimáticos de la TG2 han sido identificados en la matriz extracelular, incluyendo fibrina, fibrinógeno, fibronectina, colágeno y osteopontina [Savoca, MP. *et al.*, 2018].

Además de las reacciones de entrecruzamiento de distintos sustratos y de otras reacciones enzimáticas llevadas a cabo por la TG2 en la matriz extracelular, la TG2 extracelular es capaz de interactuar no covalentemente con diversos receptores de membrana y proteínas de la matriz, exhibiendo una importante función de adaptador o proteína andamio (*"scaffold"*) fuera de la célula. La TG2 ubicada en el ambiente extracelular tiene un importante rol en la adhesión y migración celular y en la organización de la matriz extracelular, contribuyendo a procesos como la reparación de heridas, la regeneración de tejidos e inflamación [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012].

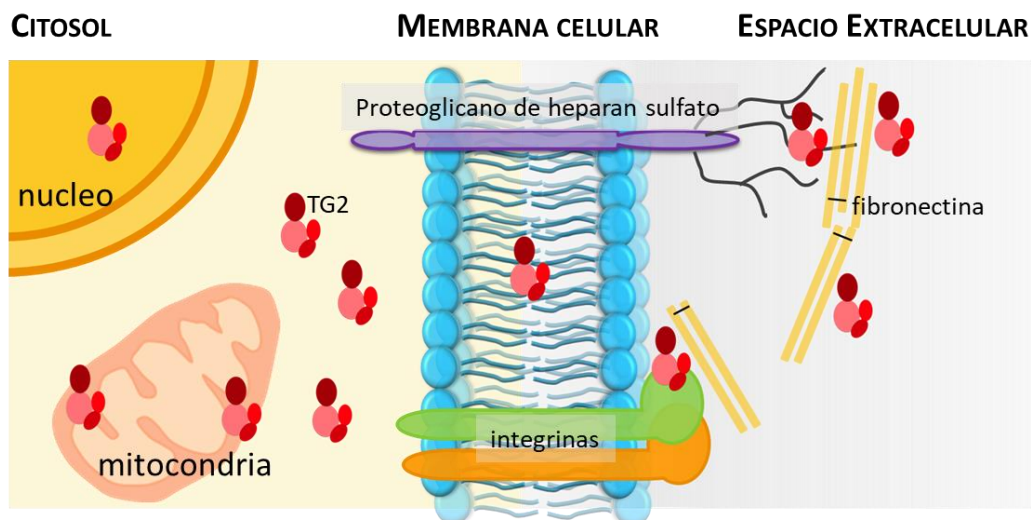


Figura 1 - Distribución de la TG2 en la célula (adaptada de Telci & Griffin (2006)).

1.1.2 Funciones

La distribución ubicua y sus diversas características estructurales son algunos de los factores que hacen de la TG2 un miembro único de la familia de las transglutaminasas. Esta enzima está involucrada en más procesos fisiológicos que cualquier otro miembro de la familia, ya sea a través de la actividad de entrecruzamiento, como otras que exhibe la TG2, todas sujetas a una fina regulación [Odi, BO *et al.*, 2014].

Desde el punto de vista de la actividad catalítica la TG2 puede ser referida como una enzima multifuncional, debido a su capacidad de catalizar entrecruzamiento de proteínas dependiente de Ca^{2+} y una diversa cantidad de otras funciones independientemente de la presencia de Ca^{2+} (Figura 2). Entre estas últimas, unir e hidrolizar GTP y actuar como una proteína G [Nakaoka, H *et al.*, 1994]; actuar como una proteína con actividad disulfuro isomerasa [Hasegawa, G *et al.*, 2003], y funcionar como una proteína quinasa [Mishra, S *et al.*, 2004].

De todas las reacciones enzimáticas que la TG2 puede catalizar, el entrecruzamiento de proteínas es la más estudiada. La propia TG2 puede entrecruzarse mediante sus residuos de lisina a varios sustratos conteniendo residuos de glutamina, incluyendo a proteínas de la matriz extracelular como fibrina y fibrinógeno. Otro tipo de entrecruzamiento puede darse cuando la proteína sustrato presenta simultáneamente residuos activos de lisina y glutamina. En estos casos, la TG2 permite la generación de enlaces isopeptídicos intramoleculares, que pueden afectar la conformación y estabilidad de la proteína, así como su interacción con otras proteínas. Sin embargo, el tipo de entrecruzamiento más común catalizado

por la TG2 involucra la formación de enlaces isopeptídicos intermoleculares entre varias proteínas sustrato. En estos casos, la TG2 permite generar heterocomplejos proteicos altamente estables [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012].

Adicionalmente, la TG2 posee actividades no enzimáticas independientes de Ca^{2+} , no relacionadas a su función de transamidación. Dichas actividades suelen darse especialmente en el ambiente extracelular, al interactuar con una amplia gama de proteínas de superficie, participando en importantes procesos fisiológicos incluyendo la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación celular, y la estabilización de la matriz extracelular [Odi, BO *et al.*, 2014].

1.1.3 Estructura y regulación de la actividad

Estructuralmente, la TG2 es similar al resto de los miembros de la familia, excepto por algunas características que no son compartidas con otras transglutaminasas [Odi, BO. *et al.*, 2014]. La TG2 es una proteína de 80 kDa compuesta por 687 aminoácidos (aa), que consta de cuatro dominios globulares. Posee un dominio N-terminal en forma de sandwich- β (aa 1-139) el cual contiene los sitios de unión a fibronectina e integrina; un dominio central (aa 40-460) clave para la actividad de transamidación, ya que contiene la tríada catalítica compuesta por los residuos de Cys277-His335-Asp358 junto con dos residuos de triptófano (W241 y W332) que actúan estabilizando el producto intermediario de la reacción; y dos dominios C-terminales en forma de barriles- β (aa 461-586 y aa 587-687) [Murthy, SN. *et al.*, 2010; Savoca, MP. *et al.*, 2018]. A diferencia de otras transglutaminasas, la TG2 contiene un sitio de unión a nucleótidos localizado en la grieta entre el centro catalítico y el primer barril- β [Liu, S. *et al.*, 2002]. Dicha secuencia es codificada por el exón 10 del gen de la TG2, que se caracteriza por poseer poca homología con el mismo exón en otras transglutaminasas [Odi, BO. *et al.*, 2014]. Aunque no se cuenta con información estructural de cristalografía, estudios de predicción estructural basados en otras transglutaminasas y ensayos de mutagénesis han ayudado a dilucidar los sitios de unión a Ca^{2+} en la TG2 [Casadio, R. *et al.*, 1999]. El consenso actual es que la TG2 posee 6 sitios de unión a Ca^{2+} , todos los cuales están ubicados en el dominio central [Kiraly, R. *et al.*, 2009] y algunos de ellos son distorsionados cuando la enzima une GTP/GDP [Liu, S. *et al.*, 2002].

Para evitar que se den reacciones de entrecruzamiento o deamidación aleatorias sobre la amplia variedad de proteínas que contienen glutamina o lisina en su superficie, la actividad enzimática de la TG2 debe ser altamente regulada. Dicha regulación se lleva a cabo a través de distintos cofactores, los cuales son capaces de alterar la organización espacial de los cuatro dominios de la TG2. Los principales reguladores de la actividad enzimática de la TG2 son Ca^{2+} y GTP. La actividad de

transamidación de la TG2 es controlada positivamente por Ca^{2+} y negativamente por GTP [Lee, CS. *et al.*, 2017]. Cuando la enzima une GTP/GDP, se favorecen interacciones entre el centro catalítico y los dominios C-terminales, lo que genera una estructura más cerrada y compacta. Esto reduce la accesibilidad y la actividad del sitio activo para la reacción de transamidación [Liu, S. *et al.*, 2002]. Por otro lado, la TG2 presenta una activación alostérica mediada por Ca^{2+} . La unión de Ca^{2+} altera la conformación de la proteína al separar aún más los dominios C-terminales, permitiéndole a la TG2 adquirir una conformación abierta o extendida, en donde el sitio activo queda expuesto. Esta conformación abierta es la que se asocia con la reacción de entrecruzamiento de la TG2 [Pinkas, D. M. *et al.*, 2007].

En condiciones fisiológicas, la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol de la célula ($\sim 10^{-7}$ M) suele no ser suficiente para mantener a la TG2 en su estado activo para la reacción de entrecruzamiento. Adicionalmente, los niveles de GTP libre en el citosol ($\sim 100\text{-}150$ μM) exceden a la concentración necesaria para mantener a la enzima inhibida y, por lo tanto, mantenerla en la conformación cerrada unida a GTP. Sin embargo, se han identificado múltiples sustratos de la TG2 para la reacción de transamidación en el interior celular. Esto sugiere que aumentos locales en los niveles citosólicos de calcio generados por la liberación de Ca^{2+} desde compartimentos intracelulares o por ingreso desde el exterior celular durante situaciones de estrés como daño celular o apoptosis, podrían facilitar la activación de TG2 promoviendo la transición a la estructura conformacional abierta, la cual expone el sitio activo para los sustratos [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012; Lai, TS. *et al.*, 2017].

El calcio y GTP/GDP no son los únicos reguladores de la actividad de la TG2. La enzima es también capaz de responder a las condiciones oxidativas en el ambiente extracelular. Bajo condiciones oxidativas, se afecta la accesibilidad de la cisteína perteneciente al sitio activo, lo que resulta en la inactivación de la actividad de transamidación de la enzima. Por el contrario, la reducción de la TG2 resulta en una conformación abierta y activa para la reacción de entrecruzamiento. Por lo tanto, las características del ambiente oxidativo extracelular explican por qué la TG2 localizada fuera de la célula suele encontrarse en un estado inactivo para la actividad de transamidación, a pesar de los bajos niveles de GTP y la alta concentración de Ca^{2+} [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012; Savoca, MP. *et al.*, 2018]. Esto sugiere que la TG2 puede adoptar tres conformaciones distintas. Una forma inactiva unida a GTP, una forma inactiva unida a Ca^{2+} pero en el estado oxidado, y una forma reducida activada por unión a Ca^{2+} .

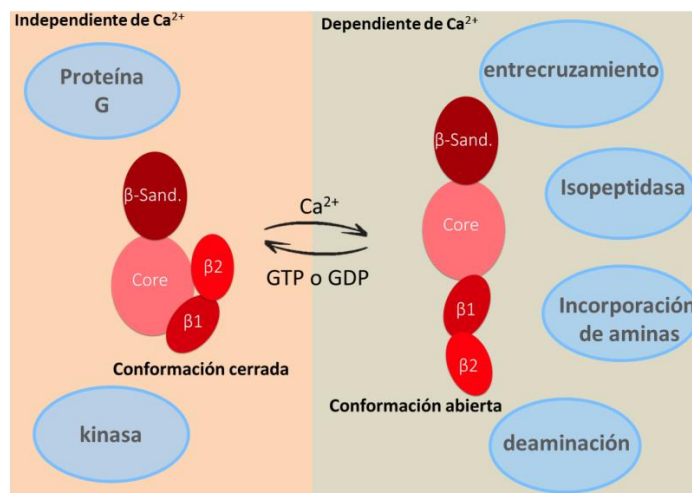


Figura 2 - Principales actividades de la TG2 y su regulación por Ca²⁺/nucleótidos (modificado de Tatsukawa, H. *et al.*, 2016).

1.1.4 Regulación de la expresión

El gen que codifica para la transglutaminasa tisular en humanos (*TGM2*) se localiza en el cromosoma 20q11-12 y consiste en 40 kb, los cuales se transcriben en un ARN primario de 5 kb que contiene 13 exones y 12 intrones [Bianchi, N. *et al.*, 2018]. La expresión de TG2 varía mucho en diferentes tipos celulares, pudiendo presentar una expresión constitutiva alta o niveles casi indetectables de la enzima. La expresión ubicua podría deberse a la elevada expresión de TG2 en células que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el organismo, como fibroblastos, células endoteliales y de músculo liso. Adicionalmente, los eritrocitos también muestran una elevada expresión de la enzima [Bergamini, CM. *et al.*, 2011].

La expresión de TG2 se regula principalmente a nivel transcripcional. *TGM2* se encuentra bajo el control de un promotor, el cual es sensible a múltiples factores transcripcionales y una amplia variedad de moléculas, pudiendo ser inducida en respuesta a diversos factores estresantes que incluyen lesiones, inflamación, oxidantes, hipoxia, citocinas y factores de crecimiento (Figura 3). El promotor del gen de la TG2 contiene elementos de respuesta para dos importantes inductores de estrés, como la inflamación y la hipoxia. *TGM2* contiene un sitio de unión a NFκB, el cual estimula su activación. Por lo tanto, cuando ocurre un proceso inflamatorio y la vía del factor NFκB es activada, se favorece la transcripción del gen [Mirza, A. *et al.*, 1997]. Diversas citocinas que son liberadas durante el transcurso de una inflamación son capaces de activar la transcripción de *TGM2*. TNFα, el cual es liberado en altos niveles durante una inflamación, es capaz de promover la activación de *TGM2* [Bayardo, M. *et al.*, 2012]. Otras citocinas inflamatorias como IL-1β e IL-6, también son capaces de estimular la expresión de TG2 [Suto, N. *et al.*,

1993; Johnson, K. et al., 2001]. *TGM2* también contiene un elemento de respuesta para HIF-1, por lo tanto, situaciones de hipoxia celular podrían estimular la generación de TG2 [Jang, G. Y. et al., 2010]. La producción de TG2 también es favorecida por TGF- α , vitamina D y por varios estímulos como luz UV, estrés oxidativo e infección viral [Lai, TS et al., 2017]. Se ha demostrado que el factor de crecimiento transformante (TGF- β) es capaz de alterar la transcripción de *TGM2*. TGF- β regula la expresión de TG2 de manera dependiente de tejido, actuando como activador y aumentando los niveles de TG2 (por ejemplo, en fibroblastos y muchos otros tipos celulares) o como inhibidor de su expresión (por ejemplo, en epitelio) [George, MD. et al., 1990].

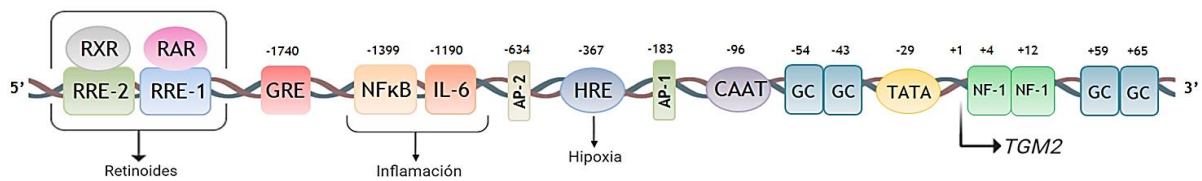


Figura 3 - Principales elementos reguladores de la expresión de la TG2 en humanos (modificado de Gundermir, S. et al., 2012).

1.1.5 Variantes de *splicing*

Se ha demostrado que el gen que codifica para la TG2 es regulado mediante *splicing* alternativo, generando formas más cortas del ARNm que codifican para distintas variantes de la proteína (**Figura 4**). Si bien se conocen los procesos de *splicing* alternativo que generan las variantes en cada caso, no hay información respecto a los mecanismos que los regulan [Nurminskaya, MV. et al., 2012].

De acuerdo a la sugerencia del HGNC (HUGO *Gene Nomenclature Committee*), las variantes de TG2 se denominan utilizando nombres idénticos (TGM2_v) seguidos de un número que indica el orden cronológico de su identificación [Phatak, VM. et al., 2013]. En humanos, se han reportado cuatro variantes de *splicing* de la TG2, las cuales son coexpresadas con la versión canónica de la enzima, denominada TGM_v1, de 687 aminoácidos. Por lo tanto, además de TGM_v1, se producen variantes de 675, 646, 548 y 349 aminoácidos, denominadas TGM_v4a, TGM_v4b, TGM_v2 y TGM_v3, respectivamente [Nurminskaya, MV. et al., 2012].

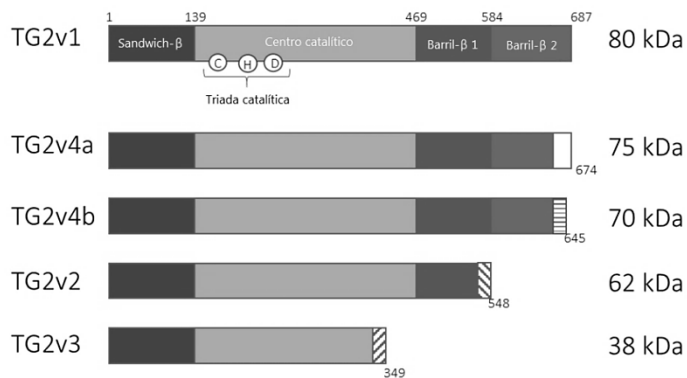


Figura 4 - Variantes de *splicing* de la TG2. Los cuadros grises representan los dominios proteicos de la TG2. Se indica la longitud en aminoácidos de cada dominio y de la proteína total. Los cuadros blancos y con los distintos patrones representan secuencias de aminoácidos alternativas. La triada catalítica formada por cisteína (C), histidina (H) y ácido aspártico (D) está representada en el dominio central (modificado de Lai, TS. *et al.*, 2013).

La principal diferencia entre la versión canónica (TGM2_v1) y las distintas variantes, es su extremo C-terminal. Todas las variantes de *splicing* de la TG2 pierden su extremo C-terminal hasta cierto punto, lo que trae consecuencias en sus estructuras, mecanismos de regulación y actividades catalíticas.

Se cree que todas las variantes de TG2 mantienen la actividad de entrecruzamiento [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012]. Al igual que la versión canónica de TG2, dichas variantes participan en reacciones dependientes de Ca^{2+} como el entrecruzamiento de proteínas, la incorporación de aminas a proteínas y la deamidación, tanto dentro como fuera de la célula, participando en la estabilización de la matriz y en las interacciones celulares mediante integrinas y fibronectinas [Bianchi, N. *et al.*, 2018].

Dado que las variantes presentan extremos C-terminales incompletos, pierden el sitio de unión a GTP parcial o totalmente. Por lo tanto, no se espera que el GTP actúe de la misma manera que en TG2, inhibiendo la actividad de transamidación. Las variantes podrían escapar a la regulación fisiológica por GTP, aunque los niveles intracelulares del mismo sean altos. Esto trae como consecuencia que las variantes sean más sensibles a la activación por Ca^{2+} , ya que aumentos transitorios de los niveles de Ca^{2+} en el citosol podrían ser suficientes para activarlas. El extremo C-terminal de la TG2 sirve como sitio de unión para proteínas como la fosfolipasa $\text{C}\delta 1$ (PLC $\delta 1$), y GPCRs como el receptor adrenérgico $\alpha 1$. Adicionalmente, se cree que una secuencia señal de exportación al núcleo se encuentra en dicho extremo. Por lo tanto, la pérdida de aminoácidos en el extremo C-terminal podría afectar las interacciones de las variantes de TG2 con dichas proteínas, así como contribuir al patrón de localización de las variantes dentro de la célula [Lai, TS. *et al.*, 2013].

Tabla 1 – Variantes de *splicing* identificadas de TG2 en humanos.

Variante de TG2	Alias	Tamaño del ARNm (pb)	Tamaño de la proteína (KDa)
TGM2_v1	Forma canónica	245	80
TGM2_v2	TGH, Tgase s. TG2-S	153	62
TGM2_v3	TGH2	226	38
TGM2_v4a	tTGv1	214	75
TGM2_v4b	tTGv2	214	70

En 1992, la variante de *splicing* de TG2, TGM_v2, fue detectada en células de eritroleucemia [Fraij, BM. *et al.*, 1992]. Dicha variante consta de 548 aminoácidos, de los cuales 538 son idénticos a la versión canónica de la TG2, y pierde 138 aminoácidos del extremo C-terminal. Curiosamente, TGM_v2 y la versión canónica de TG2, pueden tener efectos opuestos intercambiables dependiendo del tipo celular participando tanto en procesos de diferenciación como de muerte por apoptosis [Sestito, C. *et al.*, 2018]. Se observó que la tasa de actividad de hidrólisis de GTP de TGM_v2 era mayor que la de la versión canónica, sin embargo, presentaba una afinidad débil por GTP ya que la unión era casi indetectable. Esto puede entenderse teniendo en cuenta que niveles de unión a GTP casi indetectables no significa que la proteína debe presentar una baja actividad de hidrólisis de GTP. Dado que TG2 presenta una alta afinidad por GTP/GDP, es probable que tenga un “tiempo de recambio” lento para el reemplazo de una molécula de GTP por GDP. Por lo tanto, variantes de *splicing* como TGM_v2, con una afinidad más débil por GTP, pueden presentar tasas de hidrólisis de GTP mucho más altas. La importancia biológica del alto nivel de hidrólisis de GTP dado por TGM_v2 permanece desconocido [Lai, TS. *et al.*, 2013]. Sin embargo, se ha demostrado que dicha variante, presenta una actividad de transamidación muy reducida [Antonyak, MD. *et al.*, 2006].

Al igual que TGM_v2, la variante TGM_v3 fue detectada en células de eritroleucemia, y se observó que dichas variantes son generadas por eventos de *splicing* alternativo tradicionales, mediante la incorporación del intrón X y VI (mecanismo de retención de intrón) [Fraij, BM. *et al.*, 1996], produciendo formas truncadas de TG2 con distintos extremos C-terminales. TGM_v3 corresponde a la variante de *splicing* más corta, la cual consiste de solo 349 aminoácidos, de los cuales 286 son compartidos con la versión canónica. TGM_v3 no ha sido completamente caracterizada, y sus funciones permanecen desconocidas. Sin embargo, se observó que el ARNm correspondiente a TGM_v3 aumentaba significativamente en leucocitos de pacientes con enfermedad celíaca en comparación con pacientes sanos, lo que sugiere un papel de dicha variante en esta enfermedad [Lai, TS. *et al.*, 2013].

Finalmente, las variantes TGM_v4a y TGM_v4b fueron identificadas en células de músculo liso vascular, células endoteliales y leucocitos; y se observó que dichas variantes eran idénticas a la versión canónica de la TG2 en sus 622 aminoácidos iniciales, pero presentaban diferentes extremos C-terminales de 52 y 23 aminoácidos, respectivamente [Lai, TS. *et al.*, 2007]. Se observó que las variantes TGM_v4a y TGM_v4b son generadas mediante un evento de *splicing* alternativo no tradicional [Phatak, VM. *et al.*, 2013], que resulta en la formación de variantes de tamaño similar a la versión canónica de TG2, pero al igual que TGM_v2 y TGM_v3, poseen extremos C-terminales alternativos. Se observó que la pérdida de la secuencia C-terminal en cada variante TGM_v4a y TGM_v4b, resultó en una reducción de la actividad de transamidación dependiente de Ca^{2+} de las enzimas, así como de su estabilidad *in situ*. Sin embargo, dichas variantes presentaban un aumento en la actividad de hidrólisis de GTP, eran activas en presencia de GTP, y mantenían la capacidad de unir fibronectina [Lai, TS. *et al.*, 2007].

Estudios de la expresión de TG2 y de sus variantes en tejidos normales demostraron que en general, la forma canónica presenta los niveles más altos de expresión, seguida por TGM_v2, TGM_v4a, TGM_v4b y finalmente TGM_v3 [Phatak, VM. *et al.*, 2013]. Debido a las alteraciones en los mecanismos de regulación y en sus actividades catalíticas, la expresión de diferentes variantes de TG2 podría ser útil para dictaminar las múltiples funciones biológicas de la enzima y sus alteraciones en situaciones patológicas.

1.1.6 TG2 en procesos fisiológicos

Debido a su ubicua expresión y amplia gama de actividades enzimáticas y no enzimáticas que puede llevar a cabo, la TG2 es capaz de participar en la regulación de diversas funciones celulares, incluyendo la adhesión celular, el ciclo celular y apoptosis, la estabilización de la matriz extracelular, el crecimiento y diferenciación celular y la transducción de señales.

Señalización celular

La transglutaminasa tisular es capaz de participar en diversas vías de señalización celular debido a que su capacidad de unir e hidrolizar GTP le permite funcionar como una proteína G, asociada a distintos tipos de receptores de membrana. El receptor asociado a proteína G (GPCR) más estudiado que interacciona con la TG2, es el receptor adrenérgico $\alpha 1$ [Feng, JF. *et al.*, 1999a]. En ausencia de estímulo externo que active al GPCR (epinefrina para el caso del receptor adrenérgico $\alpha 1$) la TG2 une GDP y forma un complejo con la proteína de

unión a Ca^{2+} , calreticulina; la cual regula las funciones de la TG2 suprimiendo tanto la actividad de GTPasa como la de transamidación, por lo tanto, mantiene a la TG2 en un estado inactivo para la señalización [Feng, JF. *et al.*, 1999b]. La interacción de la TG2 con el receptor adrenérgico $\alpha 1$ en respuesta a la estimulación por epinefrina genera la disociación de TG2-GTP de la calreticulina, mediante el intercambio de GDP por GTP. La TG2 es luego capaz de interactuar directamente con la fosfolipasa $\text{C}\delta 1$ (PLC $\delta 1$) y activarla, estimulando la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y provocando un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . La desactivación ocurre cuando la TG2 hidroliza el GTP unido a GDP debido a su actividad intrínseca de GTPasa, y se asocia nuevamente con calreticulina [Feng, JF. *et al.*, 1996]. Como se mencionó, la TG2 en su función de proteína G no actúa únicamente interactuando con el receptor adrenérgico $\alpha 1$. Se han descubierto diversos receptores de membrana que utilizan a la TG2 como proteína G, como el receptor de tromboxano A2 [Veza, R. *et al.*, 1999] y el receptor de oxitocina [Baek, KJ. *et al.*, 1996].

Se demostró que la actividad GTPasa y la capacidad asociada de señalización celular de la TG2 son independientes de su actividad de transamidación [Chen, S. *et al.*, 1996]. En el citosol y en condiciones fisiológicas, se considera altamente probable que la actividad GTPasa y de proteína G asociada a un GPCR de la TG2 se encuentren activas, debido a la alta concentración de GTP.

Adhesión y migración celular

Las integrinas son receptores de membrana que reconocen mayormente componentes de la matriz extracelular y participan en el anclaje de las células a la matriz y en la transducción de señales. La TG2 de la superficie celular puede interactuar directamente mediante enlaces no covalentes con los dominios extracelulares de al menos tres distintas subunidades β de la familia de integrinas, $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 5$; colaborando en los procesos de adhesión celular. La formación de los complejos TG2-integrina se da independientemente de su actividad de transamidación, y no se ha encontrado evidencia de que la integrina puede actuar como sustrato enzimático para TG2 u otras transglutaminasas [Akimov, SS. *et al.*, 2000].

La fibronectina es una glicoproteína que está presente en la matriz extracelular y es uno de los sustratos de la TG2 más conocidos, uniéndose con gran afinidad al sitio de unión a fibronectina ubicado en el dominio N-terminal en forma de sandwich- β de la TG2 con una estequiometría de 2:1 [LeMosy, EK. *et al.*, 1992], independientemente de la presencia de Ca^{2+} o de las actividades de transamidación y GTPasa de la TG2 [Akimov, SS. *et al.*, 2000].

TG2 es capaz de formar complejos estables con integrina y fibronectina. La afinidad de la unión integrina-fibronectina es relativamente baja, por lo tanto, la interacción no covalente estable entre la TG2 y la integrina y fibronectina sugiere que la TG2 de la superficie celular aumenta la efectividad de la interacción de las células con las moléculas de fibronectina actuando como una molécula “puente” o “adaptadora” [Akimov, SS. *et al.*, 2000]. Adicionalmente, al interactuar directamente con fibronectina, la TG2 también es capaz de formar complejos de adhesión mediante HSPG (sindecan-4) de la superficie celular [Telci, D. *et al.*, 2008]. La habilidad de la TG2 de promover la adhesión de las células a la matriz extracelular y la migración celular, dependen de estas interacciones.

La colaboración entre integrinas y la TG2 en la adhesión celular también se ve reflejada en la alteración del estado de las integrinas por la TG2 de la superficie celular, aún en ausencia de fibronectina, al promover el agrupamiento de integrinas y de esta manera, activar diversas vías de comunicación intracelulares que modulan la actividad de *quinasas de adhesión focal* (FAK), de la GTPasa RhoA y su molécula objetivo en la cascada de señalización, la *proteína quinasa dependiente de RhoA* (ROCK), entre otras. Esto contribuye con el aumento en la formación de adhesiones focales y en la contractilidad del esqueleto de actina-miosina de las células, eventos necesarios para la supervivencia y migración celular [Janiak, A. *et al.*, 2006]. Por lo tanto, la TG2 de la superficie celular es muy importante para los procesos de señalización celular mediados por integrinas.

TG2 también cumple otras funciones en la matriz extracelular que sí son dependientes de su actividad de transamidación. El entrecruzamiento mediado por TG2 de proteínas de la matriz aumenta la rigidez de los sustratos necesarios para que se den los procesos de adhesión celular, y genera la formación de polímeros altamente estables y ordenados que promueven el agrupamiento de las integrinas de la superficie celular, amplificando la señalización dependiente de integrinas hacia el interior celular [Belkin, AM. *et al.*, 2005]. Adicionalmente, las modificaciones catalizadas por TG2 sobre proteínas de la matriz pueden provocar cambios en sus estructuras y llevar a la exposición de los sitios de unión a las células [Nishimichi, N. *et al.*, 2011]. En conjunto, estos efectos de las reacciones de transamidación sobre las proteínas de la matriz incrementan la unión de las células a la matriz y promueven los procesos de señalización hacia el interior celular [Nurminskaya, MV. *et al.*, 2012].

Apoptosis

La apoptosis es un proceso de gran importancia biológica que desempeña un papel fundamental en la homeostasis de los tejidos, así como en la enfermedad. Con

respecto a la muerte celular, el rol de la TG2 es complejo, ya que puede actuar como un facilitador o un atenuador del proceso de apoptosis [Fesus, L. *et al.*, 2005]. Se ha demostrado que células que entran en el proceso de apoptosis muestran un nivel aumentado de expresión de TG2. Por lo contrario, su inhibición resulta en una disminución de la propensión de las células a morir por apoptosis [Mehta, K. *et al.*, 2006]. Actualmente, se cree que la TG2 sensibiliza a las células para la apoptosis cuando se activa su actividad de transamidación, en cambio, es protectora cuando su actividad de transamidación se encuentra inactiva [Milakovic, T. *et al.*, 2004]. La activación de la TG2 intracelular, la cual es mayormente inactiva excepto en condiciones de estrés, puede depender del nivel de entrada de calcio. Cuando varios estímulos aumentan la concentración de Ca^{2+} en el citosol por encima de cierto umbral, la actividad de transamidación de la TG2 ya no es inhibida por GTP y facilita los procesos de muerte celular. Agentes estresantes como la radiación ultravioleta pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS) y desencadenar la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico, lo que resulta en la activación de la TG2 y en el entrecruzamiento de proteínas intracelulares, lo que provoca el inicio del proceso de apoptosis. También se ha demostrado que el estrés oxidativo y los altos niveles de ROS que se generan desencadenan la entrada de Ca^{2+} a la célula, lo que resulta en la activación de TG2 y, como consecuencia, en la muerte celular [Caccamo, D. *et al.*, 2011].

Se ha sugerido que los enlaces isopeptídicos formados por la actividad de transamidación de la TG2 son funcionalmente importantes para la apoptosis, ya que previenen la inflamación al garantizar que los contenidos del interior de las células no sean liberados al entorno extracelular al morir [Nicholas, B. *et al.*, 2013]. Además, TG2 es capaz de promover la producción de moléculas quimioatrayentes y la liberación de fosfatidilserina para estimular la migración de macrófagos al sitio de apoptosis y facilitar el reconocimiento de las células apoptóticas, respectivamente [Fesus, L. *et al.*, 2005].

El efecto antiapoptótico de TG2 es independiente de su actividad de transamidación y no requiere de calcio. La TG2 ubicada en el núcleo protege a las células de la muerte al interaccionar con diversas proteínas que regulan la transcripción de importantes genes antiapoptóticos [Bohem, JE. *et al.*, 2002]. Además, la TG2 ubicada en el espacio extracelular asociada con complejos de integrinas en la superficie celular, podría participar en diversas vías de señalización antiapoptóticas hacia el interior celular, estimulando la supervivencia de la célula [Mehta, K. *et al.*, 2006]. Por lo tanto, se cree que los efectos pro- y antiapoptóticos de la TG2 dependen de las vías de señalización que son activadas y la localización de la proteína, con la TG2 nuclear y extracelular actuando como atenuadora de la apoptosis o antiapoptótica, y la TG2 citosólica como facilitadora o proapoptótica.

1.2 Monocitos y macrófagos

Los monocitos y los macrófagos residentes de tejido junto con las células dendríticas pertenecen a lo que se denomina el sistema fagocítico mononuclear, el cual consiste en células que históricamente se pensaba tenían un origen en común y cuya función principal es la fagocitosis [Guilliams, M. *et al.*, 2014]. Los monocitos se originan en la médula ósea y se liberan al torrente sanguíneo [Gordon, S. *et al.*, 2005]. En humanos, los monocitos constituyen aproximadamente un 10% del total de leucocitos en sangre, pueden permanecer en circulación hasta 1 o 2 días, después de los cuales, si no han sido reclutados en ningún tejido, mueren y son eliminados [Italiani, P. *et al.*, 2014]. Los macrófagos residentes de tejido son células heterogéneas y versátiles que se encuentran en prácticamente todos los tejidos de mamíferos adultos. En un principio, diversos estudios sugerían que ciertas poblaciones de macrófagos residentes de tejido como las células de Langerhans [Merad, M. *et al.*, 2002] o la microglia [Ajami, B. *et al.*, 2007], se mantenían de manera independiente de la contribución de monocitos circulantes. Luego se demostró que la mayoría de los macrófagos residentes de tejido derivan de la hematopoyesis temprana en el saco vitelino, colonizan los mismos antes del nacimiento, tienen capacidad de autorenovación y permanecen en la adultez, mantenidos en forma independiente a los monocitos [Hashimoto, D. *et al.*, 2013].

Durante la homeostasis y la inflamación, los monocitos circulantes dejan la circulación sanguínea e ingresan a los tejidos. Allí se diferencian en células efectoras después de la exposición al microambiente tisular, la matriz extracelular, los productos de secreción, moléculas de superficie de las células vecinas y productos microbianos [Nourshargh, S. *et al.*, 2014]. Los monocitos y macrófagos son una población heterogénea, expresan un amplio rango de fenotipos morfológicos y funcionales. Sin embargo, se pueden definir algunas funciones comunes como la fagocitosis de patógenos y restos celulares; procesamiento y presentación de antígenos iniciando el desarrollo de respuestas inmunes y la secreción de citocinas. Participan en la vigilancia y monitoreo de los cambios en los tejidos, actuando como células centinelas y efectoras, especialmente en el mantenimiento de la homeostasis tisular, mediante la eliminación de células apoptóticas o senescentes y mediante la remodelación y reparación de los tejidos [Wynn, TA. *et al.*, 2013].

Por lo tanto, se considera que estas células representan una de las poblaciones celulares más pleiotrópicas del sistema inmune, presentes en todos los tejidos del cuerpo y con un rol indispensable en la activación, instrucción y terminación de la respuesta inmune.

1.2.1 Plasticidad y polarización de macrófagos

Los monocitos y macrófagos son células que se caracterizan por tener una gran diversidad funcional y plasticidad [Locati, M. *et al.*, 2020]. La polarización de los macrófagos implica un proceso en el que estos, en respuesta a pistas de su entorno adquieren un fenotipo específico y una respuesta funcional [Moghaddam, AS. *et al.*, 2018] (Figura 5). Existen dos subpoblaciones como extremos del espectro de polarización con funciones diferentes que incluyen los macrófagos clásicamente activados o inflamatorios (M1) y los alternativamente activados o antiinflamatorios (M2) [Mosser, DM. *et al.*, 2009]. Esta clasificación de fenotipos polarizados se basa en experimentos realizados *in vitro* y a menudo no es transferible a lo que sucede *in vivo*. Si bien ambos fenotipos extremos también pueden identificarse *in vivo*, la mayoría de los macrófagos exhiben estados de polarización intermedios [Martinez, FO. *et al.* 2009]. Este fenómeno también se refleja durante un proceso inflamatorio, donde células M1, M2 y fenotipos intermedios de macrófagos se encuentran presentes simultáneamente y cada uno ejerce funciones específicas. Sin embargo, se considera que el fenotipo de macrófagos M1 se requiere predominantemente durante las primeras etapas de la inflamación, donde actúa liberando mediadores inflamatorios y atrayendo leucocitos y proporcionando defensa contra microorganismos [Yang, J. *et al.*, 2014]. En etapas posteriores del proceso de inflamación, el fenotipo de macrófagos M2 exhibe funciones estimulando la remodelación y reparación de tejidos y ayuda a resolver el proceso inflamatorio [Martinez, FO. *et al.* 2009].

Los macrófagos clásicamente activados se inducen por las citocinas relacionadas a las respuestas tipo 1, IFN γ y TNF α o por productos bacterianos como el LPS [Mosser, DM. *et al.*, 2009]. Aunque los macrófagos activados clásicamente muestran cierta variedad en su morfología dependiendo de su localización tisular, todos comparten sus características funcionales. Se caracterizan por presentar una actividad microbicida mejorada, debido a su capacidad de detonar mecanismos efectoros como muerte de parásitos intracelulares, lisis de células tumorales, producción y secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF α [O'Shea, JJ. *et al.*, 2008], producción elevada de aniones superóxido y radicales del oxígeno [Dale, DC. *et al.*, 2008], generación de óxido nítrico (NO) [MacMicking J. *et al.*, 1997] y aumento en la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y de la presentación antigénica asociada con células T colaboradoras tipo 1 (Th1) [Boehm, U. *et al.* 1997] Estos macrófagos activados clásicamente son componentes vitales para la defensa, pero su activación debe ser estrictamente controlada debido a que la gran cantidad de citocinas y mediadores que producen pueden provocar daños en los tejidos del huésped. Para proteger los tejidos del daño, la inflamación crónica es inhibida por mecanismos regulatorios dirigidos por la función antiinflamatoria de los macrófagos M2.

Los macrófagos M2 se consideran un conjunto de células relacionadas funcional y fenotípicamente, con un papel crítico en respuestas polarizadas tipo 2 como alergias y eliminación de parásitos, en la resolución de la inflamación, remodelación y reparación de tejidos, angiogénesis e inmunorregulación. Los macrófagos M2 muestran una variedad de programas funcionales, dependiendo de los estímulos que los generan. La polarización hacia un estado M2 se ha observado *in vitro* en respuesta a las citocinas relacionadas a respuestas tipo 2 como IL-4 e IL-13, a la activación concomitante de receptores de Fc-gamma (RFcγ) y receptores tipo Toll (TLR), a complejos inmunes y a citocinas antiinflamatorias como IL-10, TGF-β y glucocorticoides, y agonistas de TLR a través del receptor de adenosina [Moghaddam, AS. *et al.*, 2018].

Hasta el momento no se ha consolidado una definición clara de activación alternativa, debido a que se ha observado que los efectos de IL-4 en la generación de un fenotipo de macrófago activado alternativamente se solapan parcialmente con los inducidos por IL-13, IL-10, glucocorticoides y TGF-β, por lo que algunos autores los consideran en conjunto como activadores alternativos [Mosser, DM. *et al.*, 2003]. Por lo tanto, los distintos fenotipos relacionados al perfil M2 se suelen subdividir en cuatro categorías. Los macrófagos M2a inducidos por las citocinas IL-4 e IL-13 [Martínez, FO. *et al.*, 2008; Chistiakov, DA. *et al.*, 2015a;], los macrófagos M2b obtenidos mediante la activación de receptores Fc-gamma en presencia de estimulación de receptores tipo Toll (TLR) [Chistiakov, DA. *et al.*, 2015a], macrófagos M2c que incluye programas de diferenciación provocados por glucocorticoides, IL-10 o TGF-β [Martínez, FO. *et al.*, 2008; Zizzo, G. *et al.*, 2012] y macrófagos M2d inducidos por agonistas de TLR a través del receptor de adenosina [Hasko, G. *et al.*, 2007; Chistiakov, DA. *et al.*, 2015a].

Las acciones biológicas de IL-4 e IL-13 en monocitos y macrófagos se consideran de naturaleza antiinflamatoria, basadas en la regulación negativa de mediadores proinflamatorios como IL-1β, TNFα, IL-6, IL-8, IL-12, IFNγ, CCL2/MCP-1, entre otras. También se ha observado una regulación positiva inducida por IL-4 de varios receptores *scavenger* y de lectinas tipo C, incluido MRC1 y Dectina-1 [Martínez, FO. *et al.* 2006], así como una regulación negativa de la expresión de importantes moléculas de membrana como CD14, CD32, CD64 y CCR5 [de Waal, MR. *et al.* 1993]. Al contrario que el perfil M1, los macrófagos M2a no expresan la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), pero expresan altos niveles de arginasa 1 (Arg1), que sesga la vía metabólica del óxido nítrico (NO) hacia la producción de prolina. En consecuencia, estas células no pueden producir NO y están significativamente comprometidas en su capacidad microbicida contra patógenos intracelulares [Modolell, M. *et al.* 1995].

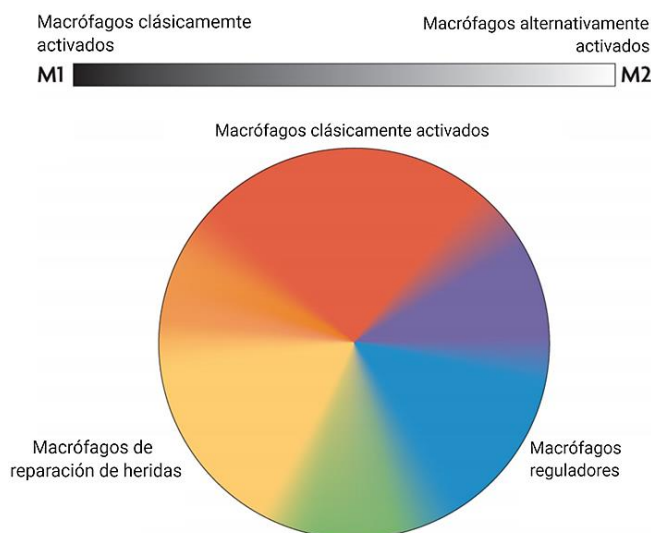


Figura 5 – Representación de los perfiles de polarización de macrófagos en forma de espectro cromático (modificado de Mosser, DM. *et al.*, 2009).

1.2.2 Modelos *in vitro*

Los estudios de monocitos y macrófagos a menudo se ven obstaculizados por las cantidades limitadas de monocitos humanos disponibles. Como es bastante difícil obtener grandes cantidades de monocitos puros en seres humanos, y con el objetivo de superar los problemas de vida útil limitada y la variabilidad interindividual que afecta a los macrófagos humanos derivados de monocitos, el uso de líneas celulares monocíticas se utilizan con frecuencia en diferentes áreas de investigación para dilucidar las funciones inmunológicas de dichas células [Tedesco, S. *et al.*, 2018].

La línea celular THP-1 fue aislada por Tsuchiya *et al.* de la sangre periférica de un paciente masculino de 1 año que padece leucemia monocítica aguda [Tsuchiya, S. *et al.*, 1980]. Comparte características con el monocito humano con respecto a numerosos criterios como la morfología, los productos de secreción, la expresión de oncogenes, la expresión de antígenos de membrana y la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos [Auwerx, J. *et al.*, 1991]. A diferencia de los monocitos humanos nativos, una línea celular como THP-1 ofrece la ventaja de representar una población homogénea, eliminando los problemas de variabilidad dependiente del donante, facilitando notablemente el análisis bioquímico. Esta línea celular ofrece la ventaja adicional de poder expandirse fácilmente *in vitro* y almacenarse en nitrógeno líquido en su estado no diferenciado [Chanput, W. *et al.*, 2014].

Las células THP-1 en el estado de monocitos se pueden diferenciar en un fenotipo similar a los macrófagos utilizando distintos agentes como forbol-12-

miristato-13-acetato (PMA), $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D ($vD3$) o el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Se considera que el PMA es el agente de diferenciación más eficaz para obtener macrófagos derivados de monocitos THP-1. [Chanput, W. *et al.*, 2014]. Bajo la influencia del PMA u otros estímulos, las células THP-1 dejan de proliferar, y luego de la diferenciación, las células THP-1 adquieren un fenotipo similar a los macrófagos, que imita a estas células en varios aspectos [Lund, ME. *et al.* 2016]. La principal característica que se observa es una alteración dramática en la morfología celular; las células adquieren una forma plana y ameboide, su núcleo se vuelve más irregular y se pueden reconocer vacuolas fagocíticas en su citoplasma. El proceso de diferenciación también se asocia con una mayor adherencia de las células a las placas de cultivo [Auwerx, J. *et al.*, 1991].

La mayoría de las investigaciones sobre polarización de macrófagos utilizan técnicas *in vitro* utilizando distintas líneas celulares. En general, se obtienen los macrófagos derivados del cultivo *in vitro* y luego son estimulados con distintos agentes polarizantes a M1 o M2. La polarización hacia un fenotipo M1 típicamente se realiza utilizando $IFN\gamma$ junto con un agonista de TLR, como LPS. Por otro lado, la polarización hacia M2 generalmente implica estimular a los macrófagos con IL-4 o IL-13. Esta metodología experimental está diseñada para imitar lo que podría suceder cuando los macrófagos se exponen a las células que producen las distintas combinaciones de citocinas, por ejemplo, $IFN\gamma$ para respuestas del tipo 1, o IL-4 e IL-13 en respuestas de tipo 2. La principal desventaja de la polarización *in vitro* es el hecho de que la población de macrófagos que se obtiene no es necesariamente representativa de los macrófagos encontrados *in vivo*, ya que pocos o ninguno de los ambientes encontrados *in vivo* son reflejados en las condiciones utilizadas en la polarización *in vitro*. Esto suele traer como consecuencia que exista una variación entre distintas configuraciones experimentales que se utilizan y en el uso de los marcadores para verificar el estado de la polarización [Murray, PJ. *et al.*, 2017].

Se ha observado que varios genes marcadores de los fenotipos M1 y M2 son regulados durante la polarización de macrófagos derivados de células THP-1. Distintas citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, IL- 1β , IL-6 e IL-8, así como la quimiocina MCP-1 (CCL2) pueden utilizarse como genes marcados del perfil M1. Por otro lado, tras la polarización hacia M2, pueden utilizarse distintos marcadores como MRC1 y Dectina-1. Se ha observado que los niveles de ARNm de la TG2 aumentan luego de la polarización de macrófagos derivados de THP-1 a un perfil M2, por lo que algunos autores la han propuesto como un posible marcador [Chanput, W. *et al.*, 2014; Tedesco, S. *et al.*, 2018].

1.3 Transglutaminasa tisular en monocitos y macrófagos

Hace más de 30 años, se observó la presencia de TG2 y FXIIIa en monocitos [Murtaugh, MP. *et al.* 1984; Muszbek, L. *et al.* 1985] y también en macrófagos [Murtaugh, MP. *et al.* 1983; Henriksson, P. *et al.* 1985]. Numerosos estudios han demostrado que las transglutaminasas, en particular la TG2 y el FXIIIa, participan en diversos procesos fisiológicos mediados por monocitos y macrófagos durante la inflamación, incluida la adhesión celular, la extravasación y la eliminación de células apoptóticas.

Para alcanzar los sitios de inflamación y llevar a cabo sus funciones, los monocitos circulantes requieren de la adhesión y extravasación celular. Se ha observado que la expresión de TG2 en monocitos aumenta durante el proceso de adhesión de los monocitos a células endoteliales [Thomas-Ecker, S. *et al.* 2007]. La eliminación de TG2 como la inhibición de la unión TG2-fibronectina disminuyen la adhesión de los monocitos en la fibronectina [Akimov, SS. *et al.* 2001]. El mismo resultado se observó inhibiendo la unión de la TG2 a las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$. Esto sugirió que la TG2 se requiere para la adhesión y extravasación de los monocitos. Cuando se analizó la posible función de FXIIIa en estos procesos de adhesión y extravasación de monocitos, no se observó ninguna contribución, por lo que se cree que únicamente participa la TG2 [Muszbek, L. *et al.* 1996]. Además, cuando los monocitos se diferencian a macrófagos luego de la adhesión, la expresión celular de TG2 aumenta, mientras que la de FXIIIa disminuye, lo que hace improbable que FXIIIa sea relevante para los procesos de adhesión de monocitos [Seiving, B. *et al.* 1991].

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que los niveles de TG2 aumentan drásticamente durante la diferenciación de monocitos a macrófagos, mediante estimulación con varios factores como ácido retinoico y PMA [Mehta, K. *et al.*, 1986]. El mecanismo molecular por el cual los monocitos sufren esta diferenciación morfológica y funcional durante la inflamación aún no ha sido caracterizado por completo. Sin embargo, se ha propuesto que TG2 juega un papel en dicho proceso. Esta idea se basa en observaciones *in vitro* de que la expresión de TG2 y la actividad de entrecruzamiento son relativamente bajas en el estado de monocitos, pero aumentan exponencialmente durante el proceso de diferenciación [Murtaugh, MP. *et al.* 1984].

La eliminación de las células apoptóticas por los macrófagos, también denominada eferocitosis, es crucial para la homeostasis de los tejidos y la resolución de la inflamación, al prevenir la necrosis secundaria y la liberación de mediadores inflamatorios [Korns, D. *et al.*, 2011]. La eferocitosis está mediada por la formación de una copa fagocítica que interacciona con las células apoptóticas y facilita su

envoltura por parte de los macrófagos [Toth, B. *et al.*, 2009]. Distintos estudios *in vitro* han confirmado que TG2 desempeña un papel en la capacidad eferocítica de los macrófagos, la cual generalmente está ausente en monocitos indiferenciados con baja expresión de TG2 [Leu, RW. *et al.*, 1982; Abe, S. *et al.*, 2000]. Además, Toth *et al.* demostraron que los complejos de TG2 con las integrinas $\beta 3$ en la superficie de los macrófagos son necesarios para la formación de los portales envolventes durante el proceso de fagocitosis. Aunque la eferocitosis a través de la interacción de TG2 con las integrinas se ha establecido claramente, la naturaleza precisa de los mecanismos involucrados sigue siendo un tema de investigación. Se ha observado que la eliminación defectuosa de las células apoptóticas como resultado de la ausencia de TG2 se asocia con inflamación y enfermedades autoinmunes. De hecho, ratones *knock out* para TG2 muestran signos de autoinmunidad debido a una eferocitosis insuficiente con el aumento de la edad, lo que respalda nuevamente a TG2 como mediador de la eferocitosis [Szondy, Z. *et al.*, 2003].

Si bien se ha demostrado la participación de TG2 en estos procesos llevados a cabo por monocitos y macrófagos, aún no se comprenden completamente los mecanismos que siguen. Por lo tanto, se necesita más investigación para determinar las actividades catalíticas o no catalíticas involucradas, los sustratos objetivos en monocitos y macrófagos, y las posibles contribuciones que podrían presentar las distintas variantes de *splicing* de la TG2 a estos procesos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Se pretende caracterizar la expresión de la TG2 en células THP-1 en el proceso de diferenciación a macrófagos y bajo la influencia de diferentes estímulos de polarización del perfil de macrófagos.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar el perfil de expresión de los ARN mensajeros de las cinco variantes de *splicing* de TG2 en el proceso de diferenciación de las células premonocíticas THP-1 a macrófagos.
2. Estudiar la expresión de los ARN mensajeros de las cinco variantes de *splicing* de la TG2 en macrófagos derivados de THP-1 en función del perfil de polarización, estimuladas con citocinas proinflamatorias, anti-inflamatorias y PAMPs.
3. Poner a punto la detección por inmunoblot de las variantes de *splicing* de la TG2.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

Las células THP-1 fueron cultivadas de acuerdo a sus especificaciones indicadas, utilizando medio RPMI 1640 (Capricorn) suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Capricorn) al 10%, 100 U/mL penicilina (Sigma) y 100 ug/mL estreptomycin (Sigma), a 37°C en una atmósfera controlada con CO₂ al 5%. El control sobre el crecimiento de las células se realizó mediante recuento en cámara de Neubauer. Las células se mantuvieron a una densidad mínima de 0,2 x 10⁶ cel/mL y una máxima de 1,0 x 10⁶ cel/mL.

3.2 Diferenciación de THP-1 a macrófagos

Para inducir la diferenciación a macrófagos, las células THP-1 fueron tratadas con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a una concentración de 1 µg/mL por 72 horas. Para los ensayos de expresión proteica, fueron sembradas 1,5 x 10⁶ células por pozo en placas de 6 pozos, mientras que en los ensayos de expresión de ARNm se sembraron 0,5 x 10⁶ células por pocillo en placas de 24 pocillos. Se obtuvieron muestras en distintas instancias de manera de realizar un seguimiento del proceso de diferenciación (**Figura 6**). Al día en el cual se sembraron las células se le denominó "Día -3" (d-3). En ese día se tomaron muestras de las células THP-1 en suspensión y se procedió a la obtención de los extractos celulares. Dichas muestras representan entonces a las células en el estado monocítico, sin diferenciar a macrófagos. Luego de 72 hs, en lo que se denominó "Día 0" (d0), se les realizó un cambio de medio a todos los pozos de manera de retirar el PMA, y se levantaron las células correspondientes a ese día. Dado que el proceso de diferenciación a macrófago involucra una adhesión de las células a la placa de cultivo, se utilizó tripsina para levantar las células en los ensayos de expresión proteica. Finalmente, se dejaron reposar las células por 48 horas, donde se levantaron las células cada 24 horas, obteniendo así, las muestras correspondientes al "Día 1" (d1) y "Día 2" (d2). En los ensayos de diferenciación para análisis de ARNm, las células se levantaron utilizando reactivo Trizol™ para proceder luego con la extracción de ARN total de las células. Las muestras correspondientes a los ensayos de expresión proteica fueron almacenadas a 4 °C, mientras que las muestras para los ensayos de expresión de ARNm se almacenaron a -80 °C.

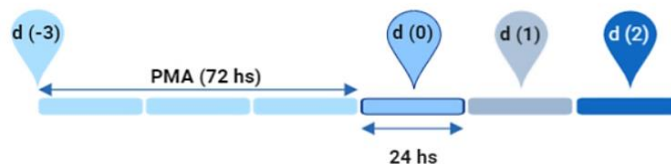


Figura 6 - Protocolo de diferenciación a macrófagos de las células THP-1.

3.3 Estudio de la respuesta de los macrófagos derivados de THP-1 a estímulos inflamatorios

Los macrófagos derivados de THP-1 fueron incubados con medio fresco suplementado con distintos mediadores inflamatorios. Se utilizó TNF α 10 ng/mL, LPS 50 ng/mL, IFN γ 20 ng/mL, y LPS junto con IFN γ para estudiar el efecto en conjunto de ambos estímulos. Luego de 24 horas se les realizó un cambio de medio a todos los pozos para remover los estímulos inflamatorios y se dejaron reposar las células por unas 24 horas adicionales (**Figura 7**). Finalmente, se levantaron las células con tripsina para los ensayos de expresión proteica y con Trizol para los ensayos de expresión de ARNm.

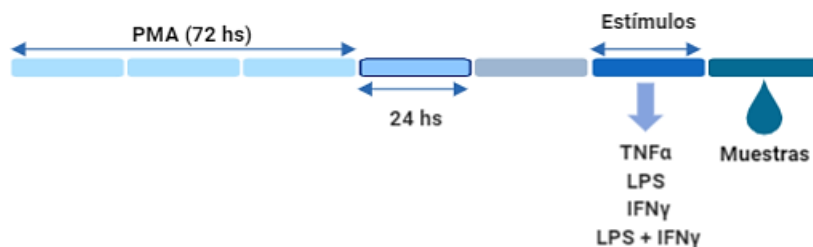


Figura 7 - Ensayo de diferenciación de las células THP-1 y estimulación de macrófagos con mediadores inflamatorios.

3.4 Polarización de macrófagos derivados de THP-1

Para la polarización de los macrófagos derivados de THP-1 se siguió el protocolo descrito por Stossi, F. *et al* (2012) (**Figura 8**). Las células THP-1 fueron tratadas con PMA 100 ng/mL por 24 h. Luego, se realizaron cambios de medio de cultivo cada 48 h durante 6 días. Para llevar a cabo la polarización, los macrófagos derivados de THP-1 fueron tratados con IFN γ 20 ng/mL para el perfil M1, y con IL-4 30 ng/mL para el perfil M2, por 24 horas [Stossi, F. *et al.*, 2012]. Las células fueron

levantadas con Trizol y junto con los sobrenadantes de los cultivos, se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

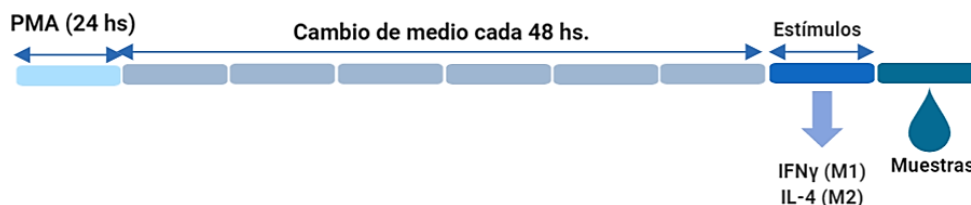


Figura 8 - Ensayo de polarización de los macrófagos derivados de THP-1 hacia los perfiles M1 y M2.

3.5 Análisis de la expresión de los ARNm de las variantes de *splicing* de TG2.

Extracción de ARN

Se procedió a realizar la purificación del ARN total de las células tratadas previamente con Trizol mediante tratamiento con cloroformo-isopropanol-etanol. La concentración y calidad del ARN extraído de las muestras fue analizada por espectrometría mediante el uso del equipo Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) midiendo a una longitud de onda de 260 nm. Para analizar si el ARN extraído se encontraba contaminado con proteínas, se calculó la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm, excluyendo aquellas muestras fuera del rango de 1,8-2. Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Retrotranscripción

Para eliminar contaminación por ADN genómico, se incubó 1 µg de ARN con la enzima DNAsa I (Thermo Fisher). por 30 minutos a 37 °C en termociclador (LifeECO, Bioer Technology) y luego por 10 minutos a 65 °C para inactivar la DNAsa I en presencia de EDTA 2.5 mM.

La retrotranscripción de las muestras se realizó incubando los ARN extraídos con 10 µmol de oligonucleótidos al azar como cebadores (Macrogen), dNTPS 0,5 mM (Thermo Fisher), ditiotreitól, DTT 0,5 mM (Invitrogen) y transcriptasa reversa M-MLV 10 U (Invitrogen), en un volumen final de 20 µL. Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado: 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 37 °C y 15 minutos a 70 °C. Finalmente, las muestras de ADNc fueron diluidas a la cuarta parte con agua libre de nucleasas (Qiagen) y almacenadas a -20 °C.

RT-qPCR

Se realizó PCR en tiempo real para cuantificar la expresión relativa de las variantes de *splicing* de TG2 y de distintos marcadores de polarización de macrófagos respecto a la peptidilprolil isomerasa A (PPIA), la cual fue utilizada como gen normalizador o *housekeeping*. Para eso, se utilizó el kit QuantiTec SyBr Green (Qiagen) y juegos de cebadores específicos. En todas las corridas se incluyeron tres réplicas de cada muestra y un blanco (sin molde). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial (5 minutos a 95 °C), seguida de 40 ciclos (15 segundos a 95 °C y 60 segundos a 60 °C). Las cantidades relativas de los ARNm en cada muestra se calcularon utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct_{muestra} - Ct_{housekeeping}$ [Livack, KJ. *et al.*, 2001].

Tabla 2 - Secuencias de los cebadores utilizados para la cuantificación por RT-qPCR

Variante de TG2	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
TG2_v1	Fw GCCAGTGCCTGGTCACTAACCA	Rv GGCCTTAGCCCTGCAAAGA
TG2_v2	Fw ACCGCTGAGGAGTACGTCTG	Rv AATGCTCCAGGAACACAGGGCT
TG2_v3	Fw GGTGAGTGGCATGGTCAACT	Rv AGGGCTCATGACCCACATC
TG2_v4a	Fw CCTTACGGAGTCCAACCTCA	Rv CTGGGATGTGGAGGTGCA
TG2_v4b	Fw CCTTACGGAGTCCAACCTCA	Rv CCTTACGGAGTCCAACCTCA
<hr/>		
Marcador M1		
MCP1 (CCL2)	Fw GCTCAGCCAGATGCAATCAA	Rv GCCTCTGCACTGAGATCTTCCT
iNOS	Fw CAAGTACGGCCGTTCTGA	Rv CACTCGTATTTGGGATGTTCCA
<hr/>		
Marcador M2		
Arg1	Fw GCTGCAGTGAATTGCACAGATAT	Rv GCTGCAGTGAATTGCACAGATAT
ManR (MRC1)	Fw GCCAGATACAAAAAGGACAAACA	Rv TTGTAAATAACCCACCATCTTCA
<hr/>		
Gen normalizador		
PPIA	Fw AACCACCAGATCATTCCTT	Rv GCGAGAGCACAAAGATTC
RPL13	Fw TATGAGTGAAAGGGAGCC	Rv ATGACCAGGTGAAAGTC

Elección del gen normalizador

Previamente a analizar la expresión de las variantes de *splicing* de la TG2, se realizó una prueba utilizando dos genes normalizadores, la proteína PPIA y la proteína ribosomal RPL13, para determinar cuál era la más adecuada dadas las condiciones del experimento. Se observó que la proteína RPL13 mostraba una mayor variación en su expresión durante el proceso de diferenciación a macrófagos de las células THP-1, mientras que la expresión de la proteína PPIA se mantenía

relativamente constante durante el mismo. Por lo tanto, se decidió proceder con los análisis de la expresión utilizando esta última proteína como gen normalizador.

3.6 Producción de citocinas por macrófagos derivados de THP-1 estimulados con mediadores inflamatorios

Se analizó la producción de distintos mediadores solubles mediante ELISA de captura, en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos derivados de THP-1 luego del tratamiento con los estímulos inflamatorios.

Para la cuantificación de las citocinas (IL-1 β , IL-6 y TNF α) se utilizaron los kits comerciales R&D y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos (Nunc), las cuales fueron sensibilizadas con 100 μ L del anticuerpo de captura por 16 horas a temperatura ambiente. Luego de realizar tres lavados con PBS-Tween 0,05%, se procedió con el bloqueo de las placas con 300 μ L de PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se repitieron los lavados y se agregaron 100 μ L de las muestras o las soluciones estándar de BSA diluidas en PBS-BSA 1%, durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de realizar los lavados, se incubaron las placas con 100 μ L del anticuerpo de detección diluido en PBS-BSA 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se agregaron 100 μ L de una dilución en PBS-BSA% de estreptomina conjugada a peroxidasa y se incubaron las placas 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizaron los lavados con PBS-Tween 0,05% y se incubaron las placas con 100 μ L de la solución de revelado (buffer acetato de sodio 0,1 M pH 5,5; TMB 6 mg/mL en DMSO; H₂O₂) durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Por último, la reacción se detuvo agregando 50 μ L de H₂SO₄ (2N) y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

3.7 Análisis de la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 a nivel proteico

Preparación de extractos proteicos

Las células en suspensión fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Luego se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 300 μ L de PBS y se centrifugó por 5 minutos en las mismas condiciones. El pellet obtenido se resuspendió en 100 μ L de buffer de lisis (Tris 5 mM, pH 6.8, EDTA 20 mM, SDS 0.1%, NP40 1%) y 14 μ L de inhibidor de proteasas 7X (Roche). Las

muestras fueron incubadas en hielo por 15 minutos. Luego, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y finalmente, se le agregaron 20 µL de buffer de corrida 6X a todas las muestras y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

SDS-PAGE

Para realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato sódico (SDS), se prepararon geles al 8% de acrilamida. Previo a la corrida electroforética, se hirvieron las muestras por 5 minutos. Luego fueron cargadas en el gel (30 µL), junto con 5 µL del marcador de peso molecular (LMW, Sigma) y 5 µL de una dilución 1/10 de la TG2 de cobayo (Sigma-Aldrich). La electroforesis se realizó a 90V hasta superar el gel concentrador y luego a 120V hasta finalizar la corrida.

Western blot

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno). Previo a la transferencia, se hidrató la membrana en metanol y luego se equilibraron la membrana y el gel en buffer de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 15% metanol). La transferencia se realizó *overnight* a un voltaje constante de 56V a 4°C. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, se realizó una tinción de la membrana con Rojo de Ponceau y se cortaron las membranas de manera de poder detectar distintas proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos en una corrida.

Se realizó el bloqueo de las membranas con PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Luego, se incubaron las membranas con una dilución en PBS-BSA 1%-Tween 0,05% del anticuerpo primario correspondiente, *overnight* a 4 °C. Se realizaron varios lavados de las membranas con PBS-Tween 0,05% y luego se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (PO) durante una hora en agitación suave.

Tabla 3 - Anticuerpos utilizados para la detección de TG2 mediante *western blot*.

Anticuerpo primario (αTG)	Anticuerpo conjugado a PO
T100, IgG (Invitrogen) 2G3, IgG (gentilmente cedido por F. Chirido [Di Niro, R. et al., 2005])	αIgG de ratón (Santa Cruz) αIgG de ratón (Thermo Scientific)

Luego se repitieron los lavados y finalmente se procedió con el revelado de las membranas con el sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) y la señal fue detectada utilizando un equipo GBOX Chemi System (SYNGENE).

4 RESULTADOS

4.1 Diferenciación a macrófagos de células THP-1

Las células THP-1 en suspensión crecen presentando formas redondeadas u ovoides. El tratamiento con PMA, un agente capaz de inducir la diferenciación celular provocó cambios importantes en la morfología de las células THP-1 hacia un fenotipo que se asemeja al de los macrófagos (**Figura 9**). Se observó que las células THP-1 dejaron de proliferar luego de 24 horas en presencia de PMA, y adquirieron una forma plana y ameboide, característica de los macrófagos, además de un incremento en la adherencia de las células a las placas de cultivo.

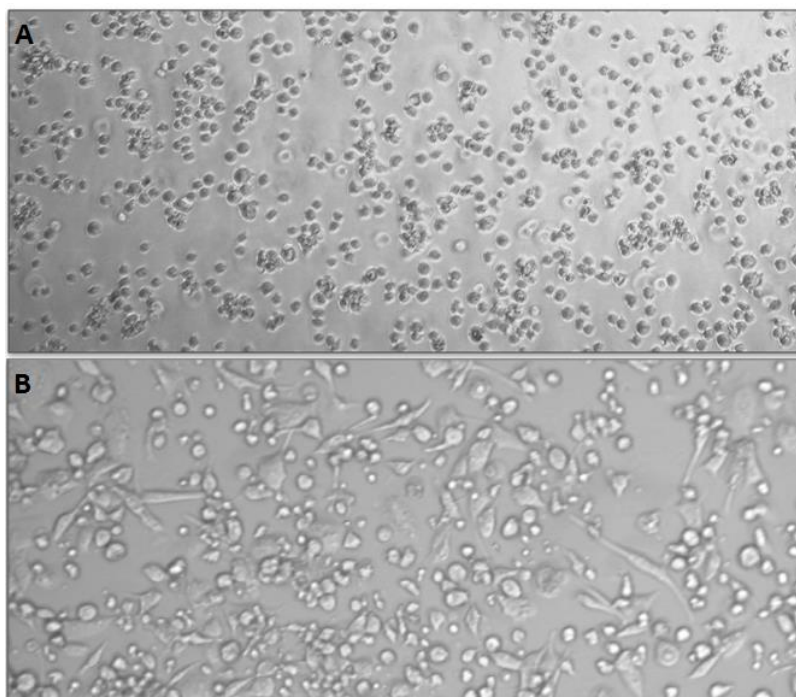


Figura 9 – Morfología de las células THP-1. **(A)** Células THP-1 en estado normal. **(B)** Células THP-1 luego de 72 horas de incubación con PMA 1 µg/mL.

4.2 Expresión de los ARNm de las variantes de *splicing* de TG2 en la diferenciación a macrófagos de células THP-1

Se analizó la expresión de las variantes de *splicing* de la TG2 durante el proceso de diferenciación a macrófagos de las células THP-1 (Ver *Figura 6, Materiales y métodos*). Se comparó la expresión de las muestras de d0, d1 y d2 con respecto a las muestras correspondientes a las células THP-1 en su estado

monocítico sin tratar con PMA (d-3), utilizando al PPIA como gen normalizador (Figura 10).

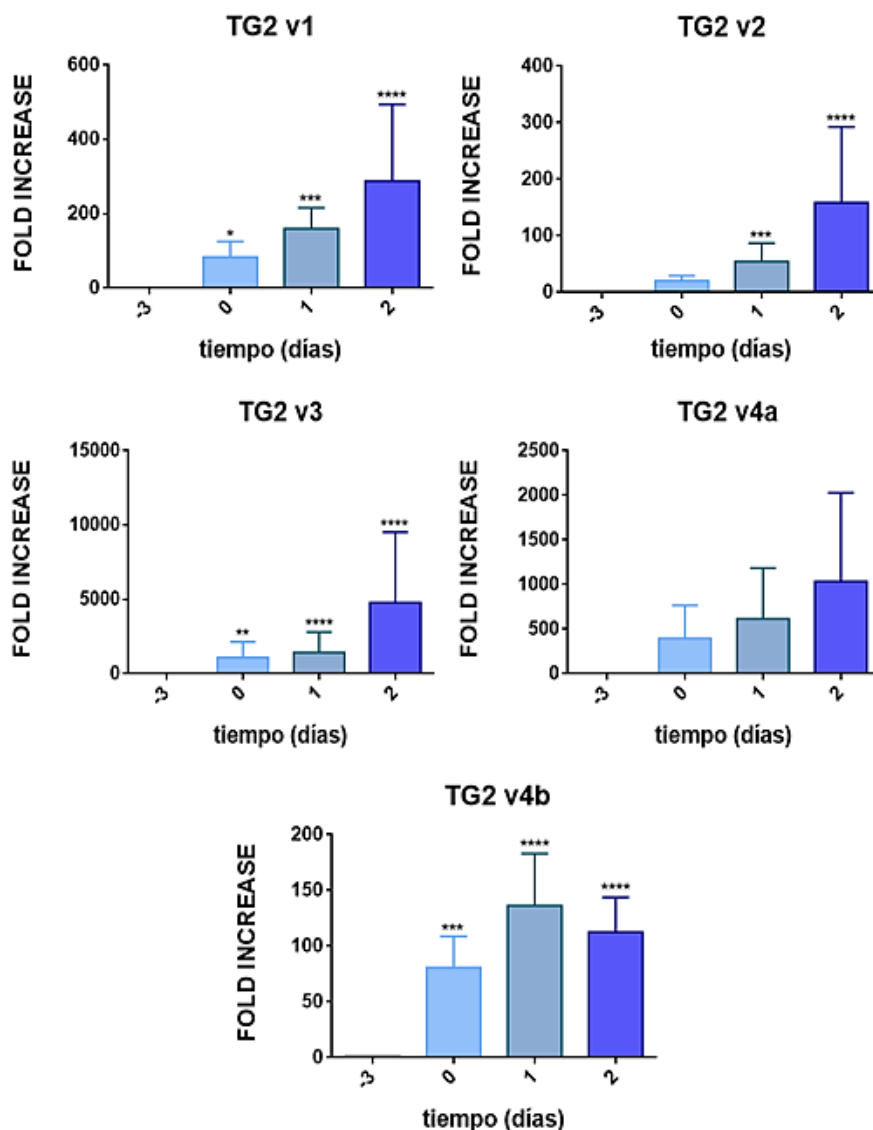


Figura 10 - Expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en células THP-1 durante el proceso de diferenciación a macrófagos, incubación con PMA 1 μ g/mL, 72 hs. Datos de cuatro experimentos independientes. Los datos se analizaron con *Two-way ANOVA Test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Como se muestra en la Figura 10 se observó que, durante la diferenciación a macrófagos, hubo un aumento significativo y progresivo de todas las variantes de TG2 hacia el día 2 (d2), aunque en diferente magnitud. Para las variantes TG2_v1, v3 y v4b, solo fueron necesarias 24 horas de tratamiento con PMA para obtener un aumento significativo en la expresión de la proteína respecto a las muestras control (THP-1 sin tratar con PMA). Por otro lado, para la variante TG2_v2, que tuvo los aumentos más discretos, fueron necesarias 48h (d1) para observar un aumento

significativo en la expresión. Los mayores incrementos relativos respecto al control del día -3 se observaron en las variantes TG2_v3. En el caso de la variante TG2_v4a, no hubo un aumento significativo de la expresión en ninguna de las instancias durante el proceso de diferenciación, si bien se observa una tendencia al aumento. Las variantes TG2_v3, v4a y v4b presentan niveles absolutos bajos de expresión (presentan Ct más altos) por lo que pueden ser más difíciles de cuantificar aumentando la variabilidad de los ensayos.

4.3 Expresión de los ARNm de las variantes de *splicing* de TG2 en macrófagos derivados de células THP-1 polarizados

Se incubaron las células diferenciadas a macrófagos con citocinas inflamatorias: TNF α e IFN γ , y con LPS por 24 horas. Para evaluar la polarización de los macrófagos derivados de THP-1 se analizó la expresión de MCP-1 (CCL2, molécula utilizada generalmente como marcador del perfil M1 de macrófagos) por RT-qPCR y se cuantificó la producción de mediadores solubles (IL-1 β , IL-6 y TNF α) en los sobrenadantes de los macrófagos mediante ELISA de captura.

En todas las condiciones analizadas se obtuvo cierto grado de polarización hacia un perfil M1 (**Figura 11**). En el caso del estímulo combinado de IFN γ y LPS todos los parámetros analizados, expresión de MCP-1, IL-1 β , TNF α e IL-6 aumentaron significativamente. Cuando estos estímulos son proporcionados en forma individual, se observa un aumento de MCP-1, aunque no significativo, con aumento de las citocinas proinflamatorias producidas por los macrófagos. El tratamiento con TNF α solo produjo aumento de la secreción IL-1 β y TNF α por parte de los macrófagos, pero no del marcador MCP-1. Por lo tanto, en este modelo y con las concentraciones utilizadas, la estimulación con LPS e IFN γ combinados parece ser la condición más adecuada para lograr la polarización de los macrófagos derivados de THP-1 hacia un perfil "M1-like".

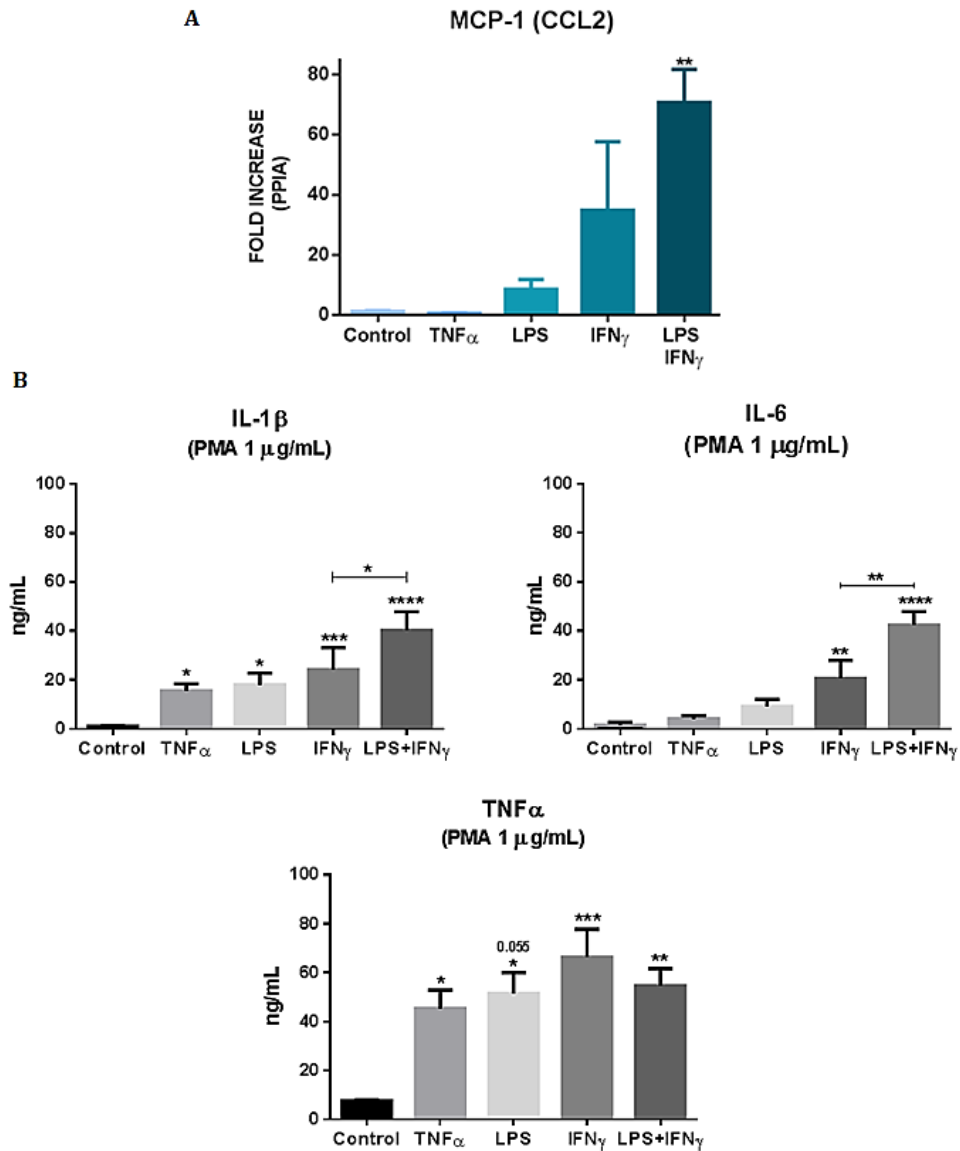


Figura 11 - Polarización hacia perfil “M1-like” de macrófagos derivados de THP-1 (PMA 1 μ g/mL, 72h) bajo la influencia de estímulos inflamatorios: TNF α 10 ng/mL, IFN γ 20 ng/mL, LPS 50 ng/mL. **(A)** Expresión de MCP-1 (CCL2) **(B)** Producción de citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α . Los datos son representativos de dos experimentos independientes, se analizaron con *One-way* ANOVA Test. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

Posteriormente se analizó la expresión de las distintas variantes de *splicing* de la TG2 mediante RT-qPCR en los macrófagos derivados de THP1, bajo la influencia de los estímulos proinflamatorios previamente ensayados (**Figura 12**). Se observó que los mayores aumentos en la expresión de las variantes de *splicing* de la TG2 se dieron luego de estimular a los macrófagos derivados de THP-1 con IFN- γ y con el tratamiento en conjunto con IFN- γ y LPS. La estimulación de los macrófagos con IFN γ o en conjunto con LPS provocó efectos similares en la expresión de TG2 canónica y las variantes de *splicing*, observándose aumentos de entre 2 y 4 veces de

sus mensajeros. TNF α y LPS no tuvieron un efecto significativo en la expresión de ninguna de las variantes de TG2.

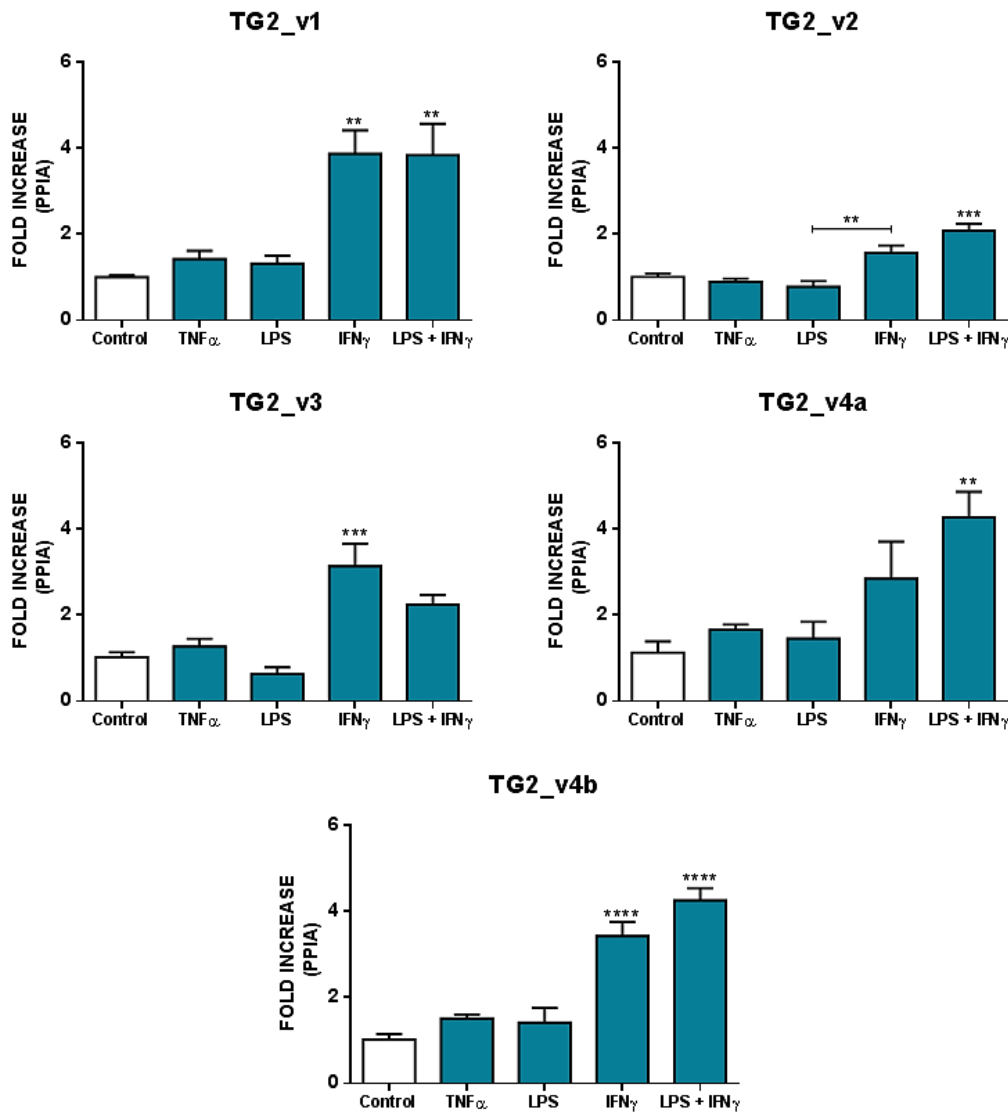


Figura 12 - Expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en macrófagos derivados de THP-1 (PMA 1 μ g/mL, 72h) bajo la influencia de estímulos inflamatorios TNF α 10 ng/mL; IFN γ 20 ng/mL; LPS 50 ng/mL. Los datos son representativos de dos experimentos independientes, se analizaron con *One-way ANOVA Test*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.4 Comparación de la expresión de las variantes de *splicing* de TG2 en diferentes perfiles de polarización de macrófagos

La polarización de macrófagos derivados de THP-1 hacia un perfil M2 (“M2-like”), requiere el uso de concentraciones menores de PMA para la diferenciación

inicial a macrófagos a las empleadas en los experimentos anteriormente planteados, además de la necesidad de que las células pasen por un estado de reposo (“*resting state*”, M0), más prolongado, antes de ser incubadas con los estímulos de polarización. Con estas nuevas condiciones de diferenciación a macrófagos realizamos experimentos de polarización empleando IFN γ e IL-4 como estímulos. Para evaluar el efecto de estas en el estado de polarización se evaluó la expresión de la enzima sintasa de óxido nítrico, iNOS y MCP-1 para el perfil M1 y la enzima arginasa, Arg y el receptor de manosa C de tipo 1, MRC-1 (**Figura 13**).

Tal como habíamos visto previamente el tratamiento con IFN γ lleva a un aumento del mensajero de MCP-1, aunque la misma también aumentó en el tratamiento con IL-4 respecto a los macrófagos en reposo. Sin embargo, el marcador MRC-1 solo aumenta en los macrófagos “M2-like”. Las enzimas iNOS y Arg no alteran su expresión con los tratamientos realizados.

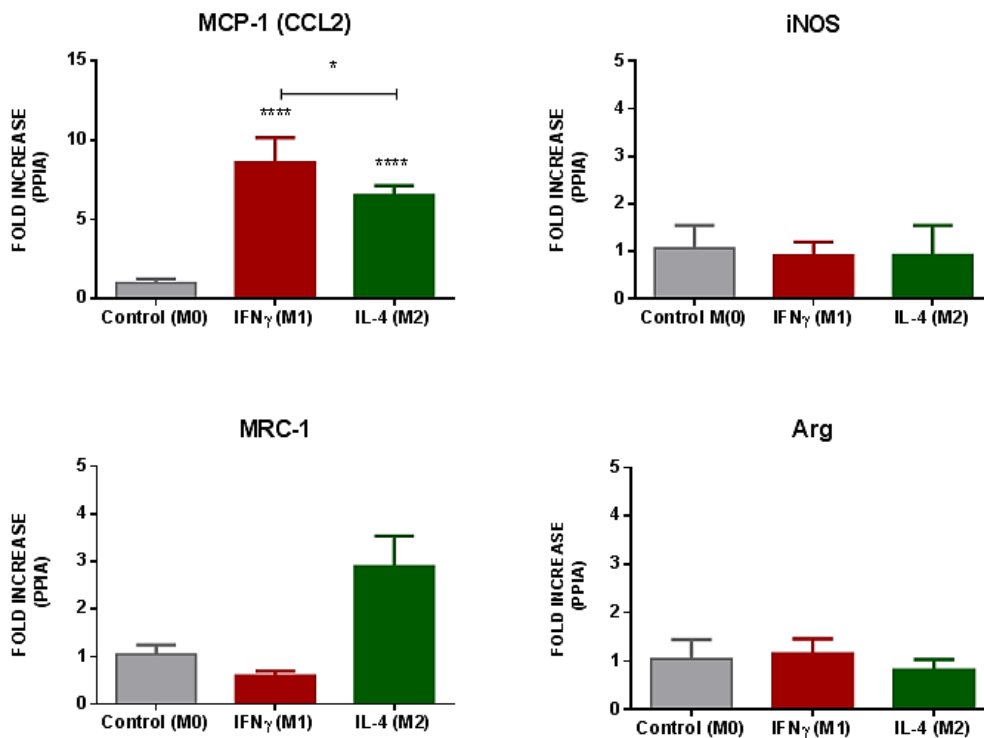


Figura 13 - Expresión de marcadores de polarización de macrófagos. M1 (IFN γ 20 ng/mL) y M2 (IL-4 30 ng/mL). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes, se analizaron con *One-way ANOVA Test* * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

En estas condiciones de ensayo se analizó la expresión de las cinco variantes de *splicing* de la TG2 (**Figura 14**). Se observó un aumento significativo de la expresión de todas las variantes con respecto al estado M0 para el perfil “M2-like”. A diferencia del protocolo de polarización a M1 previamente ensayado (donde el reposo previo al estímulo era más corto y la concentración y tiempo de incubación

con PMA mayor), solo la forma canónica de la TG2, y las variantes TG2_v2 y TG2_v4a mostraron un aumento significativo con respecto al estado M0. Interesantemente, incluso las variantes TG2_v1 y TG2_v2 que aumentan en el estado “M1-like”, lo hacen en menor medida que en el “M2-like”.

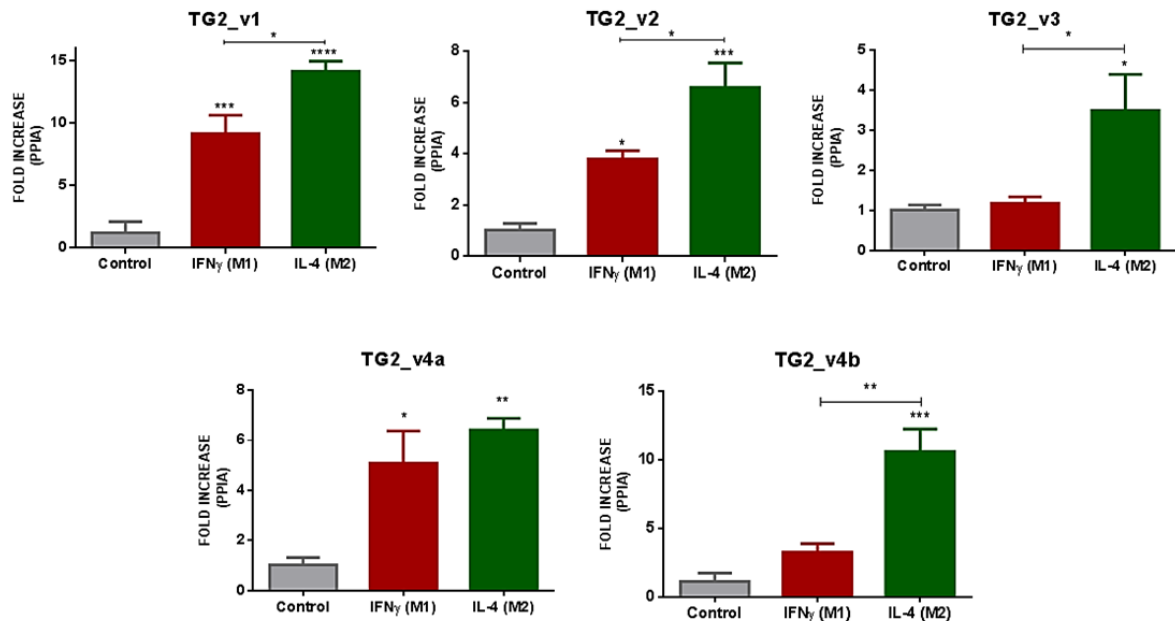


Figura 14 - Expresión de las variantes de *splicing* de la TG2 en macrófagos polarizados hacia perfiles “M1-like” (IFN γ 20 ng/mL) y “M2-like” (IL-4 30 ng/mL). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes, se analizaron con *One-way ANOVA Test* * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.5 Expresión de las variantes de *splicing* de TG2 a nivel proteico

En primer lugar, se realizó una puesta a punto de la detección mediante *western blot* de las variantes de *splicing* de la TG2, utilizando extractos proteicos provenientes de células derivadas de trofoblasto Swan-71, dado que la placenta es uno de los tejidos que presenta mayor expresión de todas las variantes [Phatak, VM. *et al.*, 2013].

En nuestro laboratorio contábamos con dos anticuerpos específicos para la TG2, los cuales son capaces de reconocer a la proteína en distintos epítopes y, por lo tanto, permitir la detección de distintas variantes de *splicing* de la enzima (**Figura 15**). El anticuerpo monoclonal anti-TG2 T100 (Invitrogen) se une a la proteína en la región entre el centro catalítico y el primer barril- β N-terminal. Por lo tanto, dicho

anticuerpo podría utilizarse para la detección de las variantes TG2_v2, v4a y v4b, además de la forma canónica de la enzima. También se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-TG2 2G3 (gentilmente cedido por F. Chirido, [Di Niro, R. *et al.*, 2005]), el cual es capaz de unirse a la TG2 en la región del centro catalítico. Debido a la ubicación del epítipo de dicho anticuerpo, se espera que el mismo sea capaz de reconocer a las cuatro variantes de *splicing*, además de la forma canónica de la TG2.

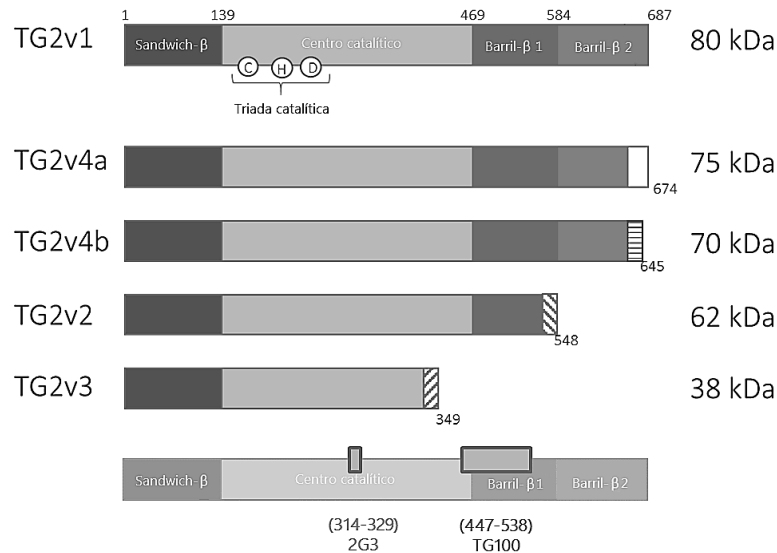


Figura 15 - Variantes de *splicing* de la TG2. Se muestran los epítopos que son reconocidos por los anticuerpos TG100 y 2G3 en las distintas variantes de la enzima.

En primer lugar, se ensayaron diferentes concentraciones de ambos monoclonales y se probaron diferentes conjugados disponibles en nuestro laboratorio para encontrar la condición que nos brindara la mejor señal en los pesos esperados con menor cantidad de bandas inespecíficas (**Figura 16**).

En la Figura 16A, se muestra el *western blot* obtenido utilizando el anticuerpo T100 a distintas concentraciones. En todas las concentraciones de anticuerpo primario ensayadas, se observan cuatro bandas definidas; una de mayor intensidad por debajo de los 97 kDa, dos en el entorno de 66 kDa y una de 45 kDa según el peso molecular empleado. No se observó mayores diferencias en la intensidad de las bandas ni en la aparición de bandas secundarias con las diferentes concentraciones de monoclonal empleadas. Este patrón se repite cuando ensayamos diferentes concentraciones de conjugado a peroxidasa (PO) (Figura 16C). En paralelo se corrió una muestra de TG2 de cobayo reconstituida (TGp), la cual da una banda principal de 76.4 kDa. Tomando en consideración esto, podemos decir que la banda más alta observada en el extracto corresponde a la TG2 canónica (80 kDa). Las otras bandas observadas en el extracto podrían corresponder a las variantes TG2_4a, 4b, que no se resolverían en estas condiciones (75 y 70 kDa respectivamente) y v2 (62 kDa). La

cuarta banda observada a 45 kDa no correspondería a ninguna de las variantes descritas. Si bien no descartamos la posibilidad de una degradación de las proteínas en el extracto no consideramos que la misma pueda ser importante dado que se trabajó con extractos frescos y en presencia de inhibidores de proteasas. En forma análoga se ensayó el *western blot* con el monoclonal 2G3 (Figura 16B). Al igual que con T100, se observó la banda a los 80 kDa aproximadamente que correspondería a la TG2 canónica, pero acompañada de más bandas que con el monoclonal comercial, algunas de las cuales coinciden con las identificadas previamente. Lo interesante del monoclonal 2G3 es que permitiría la detección de la variante más pequeña TG2_v3, con un tamaño esperado de 35 kDa, sin embargo, no se observaron bandas a esa altura. La señal obtenida con este anticuerpo no pudo ser mejorada al ensayar otros anticuerpos conjugados a PO (Figura 16C).

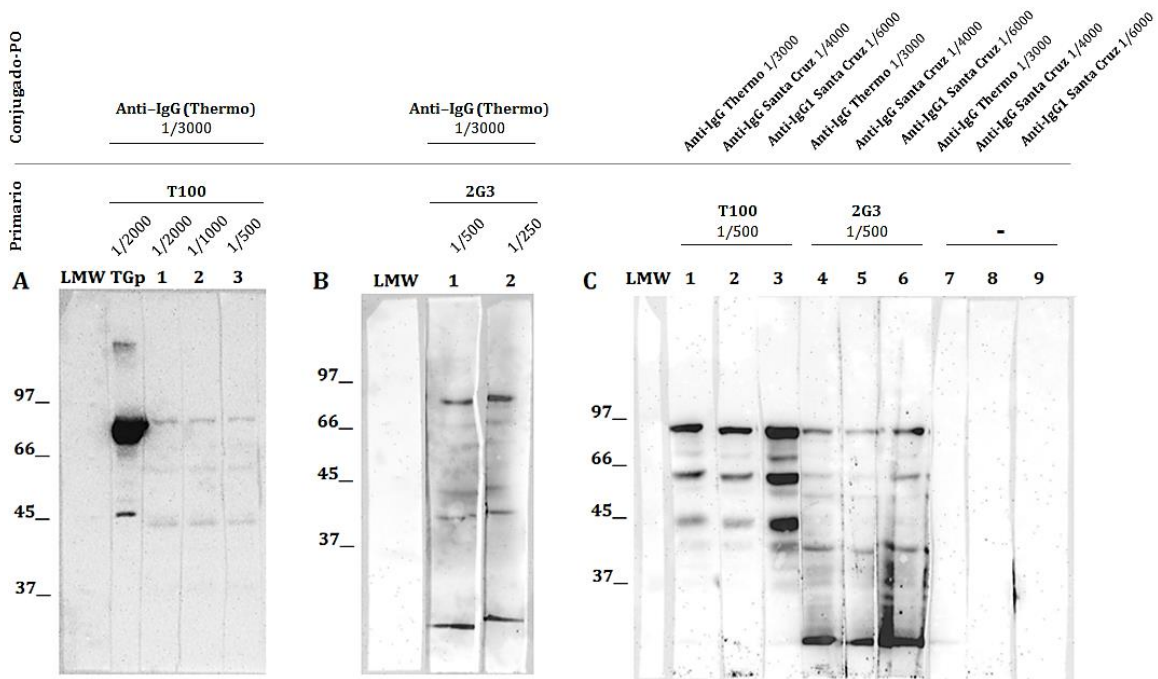


Figura 16 - Detección de variantes de *splicing* de TG2. Extractos celulares de células trofoblásticas Swan-71 fueron analizados por *western blot* empleando diferentes concentraciones de los anticuerpos monoclonales T100 y 2G3. También se ensayaron diferentes anticuerpos conjugados a peroxidasa (PO). TGp: TG2 purificada de *guinea pig* (0.1 mg/mL). LMW: *Low Molecular Weight* (Marcador de peso molecular), se indican las bandas en kDa.

Posteriormente trabajamos en la detección de la TG2 y sus variantes en extractos proteicos de macrófagos derivados de THP-1, generados por estimulación con PMA 1 µg/mL por 72 horas y con 24 horas de reposo posteriores. Dichas células representan el “d1” en el modelo experimental de diferenciación utilizado en este trabajo (Ver *Materiales y Métodos*). Para despegar las células de la placa de cultivo se emplearon tres métodos: tripsina, *scraper* o rastrillo, y EDTA (**Figura 17**). En todos los carriles se observó la banda de 80 kDa correspondiente a la TG2 en su forma

canónica. Sin embargo, sólo se observaron bandas adicionales en el extracto de células THP que fueron cosechadas con tripsina.

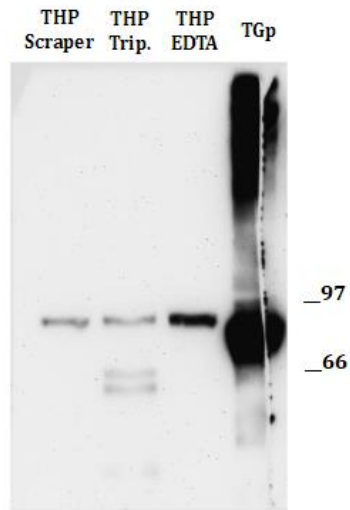


Figura 17 - Detección de TG2 en extractos proteicos de células THP-1. Los extractos proteicos se obtuvieron de células diferenciadas con PMA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 72 horas y luego de 24 horas de reposo. Se indica el método utilizado para despegar las células en cada caso (*scrapper* o rastrillo, tripsina y EDTA). Se empleó como anticuerpo primario anti-TG T100, 1/1000 y anti-IgG conjugado a PO (Santa Cruz), 1/4000 para la detección del mismo. TGp: TG2 reconstituida de *guinea pig* (0.1 mg/mL). Se indican las bandas del marcador de peso molecular en kDa.

5 DISCUSIÓN

Los monocitos y los macrófagos son células clave en los procesos inflamatorios que le siguen a una infección o daño en el tejido, así como en el mantenimiento de la homeostasis tisular. La enzima TG2, con sus diversas funciones y localizaciones contribuye a una variedad de procesos como la adhesión/extravasación, diferenciación y eferocitosis de monocitos y macrófagos [Chrobok, NL. *et al.*, 2017]. El rol de las variantes de *splicing* en procesos biológicos y condiciones patológicas ha sido propuesto por varios autores, pero su rol *in vivo* aún es desconocido [Lai, TS. *et al.*, 2013]. Algunos trabajos previos comenzaron a explorar la expresión de las variantes de *splicing* en tejidos sanos y situaciones patológicas [Citrón, BA. *et al.*, 2002; Phatak, VM. *et al.*, 2013; Arbildi, P. *et al.*, 2018; Sestito, C. *et al.*, 2018]. En este sentido previamente, nuestro grupo estudió la expresión de las variantes de *splicing* en las distintas poblaciones de leucocitos aislados de muestras de sangre de donantes sanos y pacientes celíacos, encontrando diferencias en los patrones de expresión de las variantes entre poblaciones y en contexto de la inflamación [Arbildi, P. *et al.*, 2018]. En este trabajo, con el objetivo de profundizar en el entendimiento de la expresión de las variantes de *splicing* de la TG2 en monocitos/macrófagos, se caracterizó el perfil de expresión de las variantes de *splicing* de la TG2 en células THP-1 durante el proceso de diferenciación a macrófagos y en la polarización de los mismos.

Varios trabajos sugieren que el PMA es el agente de diferenciación más efectivo para obtener macrófagos maduros derivados de monocitos [Bastiaan-Net, S. *et al.*, 2013; Chanput, W. *et al.*, 2012; Chanput, W. *et al.*, 2013]. En los días posteriores a que el mismo es retirado se suele observar un aumento de marcadores de superficie de macrófagos asociados a la adhesión, fagocitosis y capacidad de activación [Chanput, W. *et al.*, 2014]. Estudios previos mostraron que la TG2, particularmente la expuesta en la superficie celular aumenta su expresión durante la diferenciación a macrófagos y células dendríticas de monocitos derivados de PBMC empleando PMA como agente de diferenciación [Hodrea, J. *et al.*, 2010]. Sin embargo, no se encuentran estudios que analicen los patrones de expresión de las variantes de *splicing* de la enzima durante dicho proceso. Nosotros encontramos un aumento importante y progresivo en el tiempo de la expresión de los mensajeros de todas las variantes de *splicing* de la TG2 durante la diferenciación a macrófagos en las células THP-1. Particularmente las variantes v3 y v4a presentaron aumentos relativos de un orden de magnitud respecto a los de las otras variantes de *splicing*. Los mecanismos moleculares que provocan este aumento en la expresión de la TG2 no están claros, aunque podrían estar relacionados a la activación del factor de transcripción NFκB a consecuencia de la incubación con PMA [Chanput, W. *et al.*, 2015; Chrobok, NL. *et al.*, 2017]. Más aún desconocidos son los mecanismos que

regulan los procesos de *splicing* alternativo de la TG2, hasta ahora solo descrito en células humanas [Bianchi, N. *et al.*, 2018]. Todas estas incógnitas ameritan futuros estudios para lograr identificar los mecanismos de regulación, las actividades enzimáticas y no enzimáticas asociadas a la TG2 intracelular, así como las posibles contribuciones de las distintas variantes de *splicing* de la enzima a la fisiología de los macrófagos. Dada la dificultad del acceso a monocitos humanos, por la naturaleza de la muestra, su poca representatividad en sangre (2-8% de total de leucocitos), el abordar estas preguntas en modelos en líneas celulares humanas pueden facilitar la sistematización de estos estudios.

Son varios los estudios que describen la relación de la expresión y actividad de la TG2 canónica en el contexto de ambientes inflamatorios, proceso en el cual la interrelación con la vía NFκB parece ser central [Bianchi, N. *et al.*, 2018]. La regulación de la expresión de la TG2 canónica y estímulos inflamatorios bajo el control de la vía de NFκB también ha sido descrita en macrófagos de diversos orígenes [Chrobok, NL. *et al.*, 2017]. En este trabajo nosotros exploramos los patrones de expresión de las variantes de *splicing* de la TG2 en macrófagos derivados de THP-1 en un contexto proinflamatorio. El tratamiento con IFNγ fue efectivo en polarizar las células a un estado “M1-like”, observándose un aumento del marcador de activación clásica MCP-1 y de la producción de citocinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 y TNFα. En estas condiciones la expresión de TG2 canónica, así como de sus variantes de *splicing* se vio aumentada. En línea con estos resultados, nuestro grupo reportó un aumento de las variantes v1 y v3 en leucocitos de pacientes celíacos [Arbildi, P. *et al.*, 2018] y de la variante 3 en macrófagos derivados de THP-1 en presencia de anticuerpos anti β2 en paralelo con un incremento en la producción de IL-1β e IL-6 [Arbildi, P. *et al.*, 2017]. A su vez en PBMC de pacientes con esclerosis múltiple, se reportó un aumento de la expresión de las variantes de *splicing*, particularmente v4a y v4b en relación a las células de individuos sanos [Sestito, C. *et al.*, 2018]. En nuestro modelo de estudio, a diferencia de lo reportado en macrófagos de cavidad peritoneal de rata [Hayakawa, K. *et al.*, 2016] no observamos regulación de la expresión de TG2 por LPS, aunque se vio aumento de citocinas proinflamatorias. En línea con lo observado por Sestito, C. *et al.*, 2017; el TNFα no indujo la expresión de la TG2 ni de sus variantes en macrófagos derivados de THP1, a diferencia de lo observado en otros tipos celulares, como hepatocitos, condrocitos y astrocitos [Metha *et al.*, 1985, 1987].

Una vez avanzado el proceso inflamatorio, la resolución de la inflamación es mediada por la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-4 y TGF-β, las cuales son capaces de inducir la reparación de los tejidos. En este contexto los macrófagos juegan un rol importante ya sea a través de remoción de cuerpos apoptóticos (eferocitosis) o la secreción de citocinas que asisten en los procesos de reparación del tejido [Watanabe, S. *et al.*, 2019]. Por lo que nos propusimos analizar la expresión de TG2 en macrófagos derivados de THP-1 siguiendo un

protocolo de polarización. Los modelos de polarización de macrófagos *in vitro* y los marcadores para los perfiles M1 y M2 utilizados para validarlos suelen variar entre distintos trabajos experimentales encontrados en la bibliografía. En particular, nosotros seguimos el protocolo planteado por Stossi *et al.*, 2012, y los marcadores de polarización disponibles en nuestro laboratorio. Encontramos que contrariamente a lo que esperábamos no todos los marcadores funcionaron en este modelo, aunque se pudo observar una mayor expresión de MCP-1 cuando los macrófagos derivados de THP-1 son tratados con IFN γ y una expresión aumentada de MRC-1 relacionada al tratamiento con IL-4. A futuro, sería importante lograr validar el protocolo de polarización analizando la expresión de una mayor cantidad de marcadores como CXCL11, INDO y las citocinas IL-1 β e IL-6 para el perfil M1, y moléculas como DECTIN-1 y DC-SIGN para el perfil M2 [Chanput, W. *et al.*, 2013]. La regulación de la expresión TG2 en monocitos y macrófagos por parte de mediadores antiinflamatorios ha sido estudiada demostrándose que macrófagos tratados con IL-4 regulan positivamente la expresión de la TG2 *in vitro*, e incluso que alcanza niveles de expresión superiores a los encontrados en macrófagos tratados con mediadores proinflamatorios [Gratchev, A. *et al.* 2005; Martinez, FO. *et al.* 2013; Sestito, C. *et al.*, 2017]. Sin embargo, los trabajos mencionados sólo analizan lo que sucede con la expresión de la TG2 en su forma canónica, sin tener en cuenta a las variantes de *splicing* de la enzima. Nosotros observamos que macrófagos tratados con IL-4 (polarizados a un perfil “M2-like”) regulan positivamente la expresión de todas las variantes de *splicing* de la TG2 y en mayor medida que los tratados con IFN γ . Nuestras observaciones están de acuerdo con los reportes que sugieren a TG2 como un marcador del perfil M2 en macrófagos de ratón y humanos [Martinez, FO. *et al.* 2013]. Más aún, en ensayos de interferencia con la expresión de TG2 en células THP-1, resultaron en un perfil proinflamatorio cuando estas son tratadas con IL-4, lo que sugiere que la presencia de TG2 dirige el perfil antiinflamatorio en monocitos [Sestito, C. *et al.*, 2017].

Al comparar los valores de *fold increase* para la expresión de la TG2 en el proceso de diferenciación y activación de los macrófagos, se observó que la inducción era significativamente mayor durante la diferenciación de las células THP-1 a macrófagos. Por lo tanto, el proceso de diferenciación de las células parece ser un evento más importante para la inducción de la expresión de TG2 que los estímulos inflamatorios relacionados a un perfil inflamatorio

Finalmente, nos propusimos poner a punto la detección de las variantes de *splicing* de la TG2 a nivel proteico por *western blot*. Esta metodología fue utilizada en los trabajos iniciales que describieron la presencia de algunas de las variantes en células humanas [Fraij, BM. *et al.*, 1992, 1996; Lai, TS. *et al.*, 2007]. Sin embargo, no se ha reportado aún la expresión concomitante de todas las variantes en leucocitos ni en macrófagos. Por este motivo, nos parece relevante analizar la expresión proteica de las variantes en monocitos/macrófagos. En base a la baja

expresión de la TG2 reportada en monocitos [Curró, M. *et al.*, 2014; Hodrea, J. *et al.*, 2010] sumado a que la forma canónica suele representar un 80% de la TG2 total en las células [Phatak, VM. *et al.*, 2013], comenzamos por estandarizar la técnica de inmunoblot para analizar la expresión de las variantes en un tipo celular con una mayor expresión de TG2. En base a que la placenta expresa altos niveles de todas las variantes de *splicing* de la TG2 en comparación a otros tejidos [Phatak, VM. *et al.*, 2013], y a la experiencia de nuestro grupo con las células trofoblásticas de primer trimestre Swan-71 [Arbildi, P. *et al.*, 2019], en este trabajo utilizamos este tipo celular para la detección de la TG2 y evaluar la utilidad de los anticuerpos monoclonales disponibles para la detección.

En todos los extractos analizados se pudo identificar una banda de aproximadamente 80 kDa correspondiente a la TG2 canónica. Si bien se observaron otras bandas cuyos tamaños podrían aproximarse a las variantes de *splicing* v2, v4a y v4b, no podemos descartar que correspondan a fragmentos de la TG2 canónica generados durante el tratamiento de las células con tripsina, y que también pueden ser reconocidos por los anticuerpos específicos para la enzima si retienen el epítipo correspondiente. Este fenómeno queda en evidencia al comparar extractos de THP-1 obtenidos a partir de células despegadas de la placa de cultivo por diferentes metodologías. Por lo tanto, consideramos que se debe profundizar en esta etapa de la metodología y recurrir a métodos alternativos para la cosecha de las células, que ayuden a preservar su integridad. Por otro lado, sería de utilidad aplicar herramientas analíticas como la espectroscopía de masas para la identificación de los *spots* obtenidos en geles de poliacrilamida – SDS bidimensionales, utilizando los anticuerpos monoclonales específicos.

En suma, se observó que tanto los mediadores proinflamatorios como los anti-inflamatorios que caracterizan a los perfiles M1 y M2, respectivamente, son capaces de regular la expresión de TG2 en macrófagos derivados de THP-1. Es probable que la regulación de la TG2 coincida con los procesos ordenados en el tiempo que se dan durante un proceso inflamatorio; es decir, la presencia de mediadores proinflamatorios mayormente en las etapas tempranas de la inflamación, y mediadores antiinflamatorios presentes en las etapas más tardías y de resolución de la inflamación.

6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se pudo determinar que tanto los mediadores proinflamatorios que caracterizan a las etapas tempranas de un proceso inflamatorio, como los antiinflamatorios, los cuales se encuentran presentes mayormente durante las etapas de resolución de la inflamación, son capaces de regular la expresión de todas las variantes de *splicing* de la TG2 en macrófagos derivados de THP-1. Amerita en un futuro profundizar en los mecanismos que subyacen a esta regulación y la asociación de la misma con los diferentes procesos en los cuales puedan estar implicados. Al momento es poco o nulo lo que se sabe de las funciones de las variantes de *splicing* truncas y principalmente se han relacionado los aumentos de su expresión a situaciones patológicas, por lo que sería interesante en un futuro plantear estudios que nos permitan determinar qué funciones podrían estar cumpliendo estas en la fisiología de los macrófagos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abe, S., Yamashita, K., Kohno, H., Ohkubo, Y. (2000). **Involvement of transglutaminase in the receptor-mediated endocytosis of mouse peritoneal macrophages.** *Biol. Pharm. Bull.* 23, 1511–1513.
- Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F.M. (2007). **Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life.** *Nat. Neurosci.* 10, 1538–1543.
- Akimov, S. S., Belkin, A. M. (2001). **Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin.** *Blood* 98, 1567–1576.
- Akimov, S. S., Krylov, D., Fleischman, L. F., Belkin, A. M. (2000) **Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin.** *J. Cell Biol.* 148:825–838.
- Antonyak, M. A., Jansen, J. M., Miller, A. M., Ly, T. K., Endo, M., and Cerione, R. A. (2006) **Two isoforms of tissue transglutaminase mediate opposing cellular fates.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18609-18614.
- Arbildi, P., Grasso, E., Rodríguez-Camejo, C., Pérez-Leirós, C., Ramhorst, R., Hernández, A., Sónora, C. (2017). **β2GPI-specific antibodies induce pro-inflammatory mediators and tissue transglutaminase differential variant expression on trophoblast cells and monocytes-macrophages.** *Placenta.* 51. 111.
- Arbildi, P., Sónora, C., Del Río, N., Marques, J. M., Hernández, A. (2018). **Alternative RNA splicing of leucocyte tissue transglutaminase in coeliac disease.** *Scand J Immunol.* 87:e12659.
- Arbildi, P., Rodríguez-Camejo, C., Calvo, F., Sónora, C., Hernández, A. (2019). **Tissue transglutaminase in Swan-71 trophoblast cells: hypoxia modulates enzyme expression, cell migration and proliferation.** *Placenta.* 83:e65.
- Auwerx, J. (1991). **The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation.** *Experientia* 47: 22.
- Baek, K. J., Kwon, N. S., Lee, H. S., Kim, M. S., Muralidhar, P., Im, M. J. (1996). **Oxytocin receptor couples to the 80 kDa Gh alpha family protein in human myometrium.** *Biochem J.* 315(Pt 3):739–744.
- Bastiaan-Net, S., Chanput, W., Hertz, A., Zwittink, R. D., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2013). **Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs).** *International Immunopharmacology,* 15(1), 167–175.

Bayardo, M., Punzi, F., Bondar, C., Chopita, N., & Chirido, F. (2012). **Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- γ and tumour necrosis factor- α in human small intestine.** *Clinical and Experimental Immunology*, 168(1), 95–104.

Belkin, A. M., Tsurupa, G., Zemskov, E., Veklich, Y., Weisel, J. W., Medved, L. (2005). **Transglutaminase-mediated oligomerization of the fibrin(ogen) alphaC domains promotes integrin-dependent cell adhesion and signaling.** *Blood*. 105:3561–3568.

Bergamini, C. M., Collighan, R. J., & Wang, Z. (2011). **Structure and Regulation of Type 2 Transglutaminase in Relation to its Physiological Functions and Pathological Roles.** 78, 1–46.

Bianchi, N., Beninati, S., & Bergamini, C. M. (2018). **Spotlight on the transglutaminase 2 gene: a focus on genomic and transcriptional aspects.** (April), 1643–1667.

Boehm, U., Klamp, T., Groot M., Howard, J. C. (1997). **Cellular responses to interferon-gamma.** *Annu Rev Immunol*, 15, 749-95.

Boehm, J. E., Singh, U., Combs, C., Antonyak, M. A., Cerione, R. A. (2002). **Tissue transglutaminase protects against apoptosis by modifying the tumor suppressor protein p110 Rb.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 23, pp. 20127–20130.

Caccamo, D., Curro, M., Ferlazzo, N., Condello, S., Lentile, R. (2011). **Monitoring of transglutaminase 2 under different oxidative stress conditions.** *Amino Acids*. 1037–1043.

Casadio, R., Polverini, E., Mariani, P., Spinozzi, F., Carsughi, F., Fontana, A., Polverino de Laureto, P., Matteucci, G., Bergamini, CM. (1999). **The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions.** *Eur J Biochem*. 262:672–679.

Chanput, W., Reitsma, M., Kleinjans, L., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2012). **β -Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages.** 822–833.

Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, F. J., & Wichers, H. J. (2013). **Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds.** *Food & Function*. 266–276.

Chanput, W., Mes, J., Wichers, H. (2014). **THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach.** *International immunopharmacology*. 23.

Chanput, W., Peters, V., & Wichers, H. (2015). **THP-1 and U937 Cells.** *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.* Cham (CH): Springer; 147-159.

Chen, S., Lin, F., Iismaa, S., Lee, K. N., Birckbichler, P. J., Graham, R. M. (1996). **Alpha1-adrenergic receptor signaling via Gh is subtype specific and independent of its transglutaminase activity.** *J. Biol. Chem.* 271:32385–32391.

Chiocca, E. A., Davies, P. J., Stein, J. P. (1989). **Regulation of tissue transglutaminase gene expression as a molecular model for retinoid effects on proliferation and differentiation.** *J. Cell. Biochem.* 39:293–304.

Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Nikiforov, N. G., Elizova, N. V., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N. (2015a). **Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes.** *International journal of cardiology* 184:436-445.

Chizzolini, C., Rezzonico, R., De Luca, C., Burger, D., Dayer, J. M. (2000). **Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes.** *J Immunol* 164:5952-5960.

Chrobok N. L., Sestito, C., Wilhelmus, M. M., Drukarch, B., van Dam, A. M. (2017). **Is monocyte- and macrophage-derived tissue transglutaminase involved in inflammatory processes?** *Amino Acids.* 49(3):441–452.

Citron, B. A., Suo, Z., Santacruz, K., & Davies, P. J. A. (2002). **Protein crosslinking , tissue transglutaminase , alternative splicing and neurodegeneration.** 40, 69-78.

Curró, M., Ferlazzo, N., Risitano, R., Condello, S., Vecchio, M., Caccamo, D., *et al.* (2014). **Transglutaminase 2 and phospholipase A₂ interactions in the inflammatory response in human Thp-1 monocytes.** *Amino Acids.* 2014;46(3):759-766.

de Waal, M. R., Figdor, C. G., Huijbens, R., Mohan-Peterson, S., Bennett, B., Culpepper, J. (1993). **Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10.** *J Immunol.* 151:6370-6381.

Eckert, R. L, Kaartinen, M. T., Nurminskaya, M., Belkin, A. M., Colak, G., Johnson, G. V., Mehta, K. (2014). **Transglutaminase Regulation of Cell Function.** *Physiological Reviews.* 94:2, 383-417.

Feng, J. F., Gray, C., Im, M. J. (1999a). **α1B-adrenoceptor interacts with multiple sites of transglutaminase II: characteristics of the interaction in binding and activation.** *Biochemistry.* 38:2224–2232.

Feng, J. F., Readson, M., Yadav, S. P., Im, M. J. (1999b). **Calreticulin downregulates both GTP binding and transglutaminase activities of transglutaminase II.** *Biochemistry*. 38:10743–10749.

Feng, J. F., Rhee, S. G., Im, M. J. (1996). **Evidence that phospholipase δ 1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signaling.** *J. Biol. Chem.* 271:16451–16454.

Fesus, L., Szondy, Z. (2005). **Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival.** *FEBS Lett.* 579:3297–3302.

Fraij, B. M., Gonzales, R. A. (1996). **A third human tissue transglutaminase homologue as a result of alternative gene transcripts.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, Volume 1306, Issue 1,1996,Pages 63-74.

Fraij, B. M., Birckbichler, P. J., Patterson Jr, M. K., Lee, K. N., Gonzales, R. A. (1992). **A retinoic acid-inducible mRNA from human erythroleukemia cells encodes a novel tissue transglutaminase homologue.** *J. Biol. Chem.* 267: 22616-23.

George, M. D., Vollberg, T. M., Floyd, E. E., Stein, J. P., Jetten, A. M. **Regulation of transglutaminase type II by transforming growth factor-beta 1 in normal and transformed human epidermal keratinocytes.** (1990). *J. Biol. Chem.* 265:11098–11104.

Gordon, S., Taylor, P. (2005). **Monocyte and macrophage heterogeneity.** *Nat Rev Immunol* 5, 953–964.

Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C. E., Schledzewski, K. (2001). **Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3.** *Scand J Immunol* 53:386-392.

Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Utikal, J., Goerdts S. (2005). **Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages.** *Scand J Immunol* 61:10-17.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C. *et al.* (2014). **Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny.** *Nat Rev Immunol* 14, 571–578.

Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J., Johnson, G. V. (2012). **Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife.** *Biochim Biophys Acta.* 1823(2):406–419.

Hasko, G., Pacher, P., Deitch, E. A., Vizi, E. S. (2007). **Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors.** *Pharmacology & therapeutics* 113(2):264-275.

Hasegawa, G., Suwa, M., Ichikawa, Y., Ohtsuka, T., Kumagai, S., Kikuchi, M., & Sato, Y.

(2003). **A novel function of tissue-type transglutaminase : protein disulphide isomerase.** 803, 793–803.

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, et al. **Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes.** *Immunity.* 2013; 38:792–804.

Hayakawa, K., Wang, X., Lo, E. H., & Hospital, G. (2017). **CD200 Increases Alternatively Activated Macrophages Through cAMP-response Element Binding Protein - C/EBP-beta Signaling.** *HHS Public Access.* 136(5), 900–906.

Henriksson, P., Becker, S., Lynch, G., McDonagh, J. (1985). **Identification of intracellular factor XIII in human monocytes and macrophages.** *J. Clin. Investig.* 76, 528–534.

Hodrea, J., Demény, M. Á., Majai, G., Sarang, Z., Korponay-szabó, I. R., & Fésüs, L. (2010). **Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages.** 130, 74–81.

Ikura, K., Nasu, T., Yokota, H., Tsuchiya, Y., Sasaki, R., & Chiba, H. (1988). **Amino Acid Sequence of Guinea Pig Liver Transglutaminase from Its cDNA Sequence.** 2898–2905.

Italiani, P., Boraschi, D. (2014). **From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation.** *Front Immunol.* 5:514. Published 2014 Oct 17.

Jang, G. Y., Jeon, J. H., Cho, S. Y., Shin, D. M., Kim, C. W., Jeong, E. M., Bae, H. C., Kim, T. W., Lee, S. H., Choi, Y., Lee, D. S., Park, S. C., Kim, I. G. (2010). **Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF-kappaB activity in hypoxic tumor cells.** *Oncogene.* 29:356–367.

Janiak, A., Zemskov, E. A, Belkin, A. M. (2006). **Cell surface transglutaminase induces RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway.** *Mol. Biol. Cell.* 17:1606–1619.

Johnson, K., Hashimoto, S., Lotz, M., Pritzker, K., Terkeltaub, R. (2001). **Interleukin-1 induces pro-mineralizing activity of cartilage tissue transglutaminase and factor XIIIa.** *Am J Pathol.* 159:149–163.

Katt, W. P., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2018). **The diamond anniversary of tissue transglutaminase: a protein of many talents.** *Drug Discovery Today,* 23(3), 575–591.

Kiraly, R., Csosz, E., Kurtan, T., Antus, S., Szigeti, K., Simon-Vecsei, Z., Korponay-Szabo, I. R., Keresztessy, Z., Fesus, L. (2009). **Functional significance of five**

noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. FEBS J. 276:7083–7096.

Korns, D., Frasnich, S. C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P. M., Bratton, D. L. (2011). **Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation.** *Front. Immunol.* 2, 57.

Lai, T. S., Liu, Y., Li, W., Greenberg, C. S. (2007). **Identification of two GTP-independent alternatively spliced forms of tissue transglutaminase in human leukocytes, vascular smooth muscle, and endothelial cells.** *FASEB J.* 21(14):4131–4143.

Lai, T. S., Greenberg, C. S. (2013). **TGM2 and implications for human disease: role of alternative splicing.** *Frontiers in Bioscience.* 18, 504-519.

Lai, T. S., Lin, C. J., Greenberg, C. S. (2017). **Role of tissue transglutaminase-2 (TG2)-mediated aminylation in biological processes.** *Amino Acids* 49: 501.

Lee, C. S., Park, H. H. (2017). **Structural aspects of transglutaminase 2: functional, structural, and regulatory diversity.** *Apoptosis* 22: 1057.

LeMosy, E. K., Erickson, H. P., Beyer, W. F. (1992). **Visualization of purified fibronectin transglutaminase macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminase.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, pp. 478–483.

Leu, R. W., Herriott, M. J., Moore, P. E., Orr, G. R., Birckbichler, P. J. (1982). **Enhanced transglutaminase activity associated with macrophage activation. Possible role in Fc-mediated phagocytosis.** *Exp. Cell Res.* 141, 191–199.

Liu, S., Cerione, R. A., Clardy, J. (2002). **Structural Basis for the Guanine Nucleotide-Binding Activity of Tissue Transglutaminase and its Regulation of Transamidation Activity.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 2743–2747.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}.** *Method. Methods,* 25 4, 402-8.

Locati, M., Curtale, G., Mantovani, A. (2020). **Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity.** *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis* 15, 123– 147.

Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., Donnelly, S. (2016). **The choice of phorbol-12-myristate-13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus.** *J. Immunol. Methods.* 430,64–70.

MacMicking, J., Q. W. Xie & C. Nathan. (1997). **Nitric oxide and macrophage function.** *Annu Rev Immunol*, 15, 323-50.

Martinez, F. O., Helming, L., Gordon, S. (2009). **Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.** *Annu Rev Immunol* 27:451–483.

Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A. (2006). **Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression.** *J Immunol.* 177, 7303-11.

Martinez, F. O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B. N., Draijer, C., Thomas, B., Fabbri, M., Crawshaw, A., Ho, L. P., Ten Hacken, N. H., Cobos Jimenez, V., Kootstra, N. A., Hamann, J., Greaves, D. R., Locati, M., Mantovani, A., Gordon, S. (2013). **Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences.** *Blood* 121(9):e57–e69.

Mehta, K., Lopez-Berestein, G. (1986). **Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation.** *Cancer Res.* 46, 1388–1394.

Mehta, K., Fok, J. Y., Mangala, L. S. (2006). **Tissue transglutaminase: from biological glue to cell survival cues.** *Frontiers in Bioscience*, vol. 11, no. 1, pp. 173–185.

Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). **Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions.** *Nat. Immunol.* 3, 1135– 1141.

Milakovic, T., Tucholski, J., McCoy, E., Johnson, G. V. (2004). **Intracellular localization and activity state of tissue transglutaminase differentially impacts cell death.** *J. Biol. Chem.* 279:8715–8722.

Mirza, A., Liu, S. L., Frizell, E., Zhu, J., Maddukuri, S., Martinez, J., Davies, P., Schwarting, R., Norton, P., Zern, M. A. (1997). **A role for tissue transglutaminase in hepatic injury and fibrogenesis, and its regulation by NF-kappaB.** *Am J Physiol.* 272:G281–288.

Mishra, S., Papers, J. B. C., Doi, M., & Murphy, L. J. (2004). **Tissue Transglutaminase Has Intrinsic Kinase Activity.** 279(23), 23863–23868.

Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K. (1995). **Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines.** *Eur J Immunol.* 25, 1101-4.

Moghaddam, A. S., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M. (2018). **Macrophage plasticity , polarization and function in health and disease.** . *Journal of Cellular*

Physiology. 233(9):6425-6440.

Mosser, D. M. (2003). **The many faces of macrophage activation.** *J Leukoc Biol.* 73:209-212.

Mosser, D. M, Edwards, J. P. (2009). **Exploring the full spectrum of macrophage polarization.** *Nat Rev Immunology*, 8(12), 958–969.

Murray, P. J. (2017). **Macrophage Polarization.** *Annual Review of Physiology*, 79:1, 541-566.

Murtaugh, M.P., Arend, W. P., Davies, P. J. (1984). **Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes.** *J. Exp. Med.* 159, 114–125.

Murtaugh, M. P., Mehta, K., Johnson, J., Myers, M., Juliano, R. L., Davies, P. J. (1983). **Induction of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages.** *J. Biol. Chem.* 258, 11074–11081.

Murthy, S. N. P., Iismaa, S., Begg, G., Freymann, D. M., Graham, R. M., & Lorand, L. (2010). **Conserved Tryptophan in the Core Domain of Transglutaminase is Essential for Catalytic Activity.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99,2738–2742.

Muszbek, L., Adany, R., Szegedi, G., Polgar, J., Kawai, M. (1985). **Factor XIII of blood coagulation in human monocytes.** *Thromb. Res.* 37, 401–410.

Muszbek, L., Adany, R., Mikkola, H. (1996). **Novel aspects of blood coagulation factor XIII. Structure, distribution, activation, and function.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 33(5):357–421.

Nakaoka, H., Perez, D. M., Baek, K. J. (1994). **G(h): a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function.** *Science*, vol. 264, no. 5165, pp. 1593–1596.

Nicholas, B., Smethurst, P., Verderio, E., Jones, R., Griffin, M. (2003). **Cross-linking of cellular proteins by tissue transglutaminase during necrotic cell death: a mechanism for maintaining tissue integrity.** *Biochemical Journal*, vol. 371, no. 2, pp. 413–422.

Nishimichi, N., Hayashita-Kinoh, H., Chen, C., Matsuda, H., Sheppard, D., Yokosaki, Y. (2011). **Osteopontin undergoes polymerization in vivo and gains chemotactic activity for neutrophils mediated by integrin alpha9beta1.** *J. Biol. Chem.* 286:11170–11178.

Nourshargh, S., Alon, R. (2014). **Leukocyte Migration into Inflamed Tissues.** *Immunity*, 41(5), 694–707.

Nurminskaya, M. V., & Belkin, A. M. (2012). **Cellular functions of tissue transglutaminase.** In International review of cell and molecular biology (Vol. 294).

Odi, B. O., & Coussons, P. (2014). **Biological Functionalities of Transglutaminase 2 and the Possibility of Its Compensation by Other Members of the Transglutaminase Family.** The Scientific World Journal, 2014 (Table 1), 1–13.

O'Shea, J. J., Murray, P. J. (2008). **Cytokine signaling modules in inflammatory responses.** Immunity. 28:477–487.

Park, D., Shim, S., & Ha, C. K. (2010). **Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments.** *Amino Acids* 619–631.

Peng, X., Zhang, Y., Zhang, H., Graner, S., Williams, J. F., Levitt, M. L., & Y, A. L. (1999). **Interaction of tissue transglutaminase with nuclear transport protein importin-K3.** 446, 35–39.

Phatak, V. M., Croft, S. M., Rameshaiah Setty, S. G. (2013). **Expression of transglutaminase-2 isoforms in normal human tissues and cancer cell lines: dysregulation of alternative splicing in cancer.** *Amino Acids*. 44: 33.

Pinkas, D. M., Strop, P., Brunger, A. T., Khosla, C. (2007). **Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation.** PLoS Biol 5: e327.

Sarkar, N. K., Clarke, D. D., & Waelsch, H. (1957) **An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins.** *Biochim. Biophys. Acta* 25, 451–452.

Savoca, M. P., Tonoli, E., Atobatele, A. G., & Verderio, E. A. M. (2018). **Biocatalysis by Transglutaminases: A Review of Biotechnological Applications.** 9–11.

Seiving, B., Ohlsson, K., Linder, C., Stenberg, P. (1991). **Transglutaminase differentiation during maturation of human blood monocytes to macrophages.** *Eur J Haematol* 46(5):263–271.

Sestito, C., Brevé, J. J. P., Eggermond, M. C. J. A. Van, Killestein, J., Teunissen, C. E., Rossum, J. Van, Dam, A. Van. (2017). **Monocyte-derived tissue transglutaminase in multiple sclerosis patients: reflecting an anti-inflammatory status and function of the cells?** 1–12.

Sestito, C., Brevé, J. J. P., Killestein, J. (2018). **Differential Expression of Tissue Transglutaminase Splice Variants in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients.** *Med Sci (Basel)*. 6(4):108.

Stossi, F., Madak-Erdoğan, Z., Katzenellenbogen, B. (2012). **Macrophage-elicited loss of estrogen receptor- α in breast cancer cells via involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1 genomic locus.** *Oncogene* 31, 1825–1834.

- Suto, N., Ikura, K., Sasaki, R. (1993). **Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells.** *J Biol Chem.* 268:7469–7473.
- Szondy, Z., Sarang, Z., Molnár, P., Németh, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P. G., Falasca, L., Aeschlimann, D., Kovács, J., Kiss, I., Szegezdi, E., Lakos, G., Rajnavolgyi, E., Birckbichler, P. J., Melino, G., Fesus, L. (2003). **Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 13, 7812-7.
- Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G. P., Bolego, C., Zandstra, P. W., Cignarella, A., Vitiello, L. (2018). **Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization?** *Front. Pharmacol.* 9:71.
- Telci, D., Griffin, M. (2006). **Tissue transglutaminase (TG2) - a wound response enzyme.** *Front Biosci*, 11:867–882.
- Telci, D., Wang, Z., Li, X., Verderio, E. A., Humphries, M. J., Baccarini, M., Basaga, H., Griffin, M. (2008). **Fibronectin-Tissue Transglutaminase Matrix Rescues RGD-Impaired Cell Adhesion through Syndecan-4 and Beta1 Integrin Co-Signaling.** *J. Biol. Chem.* 283, 20937–20947.
- Thomas-Ecker, S., Lindecke, A., Hatzmann, W., Kaltschmidt, C., Zanker, K. S., Dittmar, T. (2007). **Alteration in the gene expression pattern of primary monocytes after adhesion to endothelial cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 5539–5544.
- Torocsik, D., Bardos, H., Nagy, L., Adany, R. (2005). **Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation.** *Cell Mol Life Sci* 62:2132-2139.
- Toth, B., Garabuczi, E., Sarang, Z., Vereb, G., Vamosi, G., Aeschlimann, D., Blasko, B., Becsi, B., Erdodi, F., Lacy-Hulbert, A., Zhang, A., Falasca, L., Birge, R. B., Balajthy, Z., Melino, G., Fesus, L., Szondy, Z. (2009). **Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells.** *J Immunol* 182(4):2084–2092.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980). **Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).** *Int. J. Cancer*, 26: 171-176.
- Veza, R., Habib, A., FitzGerald, G. A. (1999). **Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel GTP-binding protein, Gh.** *J Biol Chem.* 274:12774–12779.

Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V., Budinger, G. R. S. (2019). **The role of macrophages in the resolution of inflammation.** J Clin Invest. 129(7):2619-2628.

Wynn, T. A., Chawla, A., Pollard, J. W. (2013). **Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease.** Nature 496, 445–455.

Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F., Wang, H. (2014). **Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.** Biomark Res 2(1):1.

Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M., Cohen, P. L. (2012). **Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction.** Journal of immunology 189(7):3508-3520.