

Proinbio

Escuela de Graduados – Facultad de Medicina

UDELAR

## **DOCUMENTO PARA ELABORAR ACTA EMITIDA POR BEDELÍA DE LA ESCUELA DE GRADUADOS**

### **TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS**

Título: *Desarrollo de nitroalquenos para el tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas a la inflamación crónica*

**De: MSc. Rosina Dapuetto**

**DIA: 16 de junio 2022**

**Hora: 13**

**Instituto Pasteur**

#### **INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL:**

Presidente PhD Cecilia Saiz  
Vocales: PhD Darío Vitturi y Victoria Prieto.

#### **Directores Académicos:**

Dres. Carlos Batthyany, Virginia López, Carlos Escande.

Fallo del Tribunal Nota<sup>1</sup> Excelente \_\_\_\_\_ Escala numérica<sup>2</sup>: 12 \_\_\_\_\_ -

La tesis presentada por la MSc. Rosina Dapuetto fue excelente tanto en su presentación escrita como oral. Ha contestado con solidez las preguntas realizadas por el tribunal mostrando un buen manejo de las diversas áreas que abarca la tesis. El intercambio con el tribunal mostró madurez científica y capacidad de discutir los resultados de forma abierta. Es de destacar que la tesis abarca todo el desarrollo preclínico de un compuesto, lo cual implicó un manejo de una gran diversidad de conocimiento metodológico y conceptual.

Asimismo, se destaca que el desarrollo de esta tesis permitió el registro de una patente, lo cual es un paso esencial para el desarrollo de un fármaco para uso humano. La tesista adjunta una publicación como primera autora en una revista de alto impacto y 2 como co-autora y una tercera en revisión, lo que demuestra la capacidad de la tesista de colaborar con diversos equipos.

En suma, la estudiante demuestra una excelente formación científica que la prepara para una exitosa carrera profesional.

- 
- <sup>1</sup>Excelente. Muy satisfactorio. Satisfactorio. Aceptable y No aprobado.
  - <sup>2</sup>Utilizar escala de 1 al 12

FIRMA DE LOS INTEGRANTES DEL TRIBUNAL:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'D. Vitturi', with a long horizontal stroke at the bottom.

Dario A. Vitturi, PhD.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Victoria Prieto-Echagüe', with a long horizontal stroke at the bottom.

Victoria Prieto-Echagüe, PhD.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Cecilia Saiz', with a long horizontal stroke at the bottom.

Cecilia Saiz, PhD



# “Desarrollo de nitroalquenos para el tratamiento de enfermedades metabólicas relacionadas a la inflamación crónica”

**MSc. Rosina Dapuetto**

Tesis de doctorado en Ciencias Médicas - Pro.In.Bio  
Facultad de Medicina - Universidad de la República

Directores: Dr. Carlos Batthyány, Dra. Virginia López  
y Dr. Carlos Escande

Institut Pasteur de Montevideo - Uruguay

Abril 2022

# Índice

Índice .....	2
Agradecimientos .....	4
Abreviaturas y siglas utilizadas .....	7
1. Resumen .....	13
2. Introducción.....	17
2.1 Enfermedades metabólicas y cardiovasculares .....	18
2.2 Obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina .....	21
2.3 Contribución de la inflamación durante la obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina .....	24
2.3.1 Inflamasomas .....	31
2.3.2 Inflamasoma NLRP3 .....	33
2.3.3 Rol del inflamasoma NLRP3 durante la obesidad y resistencia a la insulina.....	35
3. Antecedentes .....	39
3.1 Ácidos grasos electrofílicos .....	40
3.1.1 Formación endógena de los ácidos grasos electrofílicos .....	41
3.1.2 Blancos moleculares de los ácidos grasos nitrados .....	46
3.2 Nitroalquenos derivados del $\alpha$ -Tocoferol .....	51
Hipótesis de trabajo .....	55
4. Objetivo general .....	56
5. Objetivos específicos .....	57

6. Metodología .....	58
6.1 Síntesis orgánica .....	59
6.2 Caracterización fisicoquímica .....	72
6.3 Ensayos <i>in vitro</i> .....	74
6.4 Ensayos <i>in vivo</i> .....	79
7. Resultados y discusión.....	83
7.1 Síntesis orgánica .....	84
7.2 Caracterización fisicoquímica de NATx0 .....	98
7.2.1 Reactividad frente a nucleófilos modelo .....	98
7.2.2 Inhibición de la enzima GAPDH como nucleófilo modelo .....	103
7.2.3 Estabilidad en buffer fosfato y en plasma .....	105
7.3 Evaluación de los efectos biológicos <i>in vitro</i> de NATx0 .....	109
7.3.1 Estudio de la citotoxicidad en macrófagos .....	110
7.3.2 Estudio de la inhibición de NF- $\kappa$ B en macrófagos .....	110
7.3.3 Estudio de la activación del sistema Nrf2/keap1 .....	114
7.3.4 Estudio de la inhibición del inflammasoma NLRP3 .....	115
7.4 Evaluación de los efectos biológicos <i>in vivo</i> de NATx0 .....	132
7.4.1 Estudio de la capacidad antiinflamatoria de NATx0 en un modelo de inflamación aguda inducida por daño en pez cebra .....	132
7.4.2 Estudio de la capacidad anti-inflamatoria de NATx0 en un modelo de inflamación aguda inducida por LPS en ratón .....	136

7.4.3 Evaluación de los efectos de NATx0 en un modelo de ratón con obesidad y resistencia a la insulina inducida por dietas ricas en grasas .....	138
8. Conclusiones y perspectivas .....	152
Anexo. Alcance de la tesis .....	157
Bibliografía .....	164

## Agradecimientos

Quisiera comenzar agradeciendo especialmente a mis tres tutores.

Por un lado quisiera agradecer a Virginia López (Vicky), con quien inicié la etapa de este doctorado en el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias en el 2015. En ese entonces, Vicky me invitó a participar de sus proyectos y me vinculó a través de una de sus líneas de investigación con el Institut Pasteur, surgiendo la posibilidad de este doctorado. Gracias Vicky por las puertas que me abriste, por la confianza, por el apoyo incondicional, por enseñarme tu ética de trabajo y tus conocimientos científicos, y por estar siempre para lo que necesitase.

Quisiera agradecer a Carlos Batthyány (Batthy) quien desde el día uno me abrió la puertas de su laboratorio y del Instituto y me brindó un sinfín de oportunidades de crecimiento científico y personal. Gracias Batthy por tus enseñanzas, por vincularme y enseñarme de la temática, por apoyarme siempre (incluso al momento de irme), por tus consejos, por tu optimismo y por las risas que hemos compartido.

Quisiera agradecer a Carlos Escande, quien desde el primer día me brindó toda la confianza, me hizo parte también de su laboratorio en el Instituto y siempre estuvo para proponer, conversar y discutir sobre este trabajo. Gracias Carlos por haber enriquecido esta tesis con tus ideas, por enseñarme muchísimo de la temática, por tu exigencia y por tus consejos.

Por último, quiero decirles gracias a los tres por haberme apoyado de manera incondicional durante las diferentes etapas de carácter personal y profesional que retrasaron la finalización de esta tesis. En todo momento sentí que contaba con ustedes y que confiaban en mí.

Quisiera agradecer enormemente a mis compañeros y compañeras de los diferentes laboratorios a los cuales estuve vinculada.

Especialmente quisiera decirles gracias infinitas a Jorge y Germán. Ellos son quienes me acompañaron todos los días, quienes me enseñaron y me introdujeron en básicamente

todas las técnicas que utilicé, y las que no, las aprendimos juntos. Me ayudaron siempre y me siguen ayudando. Gracias por todos los momentos, las charlas, los consejos, la paciencia, la buena onda, las risas y por siempre estar para darme una mano. Extiendo el mismo agradecimiento a Laura y Alejandro, de quienes también aprendí muchísimo y siempre estuvieron y siguen estando para ayudarme. Gracias por sus innumerables aportes a este trabajo.

A todos mis compañeros y compañeras de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas y del Laboratorio de Biología Vascular y Desarrollo de Fármacos, por la disposición constante y los momentos compartidos.

A mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Patologías del Metabolismo y Envejecimiento por estar siempre para responder mis dudas y por toda la ayuda que me brindaron.

A mis compañeros y compañeras del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias y del Institut Pasteur, por tantos años compartidos, especialmente a Mariana.

Quisiera extender este agradecimiento a los responsables y compañeros de todos los laboratorios del Institut Pasteur con los cuales por un motivo u otro estuve vinculada. Considero que el Institut Pasteur de Montevideo es un lugar único de trabajo científico, donde prima el buen clima y el compañerismo, y donde me sentí muy a gusto realizando este doctorado.

Quisiera agradecer al grupo del Dr. Fernando García-Tellado de la CSIC de Tenerife, España, donde realicé una pasantía, la cual me permitió por un lado obtener parte de los compuestos propuestos en esta tesis y por otro lado participar de otras investigaciones del grupo.

A la Dra. Lucía Turell con quien realicé la mayor parte de los ensayos fisicoquímicos, con quien fue un gusto trabajar.

Al Dr. Flavio Zolessi, con quien realicé ensayos in vivo con el pez cebra y de microscopía de fluorescencia, que aunque no forman parte de la versión final de este trabajo, sin duda aportaron a mi formación científica. En el mismo sentido, quisiera agradecer a

Marcela Díaz, de la Unidad de Microscopía del Instituto, por la capacitación en los microscopios.

A la Unidad de Experimentación y de animales transgénicos del Instituto, por la disposición y ayuda relativa a los animales.

Quiero agradecer a mis compañeros que me acompañan hoy, especialmente a Florencia Arredondo, por la paciencia y por los consejos en esta última etapa del doctorado.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación y a la Comisión Académica de Posgrado de la Universidad de la República por las becas otorgadas para el desarrollo de esta tesis.

Quisiera finalizar agradeciendo a Williams, con quien comencé mi carrera académica y quien me formó como científica. Juntos, a su vez, nos acompañamos en nuestras vidas personales y formamos la familia que somos. Gracias por ser mi respaldo, mi guía, mi ejemplo, por estar siempre, por ayudarme en todas y también por tus invaluable aportes científicos a esta tesis.

A mis hijos Francisco y Guillermo, de 4 y 2 años, que nacieron durante el desarrollo de esta tesis, y considero son el mejor fruto de la misma.

A mis padres, hermanas y amigas por el apoyo incondicional de siempre.

## Abreviaturas y siglas utilizadas

<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esteroideo
<b>Akt</b>	Quinasa de serina/treonina, también conocida como proteína quinasa B (PKB/Akt)
<b>ALRs</b>	Receptores ausentes en melanoma 2 (Absent in melanoma 2 AIM-like Receptors)
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP (AMP-activated protein kinase)
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza (Analysis of variance)
<b>ApoE</b>	Apolipoproteína E
<b>ApoE E -/-</b>	Ratón transgénico knockout para ApoE
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante (Antioxidant Response Element)
<b>ASC</b>	Proteína adaptadora asociada a apoptosis conteniendo CARD (Apoptosis-associated speck like protein containing a CARD)
<b>ATP</b>	Adenosil Trifosfato
<b>AUC</b>	Área bajo la curva (Area under curve)
<b><math>\alpha</math>-TTP</b>	Proteína transferidora de $\alpha$ -Tocoferol (Alpha-Tocopherol Transfer protein)
<b>BMDM</b>	Macrófago derivados de médula ósea (Bone Marrow Derived Macrophages)
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina (Bovine Serum Albumin)
<b>CARD</b>	Dominio de reclutamiento y activación de caspasas (Caspase Activation and Recruitment Domain)
<b>COX1-2</b>	Enzima ciclooxigenasa 1 y 2
<b>CRP</b>	Proteína C Reactiva (C Reactive Protein)
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados al daño (Damage-associated Molecular patterns)

<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ECNT</b>	Enfermedades crónicas no transmisibles
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked immunoSorbent Assay)
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)
<b>FOXO1</b>	Factor de transcripción en la vía de señalización de la insulina (Forkhead box protein O1)
<b>FoxP3</b>	Factor de transcripción (Forkhead box P3)
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GCLM</b>	$\gamma$ -glutamilcisteína sintasa catalítica (Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit)
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa (Glucose transporters)
<b>GTT</b>	Test de tolerancia a la glucosa (Glucose Tolerance Test)
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad (High Density Lipoprotein)
<b>HFD</b>	Dieta alta en grasas (High Fat Diet)
<b>HMGB1</b>	Proteína 1 del grupo de alta movilidad (High Mobility Group Box-1)
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase)
<b>HSF-1</b>	Factor de Choque Térmico 1 (Heat Shock Factor 1)
<b>HSR</b>	Respuesta al choque térmico (Heat Shock Response)

<b>HSP-70</b>	Proteína de shock térmico de 70 KDa
<b>hpf</b>	Horas post-fertilización
<b>IAPP</b>	Polipéptido de amiloide de los islotes (islet amyloid polypeptide)
<b>IC50</b>	Concentración inhibitoria del 50% del valor inicial
<b>IFN-γ</b>	Interferón gamma
<b>IκB</b>	Inhibidor κB
<b>IKK</b>	IκB quinasa (IκB quinase)
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IR</b>	Receptor de la insulina
<b>IRAK-1</b>	Proteína quinasa asociada al receptor de interleuquina-1 (Interleukin-1 receptor associated kinase)
<b>IRFs</b>	Factores de transcripción reguladores de interferones (interferon-regulatory factors)
<b>IRS</b>	Sustrato de receptor de insulina (Insulin Receptor Substrate)
<b>JNK</b>	Quinasas c-Jun-N-terminal (c-Jun N-terminal kinases)
<b>KO</b>	Knockout
<b>LDH</b>	Enzima lactato deshidrogenasa
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad (Low-density Lipoprotein)
<b>LRR</b>	Repetido rico en leucina (Leucine Rich Repeat)
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos (de <i>Escherichia Coli</i> )
<b>MAPk</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno (Mitogen-activated protein kinase)
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1). También conocida como CCL2
<b>MHC</b>	Molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (Major

	Histocompatibility Complex)
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>MNS</b>	3,4-metilenedioxi- $\beta$ -nitroestireno
<b>MSU</b>	Urato de monosodio (Monosodium urate)
<b>mTORC1, 2</b>	Proteína diana de mamíferos del complejo de rapamicina 1 o 2 (Mammalian target of rapamycin complex 1 or 2)
<b>NATCH</b>	Dominio de unión a nucleótidos y oligomerización
<b>NA</b>	Nitroalqueno
<b>NATx0</b>	Nitroalqueno del Trolox
<b>NATx3,6,11</b>	Nitroalquenos derivados del Trolox de cadena larga
<b>NATOH</b>	Nitroalqueno del $\alpha$ -Tocoferol
<b>NATxMe</b>	Nitroalqueno del Trolox metil éster
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor Nuclear $\kappa$ B (Nuclear Factor $\kappa$ B)
<b>NLR</b>	Receptor de tipo NOD (NOD-like Receptor)
<b>NLRP3</b>	Proteína dominio de pirina de la familia NLR que contiene 3 (NLR family pyrin domain containing 3). También conocida como NALP3.
<b>NO<sub>2</sub>-OA</b>	Ácido nitrooleico
<b>NO<sub>2</sub>-LA</b>	Ácido nitrolinoleico
<b>NO<sub>2</sub>-cLA</b>	Ácido nitrolinoénico conjugado
<b>NQO1</b>	NAD(P)H Quinona Deshidrogenasa
<b>Nrf2/ Keap1</b>	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/ Kelch ECH associating protein 1)
<b>PAMP</b>	Patrón molecular asociado a patógenos (Pathogen-Associated Molecular Pattern)
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato (Phosphate-buffered Saline)
<b>PKD1</b>	Quinasa dependiente de fosfoinositol-1 quinasa (3-Phosphoinositide-

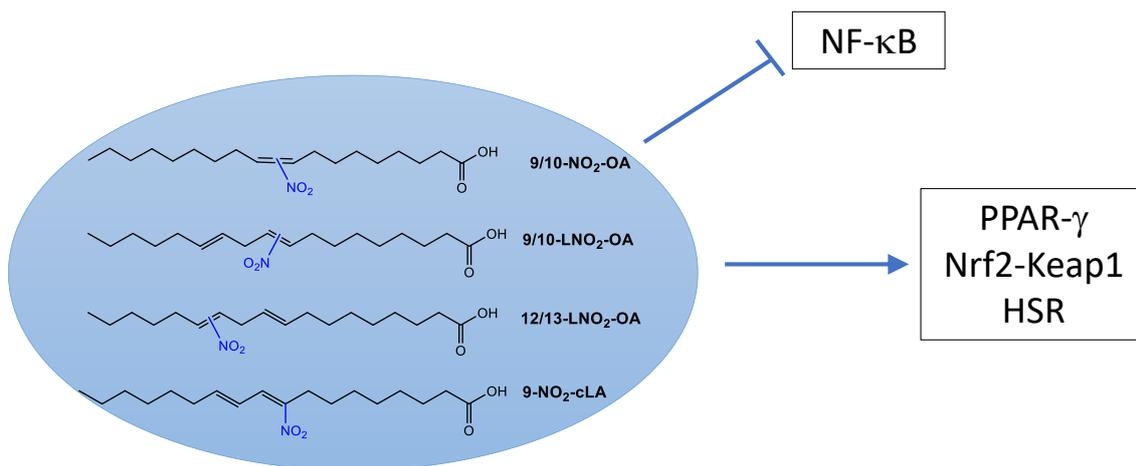
	dependent protein kinase 1)
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A (Protein Kinase A)
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C (Protein Kinase C)
<b>P2X7R</b>	Receptor purinérgico P2X7
<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato (Phorbol 12-myristate 13-acetate)
<b>PPAR<math>\alpha</math>-<math>\gamma</math></b>	Receptor alfa o gamma activado por proliferación (Peroxisome proliferator Activated Receptor alpha or gamma)
<b>Pro-IL1<math>\beta</math> o 18</b>	Precursor inactivo de IL1 $\beta$ o 18
<b>PRR</b>	Dominio de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptor)
<b>PYD</b>	Dominio Pyrin (Pyrin Domain)
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
<b>ROI</b>	Región de interés (Region of Interest)
<b>ROS</b>	Especies Reactivas del Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
<b>SAA</b>	Proteína amiloide sérica (Serum amyloid A)
<b>SANA</b>	Nitroalqueno del ácido salicílico
<b>SAT</b>	Tejido adiposo subcutáneo (Subcutaneous Adipose Tissue)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>SOCS3</b>	Supresor de la señalización de citoquinas 3 (Suppressor of cytokine signaling 3)
<b>T.A</b>	Temperatura ambiente
<b>TBS</b>	Solución salina tamponada con Tris (Tris-buffered saline)
<b>TBS-T</b>	TBS adicionado con Tween20
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TG</b>	Triglicéridos

<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor beta)
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll (Toll-like Receptor)
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor)
<b>TOR</b>	Proteína quinasa diana de rapamicina (Target of rapamycin)
<b>Th</b>	Respuesta de tipo T auxiliar (Helper)
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador
<b>TXNIP</b>	Proteína que interactúa con la tiorredoxina (Thioredoxin-interacting protein)
<b>TZDs</b>	Tiazolidindionas
<b>VAT</b>	Tejido adiposo visceral (Visceral
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad (Very Low Density Lipoprotein)
<b>WD</b>	Dieta occidental (Western Diet)
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>WT</b>	Wild type

# 1. Resumen

Las enfermedades metabólicas crónicas, como la obesidad, la diabetes de tipo 2 y la hipertensión arterial, conllevan a un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Estas enfermedades tienen en común la presencia de un estado inflamatorio crónico, estéril, subclínico que es perpetuado por células del sistema inmune así como también por otro tipo de células, como los adipocitos <sup>1,2</sup>. Existe en la bibliografía una vasta descripción de los distintos “activadores” que producen este proceso inflamatorio que surgen en el contexto de estas enfermedades, como son los altos niveles de glucosa o de ácidos grasos libres en sangre, y que en general desencadenan una activación crónica del factor de transcripción NF-κB y de los inflammasomas, especialmente el inflammasoma NLRP3 <sup>3-5</sup>. Sin embargo, los antiinflamatorios tradicionales (AINE y los antiinflamatorios esteroideos) no han mostrado beneficios terapéuticos en el tratamiento de estas enfermedades. En este sentido, sería deseable contar con estrategias terapéuticas que permitan frenar o reducir la inflamación crónica que subyace en la etiopatogenia de estas enfermedades y que son responsables de más del 50 % de las muertes a nivel mundial <sup>6</sup>.

Durante el desarrollo de los procesos inflamatorios, se generan mediadores electrofílicos de origen lipídico que poseen efectos antiinflamatorios pluripotenciales y que participan en la resolución de la inflamación <sup>7,8</sup>. Estos mediadores se forman como consecuencia del estrés oxidativo generado durante la inflamación y a través de reacciones de peroxidación de lípidos las cuales generan sustratos reactivos que reaccionan con óxido nítrico (NO) o sus derivados (nitrito, nitrato, peroxinitrito y dióxido de nitrógeno) formando ácidos grasos insaturados nitrados. Desde un punto de vista químico, estas moléculas son nitroalquenos endógenos y presentan actividad electrofílica, que les permite ejercer potentes efectos antiinflamatorios mediante reacciones postraduccionales reversibles a través de una adición de Michael con nucleófilos presentes en proteínas <sup>9,10</sup>. Hasta la fecha se ha descrito que los nitroalquenos de ácidos grasos modulan cuatro vías de señalización: activan PPAR-γ, Nrf-2/Keap1 y HSR e inhiben NF-κB <sup>11-13</sup>. Estos nitroalquenos incluyen el ácido nitrooleico (NO<sub>2</sub>-OA), ácido nitrolinoleico (NO<sub>2</sub>-LA) y ácido nitrolinolénico conjugado (NO<sub>2</sub>-cLA) los cuales fueron evaluados en estudios clínicos (fase I y II) para el tratamiento de diversas patologías <sup>14-17</sup> (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Estructuras de los ácidos grasos electrofílicos (nitroalquenos) de origen lipídico y sus principales mecanismos de acción.

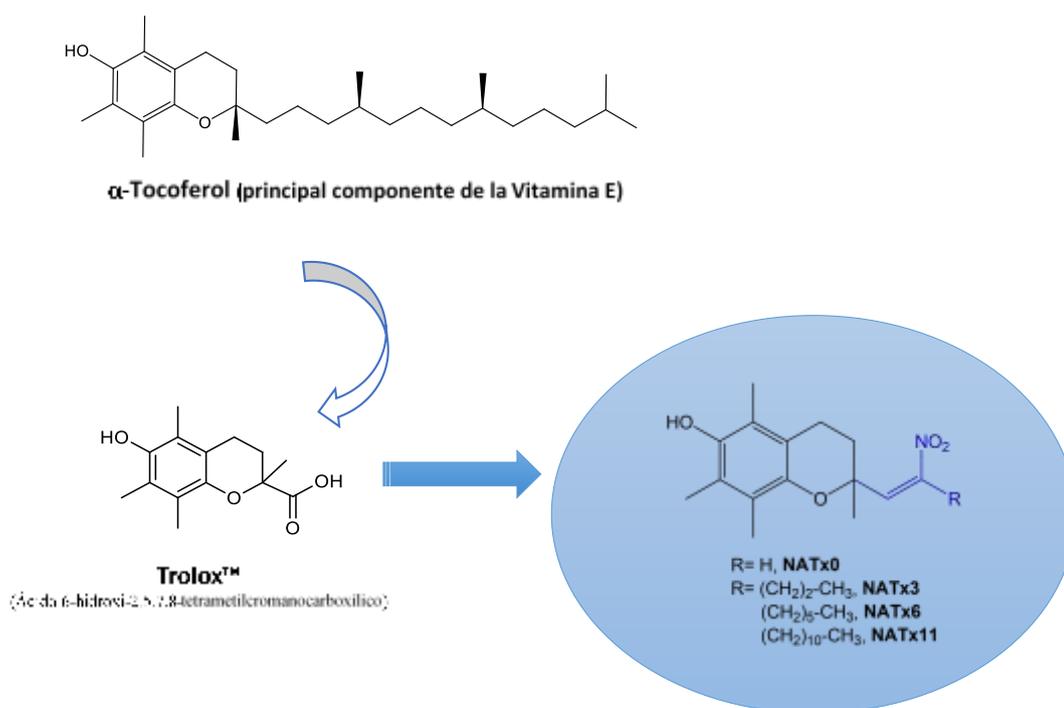
Debido a sus potentes efectos antiinflamatorios, diferentes nitroalquenos de ácidos grasos han sido sintetizados y evaluados como potenciales fármacos en diferentes modelos animales de enfermedad metabólica y vascular <sup>7,8,18,19</sup>. Se ha demostrado que inhiben la hipertensión arterial inducida por angiotensina II <sup>20</sup>, protegen del daño por isquemia/reperfusión cardíaca <sup>8</sup> y renal <sup>21</sup> y de la sepsis inducida por endotoxinas <sup>22</sup>; reducen la aterosclerosis en ratones apo E<sup>-/-</sup> <sup>23</sup>, inhiben la formación de neointima arterial en modelo de lesión endovascular y mejoran el síndrome metabólico asociado a la obesidad <sup>24</sup>. Sin embargo, se sabe que sufren una rápida metabolización (saturación, β-oxidación, conjugación y eliminación) que afecta su reactividad, farmacocinética y limitaría sus acciones biológicas <sup>25</sup>.

En los últimos diez años, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado y patentado nitroalquenos de *segunda* y *tercera* generación en la búsqueda de nuevos tratamientos que enlentezcan o reviertan el desarrollo de este conjunto de enfermedades que tienen en su base etiopatogénica el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico subclínico, mejorando las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los nitroalquenos derivados de ácidos grasos <sup>26-28</sup>.

Los compuestos desarrollados durante esta tesis doctoral son derivados del análogo hidrosoluble del α-Tocoferol (denominado comercialmente Trolox™), donde el grupo nitroalquenilo se ha incorporado en la posición 2 del anillo cromanol con o sin una

cadena hidrocarbonada, sustituyendo la cadena lateral del  $\alpha$ -Tocoferol (Figura 1.2).

De este modo, el derivado menos liposoluble, denominado NATx0, contiene como sustituyente R un hidrógeno, mientras que NATx3, NATx6 y NATx11 contienen una cadena lateral hidrocarbonada de diferente largo (3, 6 y 11 carbonos, respectivamente).



**Figura 1.2.** Nitroalquenos derivados del Trolox™, análogo hidrosoluble del  $\alpha$ -Tocoferol, sintetizados en la presente tesis.

*Debido a resultados preliminares muy promisorios, nos enfocamos en el desarrollo y evaluación biológica de NATx0 como potencial estrategia antiinflamatoria. Encontramos que NATx0 es capaz de inhibir la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y la activación del inflammasoma NLRP3 en macrófagos in vitro. A su vez, NATx0 demostró poseer propiedades antiinflamatorias in vivo en un modelo de injuria en pez cebra así como también en ratones con inflamación aguda. Por último, NATx0 fue evaluado como estrategia terapéutica para reducir la resistencia a la insulina generada durante la obesidad en ratones, encontrando que dicho compuesto presenta efectos protectores frente a la inflamación y la intolerancia a la glucosa.*

## **2. Introducción**

## 2.1 Enfermedades metabólicas y cardiovasculares.

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), han superado a las enfermedades infecciosas como principales causas de mortalidad a nivel mundial <sup>29</sup>. Este conjunto de enfermedades tienden a ser de larga duración y resultan de la combinación de diferentes factores ya sea genéticos, fisiológicos, ambientales y conductuales <sup>29</sup>. En este sentido, la generalización de hábitos y estilos de vida poco saludables, así como el envejecimiento de la población han contribuido al desarrollo desproporcionado de las mismas.

Las ECNT incluyen, principalmente, a las enfermedades cardiovasculares (ECV), cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes. Las ECV son, a nivel mundial, responsables de un tercio del total de las muertes, con aproximadamente 17 millones al año siendo la principal causa de muerte a nivel mundial (Figura 2.1, cifras del año 2016, <sup>29</sup>).



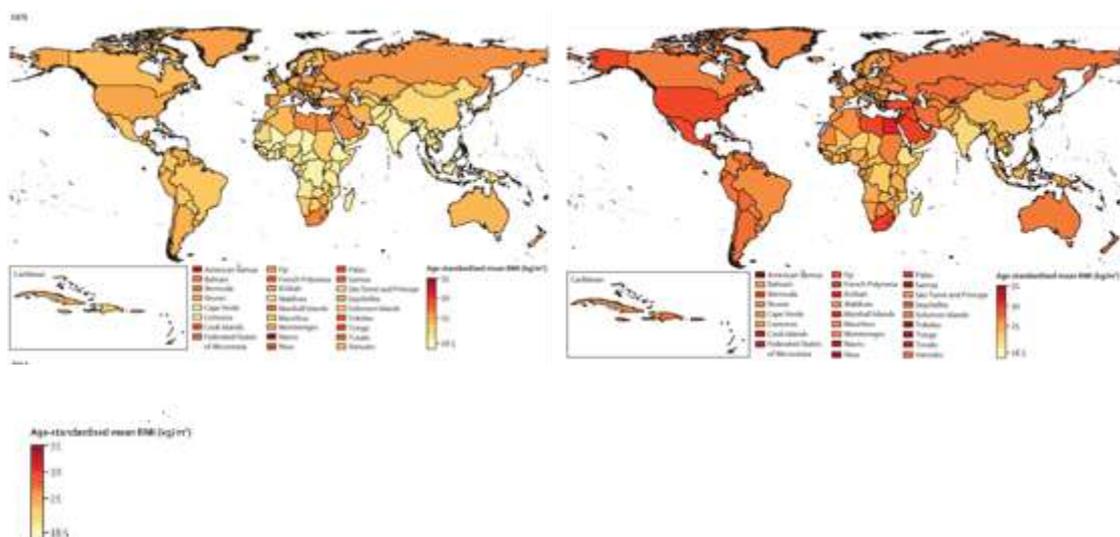
**Figura 2.1.** Número total de muertes al año, a nivel mundial, por enfermedades no transmisibles (ECNT). Tomado de: página web WHO <sup>29</sup>.

En nuestro país, en el año 2020 fallecieron 8300 personas por ECV, donde las enfermedades cerebrovasculares resultaron ser la primera causa de muerte, seguido por el grupo de enfermedades isquémicas del corazón. Si se estudian las principales causas de muerte según sexo en Uruguay, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en mujeres, mientras que en los hombres son la segunda causa de muerte después del cáncer <sup>30,31</sup>.

Las ECV se desprenden del estilo de vida moderno que incluye el consumo de tabaco, el consumo en exceso de alimentos no saludables, inactividad física, ingesta excesiva de sal/sodio, consumo elevado de alcohol, entre otros <sup>32</sup>. Todos estos factores se desprenden de comportamientos modificables y se manifiestan clínicamente mediante la hipertensión arterial, el aumento de glucosa y lípidos en sangre, y la obesidad <sup>33</sup>. En términos de muertes atribuibles, el principal factor de riesgo metabólico es el aumento de la presión arterial (al que se atribuyen el 19% de las muertes a nivel mundial), seguido por el sobrepeso y la obesidad y el aumento de la glucosa en sangre (que también se pueden agrupar, dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad como síndrome metabólico o diabetes tipo 2).

Clínicamente, la obesidad se define mediante el índice de masa corporal (IMC), considerándose un IMC  $\geq 25$  como sobrepeso y un IMC  $> 30$  kg/m<sup>2</sup> como obesidad <sup>34</sup>.

Recientemente, se han publicado datos del peso de adultos desde el año 1975 al 2014 y se puede apreciar que la población mundial adulta gana 1.5 kg de peso en promedio por cada década transcurrida. Desde 1975 la proporción de hombres obesos se ha triplicado y de mujeres duplicado <sup>35</sup> (Figura 2.2). Para el año 2025 se predice que un quinto de la población mundial será obesa <sup>36,37</sup>. De hecho, la agencia *American Medical Association* ha clasificado recientemente a la obesidad como una enfermedad en sí, y no solo como factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares y metabólicas <sup>38</sup>.

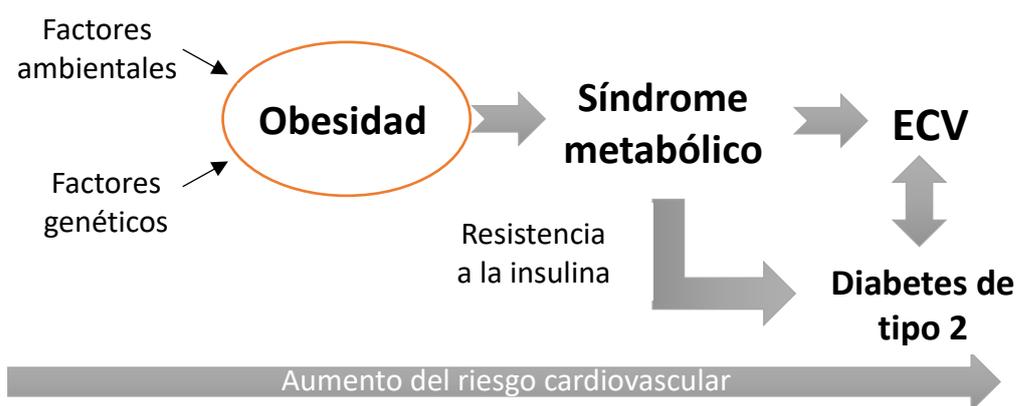


**Figura 2.2.** Mapa del mundo en escala de colores representando los promedios estandarizados según edad (+18 años) del índice de masa corporal en mujeres, por país, en el año 1975 (mapa izquierda) y en el año 2014 (mapa derecha). Tomado de NCD Risk Factor Collaboration, 2016, Lancet <sup>36</sup>.

En los últimos 45 años, se han logrado avances muy significativos en el estudio de la patogénesis de las enfermedades vasculares, destacándose inicialmente el rol que desempeña el colesterol y posteriormente el síndrome metabólico en el desarrollo de las mismas. **El síndrome metabólico se diagnostica clínicamente cuando un paciente presenta tres de los siguientes factores de riesgo cardiovasculares: obesidad o aumento del perímetro abdominal, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, disminución de la HDL (lipoproteína de alta densidad) y glicemia de ayuno alterada**<sup>39</sup>.

Hoy en día este síndrome afecta a un 30-40% de los adultos al llegar a los 65 años, como consecuencia de la ganancia de peso, así como también por predisposiciones genéticas y epigenéticas a acumular grasa intraabdominal (grasa ectópica). Aunque este síndrome conoce sus inicios en el mundo occidental, con la propagación del estilo de vida occidental hacia el resto del mundo se ha vuelto un problema global, siendo sus principales causas el aumento de consumo de dietas altamente calóricas (genéricamente conocidas como Western diet's) y el detrimento de la actividad física como consecuencia del transporte mecánico y actividades sedentarias<sup>40</sup>.

Individuos que poseen síndrome metabólico tienen mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2, comparado con los individuos que no poseen este síndrome<sup>41</sup> (Figura 2.3). A su vez, el riesgo incrementa cuando más de uno o todos los componentes del síndrome están presentes.

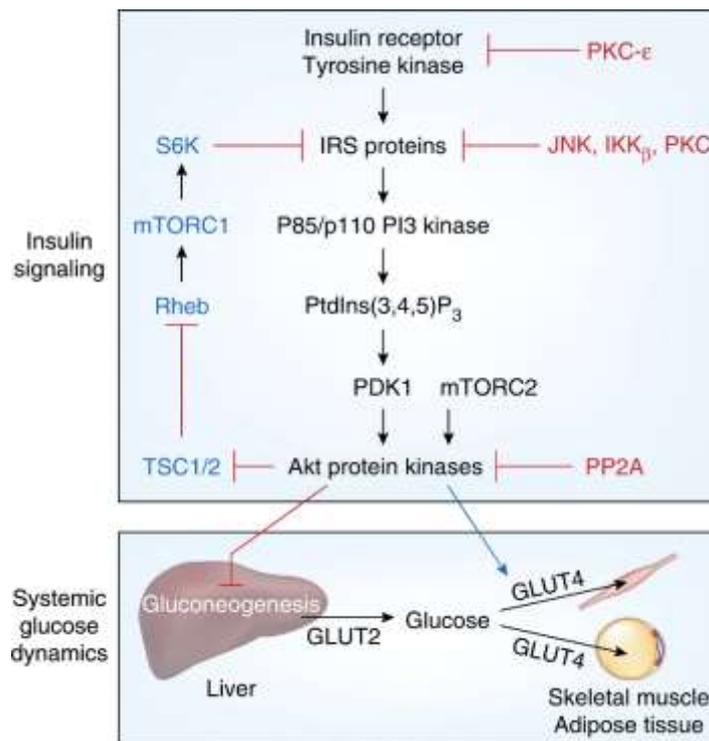


**Figura 2.3.** Interrelación entre obesidad, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular.

## 2.2 Obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina se puede definir como una disminución en la capacidad de los tejidos metabólicos periféricos de responder a la insulina, impidiendo el mantenimiento normal del metabolismo glucídico. Este efecto aumenta los niveles de glucosa en sangre lo cual a su vez estimula la secreción de insulina por los islotes  $\beta$  del páncreas. La resistencia a la insulina está asociada con la obesidad y el comportamiento sedentario y precede a la diabetes de tipo 2 <sup>42</sup>.

La hormona insulina es secretada por las células  $\beta$  del páncreas durante la ingesta de alimentos provocando la inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepáticas y promoviendo la captación de glucosa en tejidos periféricos: músculo, tejido adiposo e hígado (Figura 2.4). La respuesta a la insulina permite el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre principalmente a través de la activación de la proteína quinasa Akt, la cual regula la cascada de señalización de la insulina <sup>43</sup>. La unión de la insulina a su receptor (IR) activa su actividad intrínseca tirosina-quinasa, provocando la fosforilación de las proteínas sustrato del receptor de la insulina (IRS) en los residuos de tirosina (Figura 2.4). Esto desencadena el acercamiento e interacción entre las proteínas quinasas PDK1 y Akt, provocando la fosforilación en la treonina 308 de Akt y su activación. Alternativamente, la fosforilación y activación de Akt se puede dar a través de la quinasa mTORC2. A su vez, la activación de Akt puede provocar la activación de otro complejo, mTORC1, el cual atenúa la respuesta a la insulina por la fosforilación de IRS en residuos de serina. A nivel hepático, la insulina bloquea la activación del factor de transcripción FOXO1 a través de Akt inhibiendo la expresión de enzimas relacionadas a la gluconeogénesis y activa la lipogénesis *de novo* (síntesis de ácidos grasos a través de glucosa y aminoácidos) que permite la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) cargadas de triglicéridos para su transporte a tejidos periféricos <sup>44,45</sup>. En el tejido adiposo, la insulina inhibe la lipólisis (hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos y glicerol) inhibiendo PKA e induce la expresión de GLUT4 y la lipogénesis *de novo*, permitiendo el almacenamiento de energía bajo la forma de triglicéridos <sup>42</sup>. A nivel muscular también induce la expresión de GLUT4 aumentando el consumo periférico de glucosa (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Cascada de señalización de la insulina. Tomado de Czech et al., 2017, Nat Med <sup>42</sup>.

***El tejido adiposo presenta un importante rol en el control de la homeostasis lipídica y glucosídica corporal, el cual se ve alterado durante la obesidad*** <sup>46</sup>.

Durante el desarrollo de la obesidad, existe una acumulación excesiva del tejido adiposo blanco en sitios anatómicamente inusuales. La acumulación del tejido adiposo está estrictamente conservada entre las diferentes especies y se localiza principalmente debajo de la piel (tejido adiposo subcutáneo o SAT) o en los órganos internos (tejido adiposo visceral o VAT). La obesidad se genera por una acumulación y expansión del tejido adiposo blanco a nivel abdominal (más concretamente a nivel visceral) mediante el incremento del tamaño del adipocito maduro existente en el tejido (debido al incremento del contenido lipídico), proceso que se conoce como **hipertrofia**, y por un incremento en el número de adipocitos como consecuencia de la diferenciación de células adiposas precursoras, proceso conocido como adipogénesis o **hiperplasia** <sup>38,47</sup>. Diferentes estudios describen que la acumulación de la grasa en VAT presenta una fuerte asociación con la resistencia a la insulina. En este contexto, inicialmente el exceso de energía se logra almacenar bajo la forma de triglicéridos, principalmente dentro de una

única "gota lipídica". Las gotas lipídicas en los adipocitos son estructuras asociadas a un conjunto de proteínas que permiten la acumulación o movilización de los lípidos almacenados <sup>48,49</sup>. Cuando se necesita energía (condición de ayuno), estos lípidos son rápidamente hidrolizados por lipasas hormono-sensibles (lipólisis) y los ácidos grasos resultantes son transportados por la sangre (unidos a la albúmina) a otros tejidos para ser oxidados, principalmente a nivel de las células musculares para producir energía. Es así que los adipocitos tienen una gran capacidad de sintetizar y almacenar triglicéridos durante la ingesta de alimentos, así como de hidrolizar triglicéridos y liberar ácidos grasos libres durante el ayuno. Existe un dinámico equilibrio entre la liberación de ácidos grasos a la circulación y su captación y posterior oxidación en el músculo esquelético, el cual se ve alterado durante la obesidad <sup>50</sup>. ***Niveles elevados de ácidos grasos libres circulantes se correlaciona con la resistencia a la insulina generada en el músculo esquelético (lipotoxicidad)*** <sup>51-54</sup>. En este sentido, el tejido adiposo tiene un rol preponderante en el control del metabolismo corporal, siendo que la falta de tejido adiposo conlleva a niveles elevados de triglicéridos y ácidos grasos libres circulantes, lo cual genera resistencia a la insulina en ratones y humanos <sup>55,56</sup>. Además, el tejido adiposo puede secretar hormonas peptídicas, entre ellas la ***leptina*** y la ***adiponectina***, las cuales juegan roles fundamentales como sensores del consumo energético y que también se encuentran alteradas durante el desarrollo de la obesidad. La leptina en condiciones de normopeso regula el apetito, el peso corporal y mantiene la homeostasis energética. Su acción resulta en la liberación de adrenalina y noradrenalina desde las terminales nerviosas en el tejido adiposo, activando los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en adipocitos, incrementando la lipólisis y los procesos termogénicos. Durante la obesidad, a pesar de encontrarse niveles aumentados de leptina, se genera una resistencia a la misma asociada a una menor respuesta por parte del receptor de leptina o a un transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica <sup>57</sup>. La adiponectina es una hormona que posee efectos antidiabéticos, antiinflamatorios, antiaterogénicos y cardioprotectores. Su expresión y niveles en suero se encuentran disminuidos en pacientes obesos, así como también en animales de experimentación. La adiponectina actúa principalmente a través de los receptores AdipoR1 y AdipoR2, siendo AdipoR1 más abundante en músculo esquelético y AdipoR2 en hígado. En músculo, modula la sensibilidad por la insulina a través de AMP quinasa (AMPK) y PPAR $\alpha$ , mientras que en

hígado activa el transporte de glucosa, inhibe la gluconeogénesis vía AMPK e induce sensibilidad a la insulina promoviendo la fosforilación del receptor de insulina y de IRS-1. En el páncreas, la adiponectina actúa sobre la proliferación celular estimulando la secreción de insulina mientras que en tejido adiposo incrementa la captación de glucosa estimulada por insulina a través de AMPK <sup>34,58</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que la adiponectina atenúa la inflamación en células endoteliales, musculares, epiteliales y en macrófagos, estimulando la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, suprimiendo las vías de señalización de NF- $\kappa$ B y TNF- $\alpha$  <sup>58</sup>.

### **2.3 Contribución de la inflamación durante la obesidad y desarrollo de resistencia a la insulina.**

La inflamación es la respuesta del sistema inmune frente a una infección o daño tisular y se caracteriza por responder mediante una serie de reacciones que incluyen la vasodilatación y reclutamiento de células inmunes y proteínas plasmáticas al sitio de infección o daño. Está caracterizada en general por una infiltración de neutrófilos en primer lugar y luego de monocitos que se diferencian a macrófagos, los cuales tienen la capacidad de fagocitar a los causantes de la inflamación y producir mediadores tóxicos, que permiten contener el agente causal y evitar mayor daño en los tejidos. En este sentido, la inflamación es crucial para el organismo y se resuelve en un lapso determinado. Sin embargo, cuando la inflamación aguda no logra resolver el problema, se genera una respuesta inflamatoria desregulada que puede causar daño excesivo en los tejidos, contribuyendo al desarrollo de enfermedades <sup>59</sup>. La inflamación crónica está caracterizada por la infiltración de células, entre ellas macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B, por la destrucción de tejidos provocada por el agente causal o por la propia inflamación e intentos por repararlos, que a menudo derivan en el desarrollo de fibrosis. Cuando el consumo de dietas altamente calóricas se hace persistente, el equilibrio entre la liberación de ácidos grasos y su captación en órganos periféricos se encuentra alterado así como también la habilidad de las células adiposas de funcionar como células endócrinas se ve afectada, lo cual redundando en un estado inflamatorio crónico <sup>60,61</sup>.

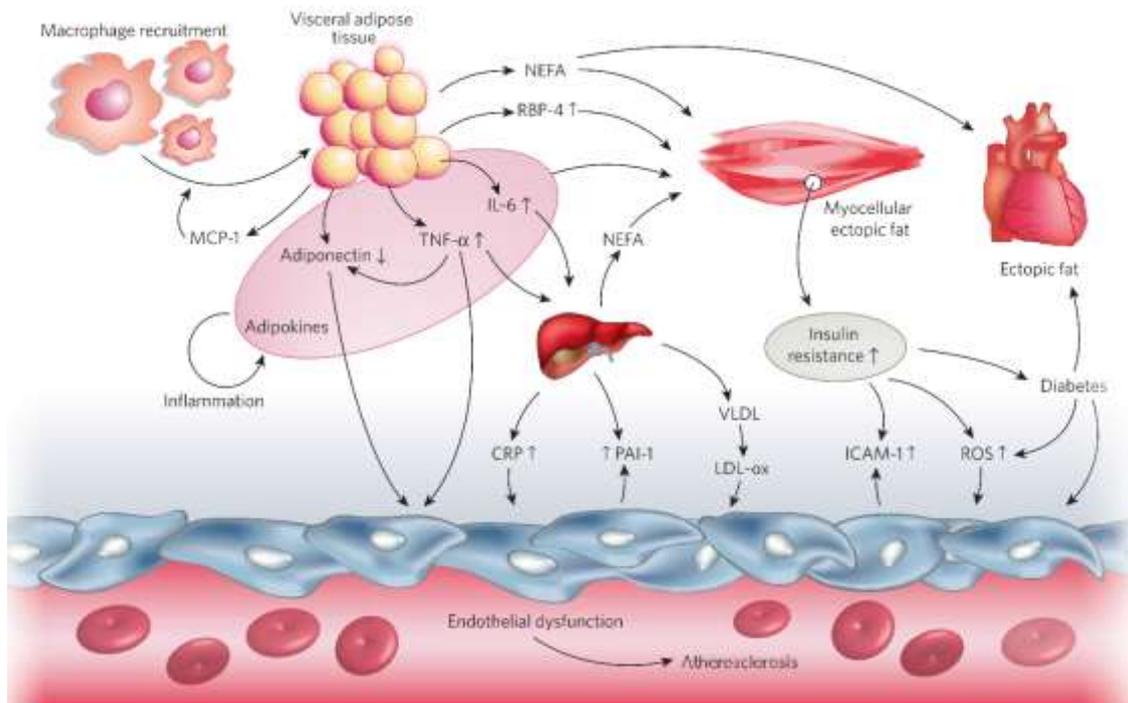
***Durante el desarrollo etiopatogénico de la obesidad, existe un desbalance en la homeostasis energética del tejido adiposo, lo cual mediante diferentes mecanismos aún en estudio, provoca una respuesta inflamatoria caracterizada por un proceso inflamatorio crónico, estéril y sistémico, desarrollado a nivel subclínico y perpetrado fundamentalmente en el tejido adiposo.*** La inflamación crónica es una respuesta directa de la obesidad y su intensidad se encuentra directamente relacionada con la resistencia a la insulina, la diabetes de tipo 2, la dislipidemia y la hipertensión. La alteración inmune en el tejido adiposo involucra el reclutamiento de células y la activación de procesos proinflamatorios tanto en las poblaciones de células inmunes residentes en el tejido como en los propios adipocitos. ***Entre los tipos celulares involucrados se encuentran poblaciones asociadas a la respuesta inmune innata como las células dendríticas y macrófagos así como también células características de la inmunidad adaptativa, como linfocitos T reguladores, linfocitos T convencionales (Th1, Th2 y Th17) y linfocitos T citotóxicos.***

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígenos por excelencia y se caracterizan por expresar en su superficie una gran diversidad de receptores capaces de reconocer PAMPs y DAMPs, junto con la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que le permiten presentar antígenos a los linfocitos T y activarlos. Existe una evidencia clara del rol central que poseen las células dendríticas en el desarrollo de la inflamación en el tejido adiposo, actuando como un nexo fundamental entre la inmunidad innata y adaptativa, y por lo tanto tienen un rol en el inicio y la regulación de la inflamación inducida durante la obesidad <sup>62</sup>. Se ha observado que las células dendríticas residentes en el tejido adiposo de ratones obesos son capaces de captar y presentar antígenos a células T CD4<sup>+</sup> *naive* y provocar su diferenciación a linfocitos Th17. Estos linfocitos, que son células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17 tienen un rol proinflamatorio durante la obesidad <sup>63</sup>. De hecho, se ha descrito el incremento de estos linfocitos en el tejido adiposo de personas obesas y resistentes a la insulina, produciendo alteraciones metabólicas en células aisladas de músculo esquelético y hepatocitos <sup>64</sup>. También se ha reportado la activación del inflammasoma NLRP3 en células dendríticas del tipo CD11c<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> mediada por ácidos grasos saturados provenientes de la dieta, estimulando la producción de IL-1 $\beta$  vinculada al desarrollo de resistencia a la

insulina <sup>65</sup>. Los linfocitos T reguladores (Treg), representan una subpoblación especializada de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que expresan el factor de transcripción FoxP3 y se encuentran como una población con características específicas del tejido adiposo, teniendo como función principal de limitar la inflamación en dicho tejido y proteger del desarrollo de resistencia a la insulina. Su acción es limitar la activación del sistema inmune manteniendo así la homeostasis en el tejido. Esta población se ha encontrado enriquecida en la grasa abdominal de ratones normales y específicamente reducida en dicha grasa en modelos murinos de obesidad con resistencia a la insulina. De manera análoga, se ha evidenciado dicha relación en el tejido adiposo de humanos obesos <sup>66</sup>. Durante la obesidad se observa un aumento en el número de linfocitos Th1, que provocan respuestas proinflamatorias a partir de la producción de IFN- $\gamma$ , mientras que los linfocitos Th2 se mantienen relativamente constantes (los cuales provocan respuestas antiinflamatorias por la producción de IL-4, IL-5 e IL-13). Esto genera un desbalance hacia una respuesta más del tipo Th1, que no logra ser contenida por los linfocitos Th2 ni los Treg que se encuentran disminuidos durante la obesidad, generando el desarrollo de resistencia a la insulina <sup>67</sup>. También se ha observado una infiltración de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos al tejido adiposo durante la obesidad, que precede a la infiltración de macrófagos. Estas células inducen TNF- $\alpha$  e IL-6 lo cual provoca el reclutamiento de monocitos y su diferenciación hacia macrófagos de tipo M1 <sup>67,68</sup>.

En este contexto, el tejido adiposo actúa como un órgano endocrino activo, secretando un conjunto de moléculas que reciben el nombre de **adipoquinas**, por su similitud con las citoquinas y que son producidas tanto por los adipocitos como por células de la fracción estromal vascular del tejido, entre ellas precursores de adipocitos, células endoteliales y células del sistema inmune. **Estas moléculas sintetizadas incluyen citoquinas proinflamatorias, hormonas peptídicas y otras moléculas biológicamente activas (Figura 2.5)** <sup>69,70</sup>. El equilibrio en la producción de estas moléculas se encuentra alterado durante la obesidad como consecuencia de la disfunción del tejido adiposo, resultando en un estado inflamatorio crónico. La secreción de citoquinas proinflamatorias se produce principalmente por la activación de la quinasa JNK (c-Jun N-terminal kinase) y del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B), <sup>43,71</sup> el cual también se encuentra involucrado en la activación de los inflamasomas, especialmente

NLRP3, contribuyendo en el desencadenamiento de la inflamación.

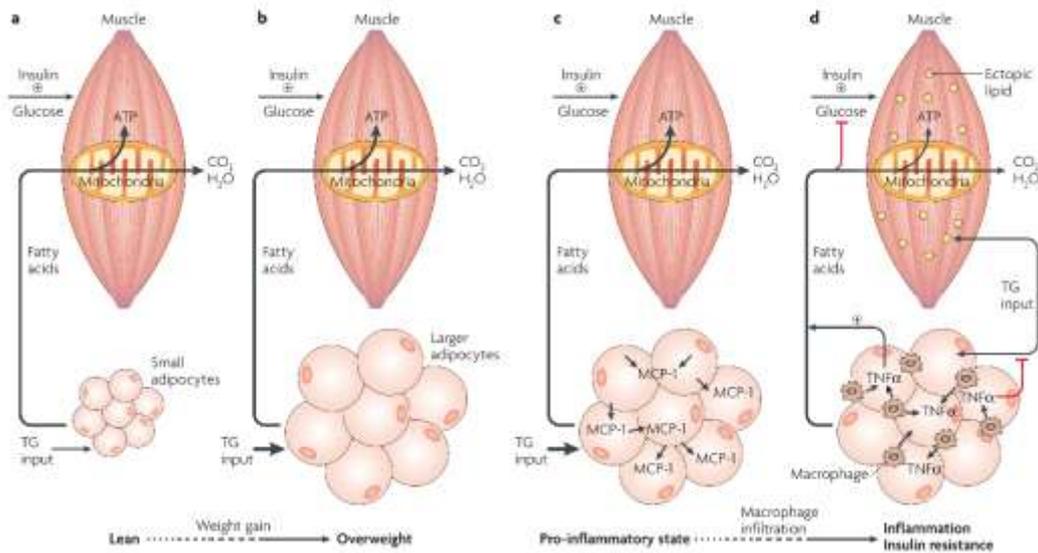


**Figura 2.5.** Secreción de adipocinas por parte del tejido adiposo visceral y su contribución en la resistencia a la insulina, diabetes y disfunción endotelial. Tomado de: Luc F. Van Gaal *et al* Nature, 2006 <sup>1</sup>.

Las citoquinas y quimioquinas expresadas pueden incluir a TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-10, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , IL-8, siendo ejemplo de otras adipocinas expresadas la proteína C-reactiva (CRP) y la proteína amiloide sérica A (SAA) <sup>72</sup>. MCP-1 es una quimioquina que juega un rol relevante como molécula quimio-atrayente al inducir una mayor infiltración de macrófagos al tejido adiposo. De hecho, en pacientes con normopeso el tejido adiposo contiene aproximadamente entre 5-10% de macrófagos, mientras que en pacientes obesos el contenido de macrófagos puede ser superior al 50% del total de células. De esta manera, MCP-1 es un importante contribuyente del estado inflamatorio que persiste durante la obesidad <sup>61,73</sup>. Los macrófagos del tejido adiposo (ATM), que residen en el tejido adiposo visceral y el subcutáneo de manera constitutiva y que se incrementan de manera progresiva durante el desarrollo de la obesidad, se correlacionan directamente con el tamaño del adipocito y la masa corporal tanto en el

VAT (incluyendo los depósitos perigonadales, perirrenales y mesentéricos) así como también en SAT tanto en humanos como en ratones <sup>61</sup>. Desde el punto de vista histológico, los macrófagos rodean los adipocitos apoptóticos formando estructuras de tipo corona, las cuales representan un distintivo de la presencia de procesos inflamatorios en el tejido adiposo <sup>74</sup>. A su vez, los macrófagos pueden alternar el fenotipo de M0 o M2 en condiciones normales (fenotipo antiinflamatorio por acción de IL-10 que permite mantener la sensibilidad a la insulina) a fenotipos de tipo M1 durante la obesidad, el cual se asocia a la expresión de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  y a la generación de especies reactivas del oxígeno mediante la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) <sup>75,76</sup>. Se ha descrito en la literatura que los ATM de humanos y ratones obesos no expresan en su superficie los marcadores típicos de los macrófagos tipo M1 (activación clásica mediante LPS y expresión de CD38). Se demostró que mediante el tratamiento de macrófagos con una mezcla de insulina, glucosa y palmitato se induce un fenotipo de macrófago diferente al obtenido mediante la activación clásica, sugiriendo que los mecanismos de activación en condiciones de obesidad pueden ser diferentes a los que se inducen durante una infección <sup>77</sup>.

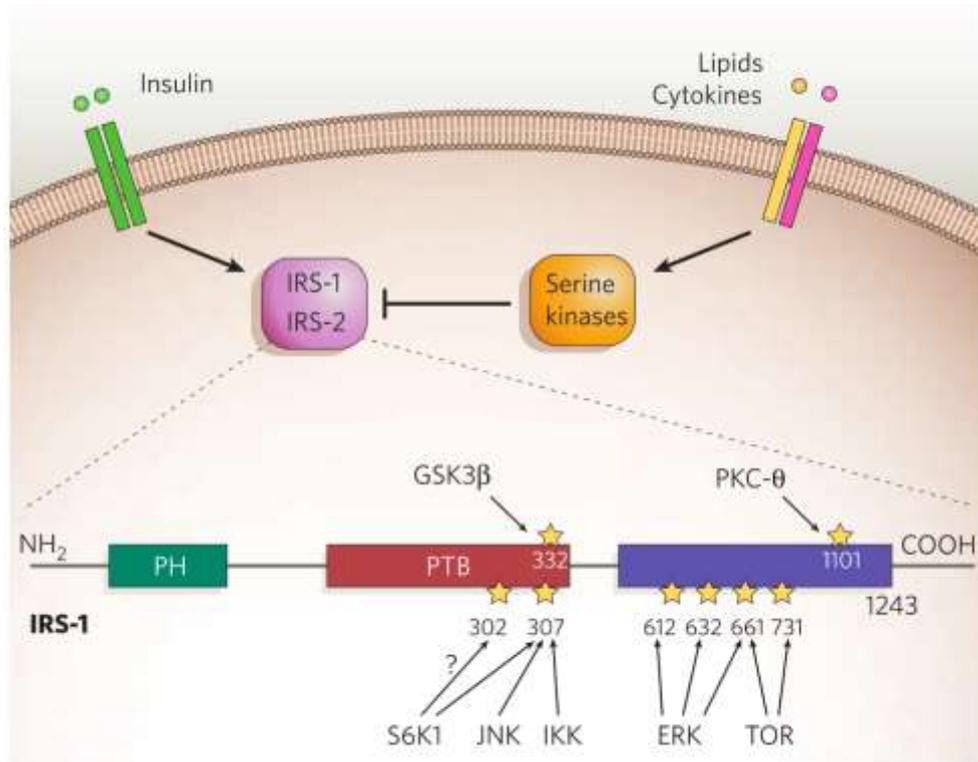
***La contribución de la expresión de citoquinas proinflamatorias posee efectos dramáticos en la función del tejido adiposo, lo cual redundando en la inducción del síndrome metabólico.*** Estas moléculas inducen la lipólisis y disminuyen la síntesis de triglicéridos, aumentando el nivel de ácidos grasos libres circulantes y provocando la acumulación de lípidos ectópicos en el músculo, hígado, células  $\beta$ -pancreáticas y corazón (Figura 2.6) <sup>78</sup>. Esto irrumpe funciones como la fosforilación oxidativa en las mitocondrias y la captación celular de glucosa estimulada por insulina a nivel de dichos órganos, provocando hiperglicemia <sup>71</sup>.



**Figura 2.6.** La inflamación crónica en tejido adiposo generada durante la obesidad induce resistencia a la insulina en músculo. **a)** En el estado de normopeso, los adipocitos almacenan los ácidos grasos como triglicéridos (TG) de manera eficiente. Los TG pueden ser hidrolizados a ácidos grasos para la síntesis de ATP **b)** cuando el consumo de TG aumenta, los adipocitos aumentan de tamaño y secretan quemoquinas, como MCP-1, iniciando el reclutamiento de macrófagos; **c)** los macrófagos reclutados y los adipocitos hipertrofiados secretan TNF- $\alpha$  aumentando la lipólisis y disminuyendo la síntesis de TG. La acumulación de ácidos grasos libres y TG circulantes provoca la acumulación de lípidos activados en músculo (puntos amarillos) los cuales inhiben la internalización de glucosa estimulada por insulina. Adaptado de: Guilherme, A *et al* Nat Rev, 2008 <sup>46</sup>.

**En este sentido, las señales inflamatorias interrumpen la acción de la insulina y median la generación de resistencia a la insulina durante la obesidad** <sup>79</sup>. Las citoquinas proinflamatorias inducen un aumento de residuos fosforilados de serina/treonina en el receptor de la insulina (IR) así como de las proteínas IRS, desencadenando una menor respuesta de la insulina (Figura 2.7) <sup>80-82</sup>. Normalmente, la señalización de la insulina es mediada por proteínas IRS, las cuales son fosforiladas a nivel de las tirosinas como respuesta a la insulina. En este sentido, TNF- $\alpha$  es un importante mediador de la resistencia a la insulina en la obesidad al disminuir la actividad tirosina-quinasa del receptor de la insulina a través de la fosforilación de serinas en IRS-1 <sup>83</sup>. Dicha fosforilación ocurre luego de la activación de diferentes cascadas de señalización por parte de las citoquinas proinflamatorias, desencadenando en la activación de múltiples quinasas que incluyen JNK, IKK, PKC, mTORC1 y MAPK <sup>42,43,84</sup>. La producción de citoquinas

proinflamatorias también provoca la disminución en la expresión proteica de IRS-1, GLUT4 (transportador de glucosa insulino-dependiente que permite la captación de glucosa en músculo y tejido adiposo) y PPAR- $\gamma$  y así como también produce la activación de SOCS3 en adipocitos <sup>42,43</sup>.



**Figura 2.7.** La activación de múltiples quinasas (como JNK, IKK y TOR) interfiere en la señalización de la insulina a través de la fosforilación de residuos de serina en los sustratos para los receptores de la insulina IRS-1 e IRS-2. Tomado de: Hotamisligil, S Nature, 2006 <sup>79</sup>.

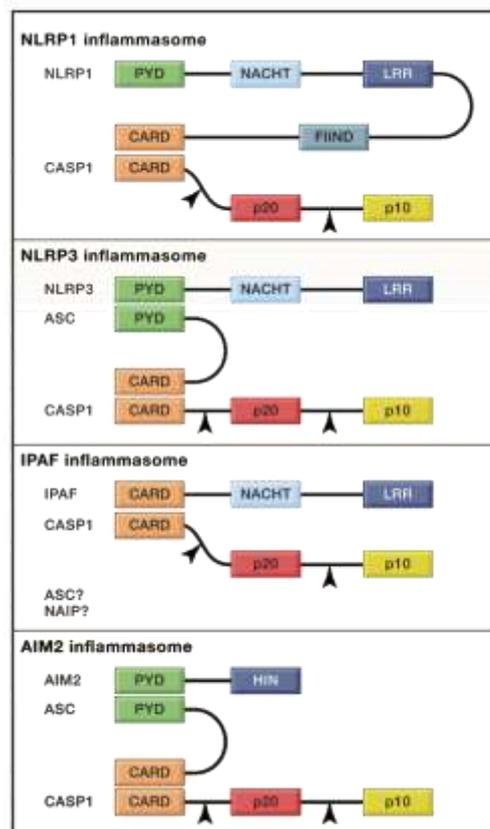
Además de los mecanismos inflamatorios mencionados que se encuentran orquestados por un sistema inmune alterado durante la obesidad y resistencia a la insulina, existe también un mecanismo del sistema inmune innato que se activa frente a estímulos muy diversos y que tiene gran relevancia en el desarrollo de la inflamación crónica vinculada a la obesidad. En la siguiente sección, se presentará el concepto de los inflamomas y su relevancia en las patologías metabólicas.

### 2.3.1 Inflamasomas

***Los inflamasomas son plataformas moleculares multiproteicas citosólicas activadas por el sistema inmune innato frente a una señal de peligro, tanto exógena como endógena, disparando la formación de citoquinas proinflamatorias y de la muerte celular regulada. Hoy en día se reconoce que existe una importante asociación entre la actividad de los inflamasomas y enfermedades con base inflamatoria tanto heredadas como adquiridas*** <sup>85-88</sup>.

El sistema inmune innato cuenta con receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) expresados en sus células en la primera línea de defensa (macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales y células del sistema inmune adaptativo), los cuales detectan diferentes motivos microbianos <sup>85,89</sup>. Los PRR incluyen a los receptores Toll-like (TLR) que se encuentran en las membranas celulares y que reconocen en el medio extracelular patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). A partir del reconocimiento por parte de los TLRs de una estructura patógena se genera la activación de una cascada de señalización, que en general involucra la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B el cual promueve la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y la activación de factores de transcripción reguladores de interferones (IRFs) los cuales median la respuesta viral dependiente de interferón 1 (IFN-1) <sup>77</sup>. Por otro lado, los PRR también incluyen otro tipo de receptores, en este caso receptores intracelulares, que son los receptores de tipo NOD (NLR) y los receptores ausentes en melanoma 2 (ALR), los cuales reconocen PAMPs así como también señales de daño derivadas del huésped (DAMPs).

Los receptores NLR están formados por un dominio de unión a nucleótidos y oligomerización (NACHT), un dominio de repeticiones de leucina C-terminal (LRR) y un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD o PYD). El dominio NACHT permite la activación del complejo a través de la oligomerización dependiente de ATP, el dominio LRR censa el ligando y CARD o PYD median la interacción entre proteínas para posterior señalización <sup>85</sup>. Existen tres subfamilias del dominio NACHT relacionadas filogenéticamente dentro de la familia de los NLR: los *NOD* (NOD1-2, NOD3/ NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), los *NLRP* (NLRP 1-14, también llamados NALP) y la subfamilia *IPAF*, compuesta por IPAF (NLRC4) y NAIP (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Componentes de los inflammasomas NLRP1, NLRP3, IPAF y AIM2. Tomado de: Schroder, K. *et al* Cell, 2010 <sup>85</sup>.

La mayoría de los NLRP están formados por PYD, NACHT y LRR <sup>85</sup>. Este tipo de receptores se asocian a través de PYD con una proteína adaptadora asociada a la apoptosis que contiene CARD, denominada ASC, la cual recluta a pro-caspasa-1. La activación de los inflammasomas ocurre cuando el dominio LRR censa y/o se une a un estímulo, aunque para la mayoría de los inflammasomas se desconoce de qué manera esto ocurre. Luego de censar y/o unirse a la señal de daño, los NLR o AIM2 oligomerizan para convertirse en una plataforma capaz de reclutar y activar caspasa-1, la cual puede clivar las prointerleuquinas IL-1 $\beta$  e IL-18 y generar así una respuesta inflamatoria <sup>90,91</sup>. A continuación se describe la activación y regulación del inflammasoma NLRP3, siendo que su expresión se relaciona fuertemente con diversas patologías relacionadas a la inflamación, incluido durante el desarrollo de la obesidad y síndrome metabólico <sup>92</sup>.

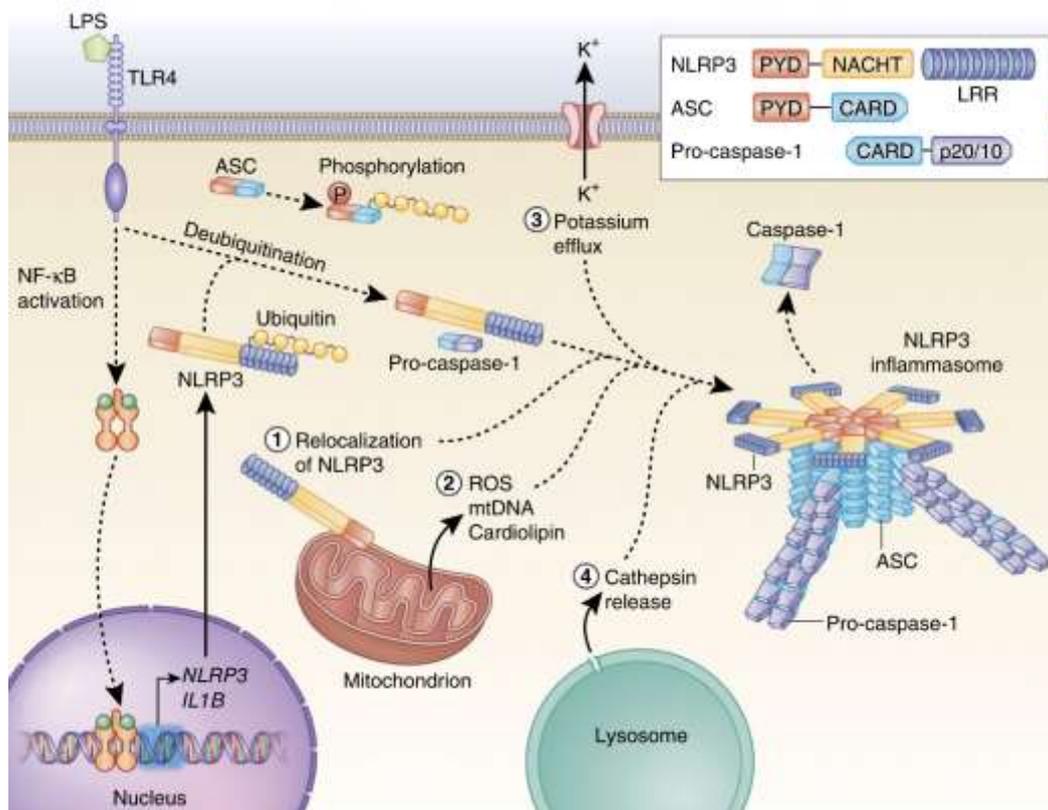
### 2.3.2 Inflamasoma NLRP3

Este inflamasoma es el mejor caracterizado y más estudiado, siendo su rol crítico para generar una respuesta de defensa frente a una infección ya sea bacteriana o viral.

Hoy en día, el modelo de “dos señales” de activación de NLRP3 es el más aceptado. En este modelo, la activación del inflamasoma NLRP3 depende de una “primera señal” denominada “*priming*”, en donde el estímulo señala a través de los receptores TLR (en particular TLR4), NLR o receptores de citoquinas, provocando la transcripción de genes regulados por NF- $\kappa$ B. El estímulo de la primera señal puede ser un componente microbiano PAMP (como LPS, lipopolisacárido presente en la pared bacteriana) o citoquinas endógenas como la IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . NF- $\kappa$ B induce la sobreexpresión de NLRP3, el cual en condiciones normales se encuentra a una concentración inadecuada para activar el inflamasoma, y de pro-IL-1 $\beta$  que no es expresada constitutivamente en las células<sup>93,94</sup>. Por el contrario, la señal de priming no parece afectar los niveles de expresión de ASC, pro-caspasa-1 y pro-IL-18<sup>94</sup>. De esta manera, la señal de priming tiene un rol principalmente transcripcional en la activación del inflamasoma NLRP3 aumentando la expresión de NLRP3 y pro-IL-1 $\beta$ . Sin embargo, otros mecanismos independientes de la transcripción se han descrito<sup>95-98</sup>. La proteína quinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK-1) es fosforilada en respuesta al estímulo de TLR, promoviendo la activación del inflamasoma de manera independiente a NF- $\kappa$ B<sup>95</sup>. Se ha demostrado también que la señal de priming induce la desubiquitinación de NLRP3 promoviendo su activación<sup>96</sup>.

Además de la primera señal se requiere una “segunda señal” la cual permite la formación del complejo del inflamasoma o apoptosoma. Esta segunda señal puede ser de naturaleza química muy variada y se considera que en general no existe una unión real entre NLRP3 y dicho estímulo<sup>93</sup>. De este modo, la hipótesis es que NLRP3 no se une directamente al estímulo, sino que se activa frente a un evento celular común, aunque dicha hipótesis es aún controversial. Sin embargo, numerosos estudios coinciden en ciertos mecanismos de activación (Figura 2.9)<sup>99,100</sup>. El primero se basa en un cambio en la concentración intracelular de iones induciendo un cambio conformacional en alguno

de los componentes del inflamasoma y por lo tanto induciendo su activación. El eflujo de potasio ha demostrado ser una señal necesaria previa a la activación de NLRP3. Se ha demostrado que cuando el eflujo de potasio se previene de manera experimental utilizando inhibidores o aumentando su concentración en el medio de cultivo, se inhibe la activación de NLRP3 en respuesta a numerosos tipos de activadores <sup>101</sup>. En un segundo modelo, la formación de especies reactivas del oxígeno como consecuencia de distintos activadores es considerada crítica para la activación de NLRP3 <sup>102</sup>. Las especies reactivas del oxígeno se generan por diferentes mecanismos moleculares que pueden ser un desacoplamiento del citocromo P450, de la respiración mitocondrial, de la activación de xantino- y NADPH oxidasas, entre otras. En un tercer modelo, la activación de NLRP3 es dependiente de la desestabilización del compartimento ácido lisosomal y la liberación de catepsina B. De acuerdo con esto, un inhibidor de catepsina B o de la maquinaria fagocítica celular impide la activación de NLRP3 luego de la estimulación con alúmina, MSU,  $\beta$ -amiloide fibrilar, entre otros activadores <sup>100</sup>.



**Figura 2.9.** Mecanismos de activación del inflamasoma NLRP3. Tomado de: Guo, H. *et al* Nat Med, 2015 <sup>90</sup>.

Luego de la activación de NLRP3, su dominio NBD permite la oligomerización de PYD lo cual genera un acercamiento de la molécula adaptadora ASC a través de interacciones de tipo PYD-PYD formando filamentos de ASC de tipo priónico. Esto provoca que se formen filamentos de pro-caspasa-1 interaccionando con ASC a través de sus dominios CARD, permitiendo la activación autoproteolítica de pro-caspasa-1 a caspasa-1 activa<sup>90,103</sup>. La caspasa-1 activa cliva al precursor de IL-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) de 31 KDa a la forma madura de 17 KDa y al precursor de la IL-18. ***Estas dos citoquinas son potentes interleuquinas proinflamatorias, pertenecientes a la familia de IL-1, las cuales se unen a receptores para interleuquinas en células del sistema inmune modulando aspectos críticos de la respuesta inmune incluyendo la inducción de la fiebre, trans migración de leucocitos al sitio de infección o daño, activación y polarización de linfocitos T colaboradores y subsecuente producción de citoquinas proinflamatorias***<sup>104-106</sup>. ***Además, la activación de caspasa-1 mediada por el inflamasoma también ocasiona un tipo de muerte celular denominado piroptosis o necrosis regulada. Esta muerte es de tipo lítica, con ruptura de membrana, liberando mediadores inflamatorios como las citoquinas generadas IL-1 $\beta$ , IL-18 y IL-1 $\alpha$  y señales de tipo DAMPs.*** La activación de caspasa-1 genera la formación de poros en la membrana que disipan gradientes iónicos, favoreciendo la entrada de agua y por lo tanto la lisis osmótica. La formación de los poros está mediada por la gasdermina D, sustrato de caspasa-1, quien se encuentra sequestrada en el citoplasma en condiciones normales. El clivaje entre las regiones N-y C-terminal de la gasdermina D provoca su transporte a la membrana donde se ensambla formando un poro<sup>107</sup>.

### **2.3.3 Rol del inflamasoma NLRP3 durante la obesidad y resistencia a la insulina**

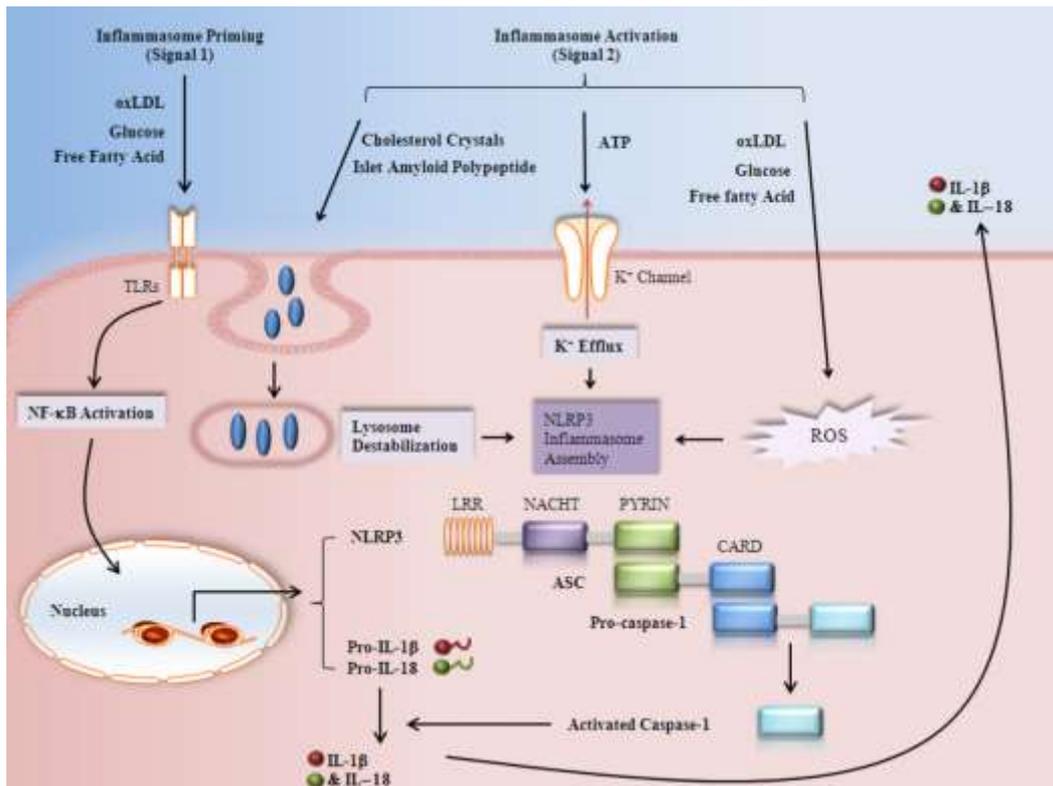
El hecho de que NLRP3 pueda activarse por diversas moléculas derivadas del huésped (no bacterianas) indicadoras de peligro y estrés celular, es lo que lo relaciona con diversas patologías. Algunas moléculas activadoras pueden ser: ATP extracelular y ácido hialurónico liberados por células dañadas, péptido  $\beta$ -amiloide componente principal de la patología de Alzheimer, niveles elevados de glucosa extracelular consecuencia del

síndrome metabólico, cristales de urato monosódico formados en la enfermedad de la Gota así como también por irritantes ambientales como la irradiación UVB e irritantes de la piel <sup>85</sup>.

**Numerosos estudios han identificado activadores endógenos y exógenos del inflammasoma NLRP3 durante la diabetes de tipo 2 (Figura 2.10)** <sup>92,108</sup>. El polipéptido de amiloide de los islotes (IAPP) co-secretado junto con la insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas, es comúnmente encontrado formando estructuras de amiloide en los islotes pancreáticos de pacientes con diabetes. El receptor CD36 (en células  $\beta$ , macrófago y células dendríticas) facilita la internalización del polipéptido de amiloide soluble el cual es convertido intracelularmente en su forma amiloidea. Esto disrumpe al fagolisosoma y activa NLRP3 debido a la liberación de catepsina. La forma amiloide extracelular también puede fagocitarse y contribuir a la activación de NLRP3 <sup>90</sup>. Niveles elevados de glucosa sanguínea también se han descrito como responsables de inducir IL-1 $\beta$  en células  $\beta$ -pancreáticas, posiblemente a través de la activación del inflammasoma a través de la proteína TXNIP <sup>90,109,110</sup>. TXNIP está implicada en la muerte de las células  $\beta$ -pancreáticas y en impedir el consumo de glucosa periférica <sup>111,112</sup>. En el mismo sentido, ratones KO para TXNIP presentan mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en comparación a ratones WT <sup>113,114</sup>. El urato, cristales de colesterol y ATP extracelular son otros de los activadores conocidos de NLRP3. La activación del inflammasoma NLRP3 produce la liberación de IL-1 $\beta$  la cual está fuertemente ligada con la patogénesis de la diabetes de tipo 2. ***Esta citoquina promueve la resistencia a la insulina y genera apoptosis en las células  $\beta$ -pancreáticas, al inducir la fosforilación de serinas en IRS-1 a través de JNK. Esto impide la señalización de la insulina a través de Akt en tejidos periféricos, como ya fue mencionado anteriormente. Al mismo tiempo, IL-1 $\beta$  induce la expresión de TNF- $\alpha$  y otros mediadores inflamatorios, generando un ciclo autoamplificador de citoquinas <sup>2</sup>. Además, IL-1 $\beta$  genera moléculas de estrés metabólico derivadas del estrés del retículo endoplasmático y estrés oxidativo, induciendo más inflamación y muerte de células  $\beta$ , agravando la patogénesis de la enfermedad <sup>5</sup>.***

La relación directa entre NLRP3 y resistencia a la insulina ha sido demostrada en pacientes con diabetes de tipo 2, donde macrófagos derivados de monocitos de dichos

pacientes exhiben un incremento significativo de los niveles de ARNm y expresión proteica de NLRP3, IL-1 $\beta$  e IL-18 en comparación con macrófagos obtenidos de sujetos sanos <sup>115</sup>. Por último, se ha demostrado que el bloqueo de IL-1 $\beta$  usando el antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  recombinante IL-1Ra (Anakinra) en estudios de fase clínica reduce los niveles de glicemia y mejora la función secretora de las células  $\beta$ -pancreáticas así como también reduce marcadores de inflamación sistémica <sup>116</sup>.



**Figura 2.10.** Vías de activación del inflammasoma NLRP3 relacionadas al estrés metabólico. Tomado de: Ying, Y. *et al* Front Biosci, 2013 <sup>92</sup>.

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado que el inflammasoma NLRP3 reconoce DAMPs asociados a la obesidad siendo un importante mecanismo que participa en el desarrollo de la resistencia a la insulina <sup>117</sup>. Se ha demostrado que la activación de caspasa-1 mediada por inflamasomas en tejido adiposo e hígado disminuye la señalización de la insulina <sup>118</sup>. Animales deficientes en NLRP3 y caspasa-1 son resistentes al desarrollo de la obesidad inducida por dietas ricas en grasas lo cual se correlaciona con una protección frente a la resistencia a la insulina generada en la obesidad <sup>119</sup>. La producción de MCP-1 en tejido adiposo disminuye en ratones deficientes

de NLRP3 así como la leptina y resistina se encuentran alteradas <sup>120</sup>. La activación del inflamasoma NLRP3 durante la obesidad promueve la activación de células T a través de la activación de macrófagos en tejido adiposo lo cual provoca disminución de la sensibilidad a la insulina <sup>119</sup>. De hecho, la activación de NLRP3/caspasa-1 modula la diferenciación de adipocitos hacia un fenotipo más insulino-resistente <sup>118</sup>. Es más, el tratamiento de adipocitos diferenciados con IL-1 $\beta$  o IL-18 recombinante o su bloqueo con inhibidores, revelan que el efecto de caspasa-1 en la diferenciación de los adipocitos es transmitido principalmente por IL-1 $\beta$  <sup>118</sup>. Además, el bloqueo de caspasa-1 en animales obesos con resistencia a la insulina resulta en un mejoramiento en la sensibilidad a la insulina y en un menor incremento en la ganancia de peso total de los ratones <sup>118</sup>. Otros autores describen el rol de la IL-1 $\beta$  *in vivo* cuando es administrada en ratones normales o KO para IL-1 $\beta$ . En ratones normales, la inyección de IL-1 $\beta$  disminuye la sensibilidad a la insulina observada 2h luego de la inyección mediante un test de tolerancia a la insulina (ITT), mientras que ratones IL-1 $\beta$   $-/-$  alimentados con HFD por 12 semanas no presentan resistencia a la insulina siendo similar la respuesta a ratones normales alimentados con dieta normal <sup>121</sup>. Además, se ha encontrado una sobreexpresión de NLRP3 y ASC en adipocitos de pacientes obesos y un aumento en la expresión de caspasa-1 en tejido adiposo humano la cual incrementa con la diferenciación de los adipocitos y el desarrollo de la obesidad <sup>118,122</sup>.

En suma, en numerosos trabajos se ha demostrado el rol del inflamasoma NLRP3 durante el desarrollo de la inflamación crónica vinculada a la obesidad y sus patologías asociadas. El reconocimiento de la inflamación crónica como base de estas enfermedades permite plantear el tratamiento de las mismas a través de su inhibición. En la siguiente sección se presentará el estado del arte de moléculas antiinflamatorias endógenas (nitroalquenos de ácidos grasos) y de las nuevas generaciones de nitroalquenos desarrolladas por nuestro grupo, como potenciales antiinflamatorios para el tratamiento de estas enfermedades.

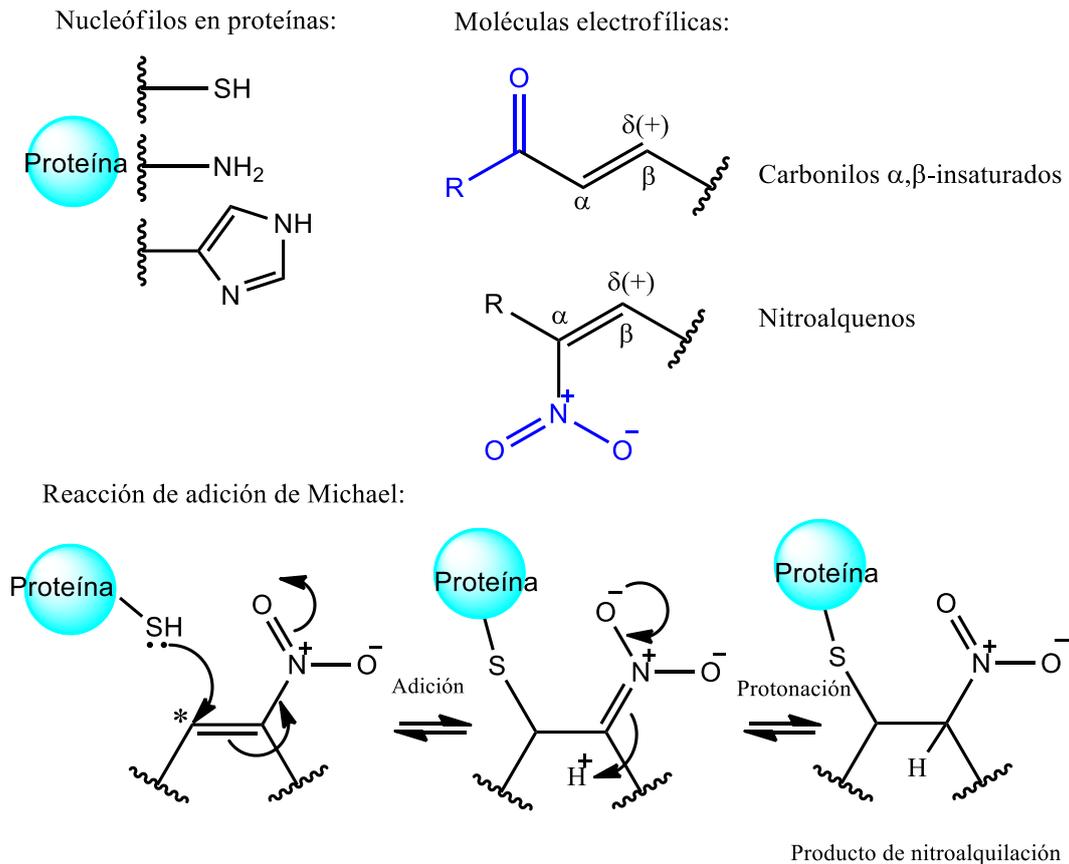
## **3. Antecedentes**

### 3.1 Ácidos grasos electrofílicos

Además del rol que poseen los ácidos grasos como bloques para la síntesis de lípidos y en el aporte de energía celular, **los ácidos grasos insaturados son también precursores de potentes moléculas de señalización endógenas con propiedades electrofílicas**. Estos ácidos grasos electrofílicos reaccionan con blancos moleculares respondiendo al estado redox/ inflamatorio de la célula <sup>123, 124</sup>.

Diferentes sustituyentes le confieren propiedades electrofílicas a los ácidos grasos insaturados siendo los más comunes los carbonilos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados y los nitroalquenos (**Figura 3.1**). **Estos son grupos atrayentes de electrones, tanto por efecto resonante como inductivo, dejando al carbono  $\beta$  adyacente deficiente de electrones y por lo tanto susceptible para reaccionar con nucleófilos mediante la reacción de adición de Michael.**

Si se analiza la reactividad de los ácidos grasos electrofílicos desde el punto de vista de la teoría de Pearson <sup>125</sup>, estos presentan una naturaleza electrofílica “blanda” formando aductos preferencialmente con nucleófilos “blandos”, lo cual restringe sus potenciales blancos en la célula. Mientras los electrófilos “duros” tienen una densidad de carga positiva alta o una carga positiva formal, los electrófilos blandos tienen una densidad de carga más difusa o cargas positivas parciales, como es el caso de los nitroalquenos de ácidos grasos (Figura 3.1, la carga positiva parcial se representa con  $\text{TM}(+)$ ). Diferentes enzimas y factores de transcripción que controlan el metabolismo y las respuestas inflamatorias contienen aminoácidos nucleofílicos “blandos” siendo típicamente tioles en residuos de cisteína, el grupo amino de la lisina o el grupo imidazol de la histidina (Figura 3.1) <sup>123,126</sup>. La reacción de adición de Michael consiste inicialmente en la adición del nucleófilo donador de Michael, en este caso tioles o grupos amino en proteínas, sobre el electrófilo o aceptor de Michael, seguido de una protonación para dar lugar al producto de nitroalquilación.



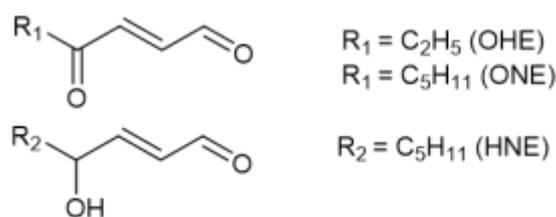
**Figura 3.1.** Estructuras generales de los grupos nucleofílicos presentes en proteínas y de los sustituyentes electrón-atrayentes (grupos carbonilo y nitro) que confieren propiedades electrofílicas a los ácidos grasos insaturados. También se ejemplifica la reacción de adición de Michael entre un grupo tiol presente en proteínas y un nitroalqueno (carbono electrofílico marcado con \*).

De esta manera, los ácidos grasos electrofílicos, que incluyen a los ácidos grasos nitrados (nitroalquenos), participan en la modificación postraduccional de proteínas sensibles a electrófilos, a través de reacciones de adición conjugada, las cuales suelen ser reversibles y selectivas, actuando como un proceso de regulación celular que responde frente al metabolismo y el estado inflamatorio y redox de la célula <sup>124</sup>.

### 3.1.1 Formación endógena de los ácidos grasos electrofílicos

La formación oxidativa de derivados de ácidos grasos conteniendo carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados se genera mediante reacciones de peroxidación lipídica inducidas por radicales libres que abstraen un hidrógeno ácido de sistemas *bis*-alílicos, formando radicales lipídicos estabilizados por resonancia, seguido de una fase de propagación

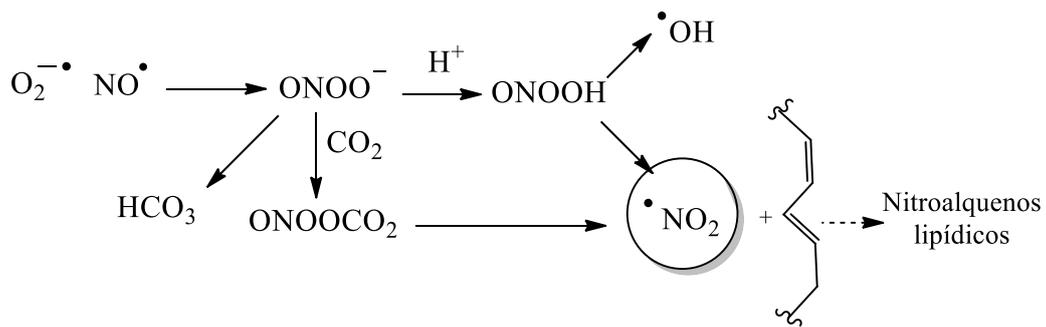
donde el carbono radical reacciona con oxígeno para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo se puede reducir a un hidroperóxido al abstraer un hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado adyacente o del  $\alpha$ -tocoferol (generando nuevas especies radicalarias). Durante la reacción de propagación se generan radicales alcóxidos y epoxialílicos los cuales son responsables de reacciones de acortamiento de la cadena resultando en aldehídos conjugados  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados de cadena corta como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-oxohexenal (OHE) y 4-oxo-2-nonenal (ONE) que pueden reaccionar con proteínas a través de reacciones de adición de Michael o reacciones irreversibles de tipo Schiff (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Ejemplos de lípidos electrofílicos conteniendo grupos carbonilo.

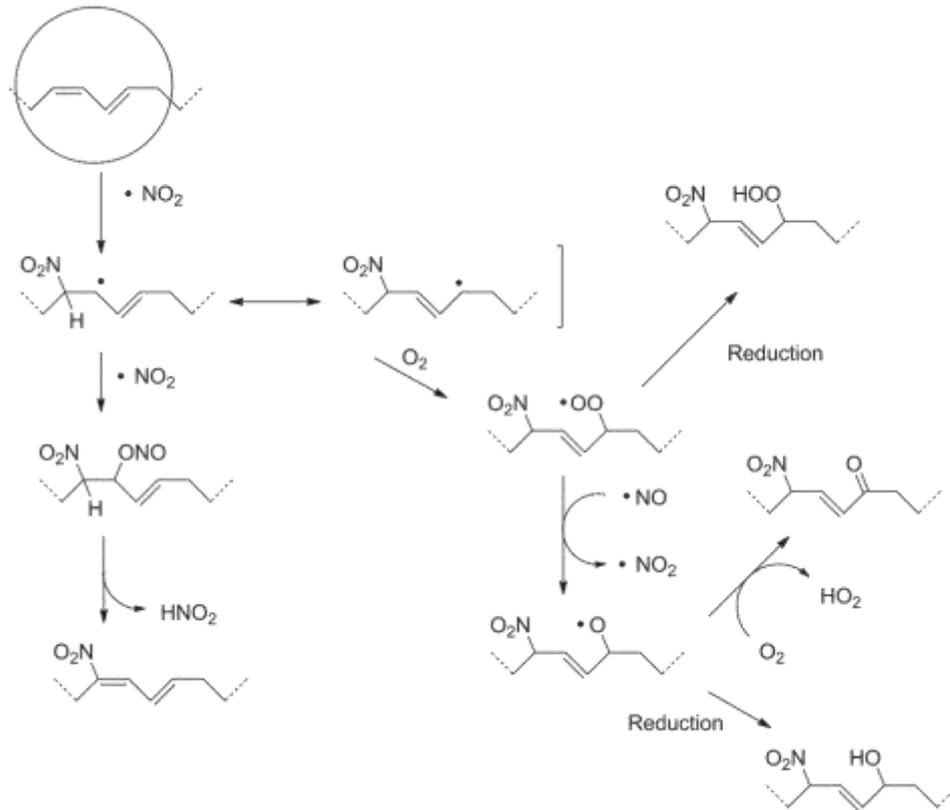
Si bien diferentes especies electrofílicas pueden formarse de manera endógena, profundizaremos en la formación de ácidos grasos nitrados por ser relevantes para esta tesis.

La nitración de ácidos grasos es mediada por óxidos de nitrógeno, incluyendo al producto de la reacción de óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) con superóxido ( $\cdot O_2$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). El peroxinitrito puede a su vez protonarse para formar el ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ) o reaccionar con  $CO_2$  para formar nitrosoperoxocarbonato ( $ONOOCO_2$ ), ambos pudiendo formar  $\cdot NO_2$  luego de escindirse de manera homolítica (Figura 3.3). A su vez, el  $\cdot NO_2$  se puede formar por la oxidación o protonación de nitrito ( $NO_2^-$ ) a ácido nitroso en condiciones ácidas. El dióxido de nitrógeno puede abstraer hidrógenos *bis*-alílicos iniciando reacciones de peroxidación lipídica en presencia de oxígeno. Estas reacciones dan lugar a ácidos grasos nitrosilados y ácidos grasos nitrados, siendo los últimos los más estables, pudiendo ser detectados en medios biológicos<sup>9</sup>.



**Figura 3.3.** Formación de nitroalquenos lipídicos a partir de especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno.

El doble enlace conjugado de los ácidos grasos poliinsaturados es esencial para la nitración ya que aumenta la eficiencia de la reacción y el rendimiento del producto formado. De hecho, los datos en humanos demuestran que las reacciones de nitración endógenas ocurren únicamente en ácidos grasos insaturados conjugados. La reacción de nitración en ácidos grasos monoinsaturados involucra la adición directa del radical  $\cdot NO_2$  al doble enlace resultando en un radical  $\beta$ -nitroalquilo el cual es muy inestable y es eliminado mediante la reacción inversa volviendo al alqueno con la eliminación de  $\cdot NO_2$ . En su lugar, cuando la reacción de nitración ocurre en ácidos grasos con dobles enlaces conjugados, el radical alquilo es estabilizado por resonancia, lo cual disminuye la tasa de eliminación de  $\cdot NO_2$  y favorece reacciones de oxidación con oxígeno y óxidos de nitrógeno, produciendo intermediarios que se descomponen para formar nitroalquenos electrofílicos (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Nitración de un ácido graso insaturado conjugado a partir de  $\cdot\text{NO}_2$  dando lugar al nitroalqueno cuando la concentración de  $\text{O}_2$  es baja o a un compuesto electrofílico  $\alpha$ - $\beta$ -insaturado en presencia de  $\text{O}_2$ . Tomado de: Schopfer, F. *et al* Chem Rev. 2011 <sup>123</sup>.

***Existen ciertas condiciones que promueven la formación de ácidos grasos electrofílicos endógenos. De hecho, en los procesos inflamatorios se crea un microambiente que promueve la oxidación enzimática y no enzimática de ácidos grasos insaturados y el aumento de producción de especies reducidas del oxígeno y del nitrógeno.*** Las células del sistema inmune innato contribuyen de manera significativa a la formación de este microambiente, las cuales van a expresar diferentes patrones génicos que impactan en el perfil de especies oxidadas y nitradas. Ejemplos de esto son la formación endógena de la prostaglandina electrofílica 15d-PGJ2 de manera semienzimática, donde la enzima COX-2 cataliza el primer paso de conversión del ácido araquidónico a prostaglandina H2 (PHG2) la cual mediante oxidación y deshidratación se transforma en 15d-PGJ2. Estas reacciones se dan en condiciones inflamatorias en tejidos donde hay una alta densidad de células que expresan COX-2, como los macrófagos activados <sup>123,127</sup>. Otro ejemplo está comprendido durante la isquemia de miocardio/reperfusión cardíaca, contexto donde

se genera alta cantidad de especies reactivas del oxígeno e infiltración de células inflamatorias, altas tasas de producción de NO y sus metabolitos, pH ácido, y la activación de LOX y fosfolipasa A2 mitocondrial promoviendo la generación nitroalquenos.

Los ácidos grasos nitrados o nitroalquenos que han sido detectados de manera endógena en plasma y orina tanto de pacientes como en modelos animales, median respuestas biológicas beneficiosas para la salud cardiovascular <sup>128-130</sup>. La dieta mediterránea es considerada como una fuente importante de ácidos grasos insaturados (especialmente por el aceite de oliva y pescados ricos en ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico) que en conjunto con vegetales ricos en nitrito y nitrato proveen un medio eficiente para la nitración de los ácidos grasos insaturados en el estómago <sup>131,132</sup>. El ácido linoleico conjugado (CLA) es un sustrato preferencial para la nitración biológica resultando en la formación del ácido 9- y 12-nitrooctadecadiénico (9- y 12-NO<sub>2</sub>-CLA) y derivados, los cuales son generados durante la digestión, el estrés metabólico y la inflamación <sup>133-135</sup>. El ácido  $\alpha$ -linolénico puede sufrir elongación y saturación para formar el ácido docosahexanoico (DHA) y el eicosapentanoico (EPA), que comprenden el ácido graso  $\omega$ -3, los cuales pueden sufrir nitración u oxigenación enzimática y no enzimática dando lugar a especies electrofílicas, como el 13-oxoDHA <sup>124</sup>.

Otros nitroalquenos que han sido encontrados en un contexto *in vivo* son el ácido nitrooleico (NO<sub>2</sub>-OA) y el ácido nitrolinoleico (LNO<sub>2</sub>) <sup>8,136</sup>. Ambos nitroalquenos se han detectado en tejido cardíaco murino luego de la injuria isquemia/reperfusión y durante un precondicionamiento isquémico en un modelo de rata a bajas concentraciones <sup>137</sup>.

Sin embargo, los niveles generados de ácidos grasos electrofílicos pueden estar subestimados ya que su detección posee ciertas dificultades. Por un lado, al ser moléculas electrofílicas pueden reaccionar rápidamente con proteínas y glutatión en los medios biológicos (por ejemplo en plasma), por lo tanto se pueden encontrar en mayor concentración en el sitio donde se generan y es por lo tanto esperable que en ese sitio ejerzan sus efectos biológicos a pesar de la baja concentración detectable *in vivo* <sup>123,138</sup>. Además, los lípidos electrofílicos son también sustratos de la  $\beta$ -oxidación, son susceptibles a la reducción de olefinas críticas para su función, pueden incorporarse en

membranas lipídicas y triglicéridos, pueden ser transportados a través de albúmina fuera del sitio de formación, o se pueden unir covalentemente con glutatión u otros tioles de bajo peso molecular para ser degradados a ácidos mercaptoúricos y posteriormente excretados por la orina o bilis. En este sentido, los lípidos electrofílicos pueden estar en equilibrio entre la forma libre y la forma aductada tanto a proteínas de alto peso molecular (que pueden ser precipitadas durante los experimentos de detección) o a péptidos de menor tamaño que pueden escapar a la precipitación (por ejemplo, glutatión). Todas estas características dificultan la detección de los lípidos electrofílicos *in vivo* siendo algunas también desventajas cuando son considerados como estrategias farmacológicas para el tratamiento de enfermedades <sup>123</sup>.

### 3.1.2 Blancos moleculares de los ácidos grasos nitrados

Existen diferentes blancos moleculares conocidos de los ácidos grasos electrofílicos (endógenos o administrados de manera exógena). Los ácidos grasos electrofílicos actúan a través de la modificación postraduccional de proteínas y de factores de transcripción mediante la adición de nucleófilos, induciendo alteraciones en la estructura proteica, función y distribución subcelular de proteínas susceptibles <sup>10</sup>. ***Sus efectos son de carácter pleiotrópico ya que pueden modificar al mismo tiempo una variedad de proteínas relacionadas a distintas vías de señalización, incluso de manera reversible, dando por resultado efectos beneficiosos en el contexto de la inflamación y por lo tanto en enfermedades relacionadas a la misma*** <sup>126</sup>.

***En particular, los nitroalquenos de ácidos grasos actúan a través de cuatro vías de señalización: 1- PPAR- $\gamma$ ; 2- Nrf-2/Keap1; 3- HSR y 4: NF- $\kappa$ B.***

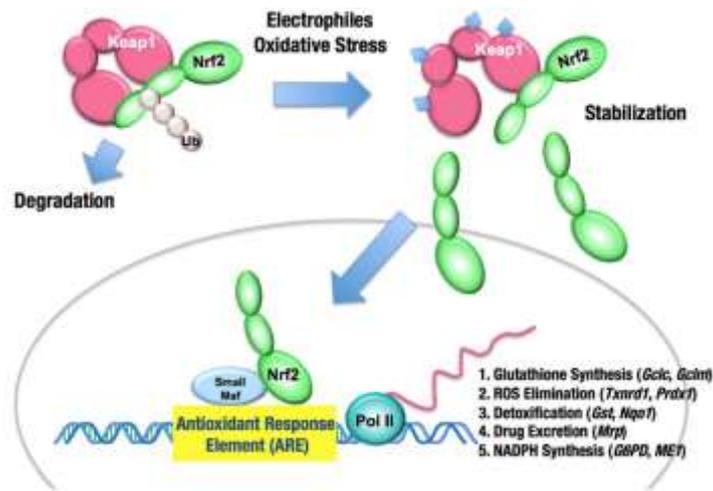
#### **PPAR- $\gamma$ (Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ )**

PPAR- $\gamma$  es un receptor nuclear presente principalmente en los tejidos adiposo, cardiovascular y pulmonar, el cual regula la homeostasis lipídica y el metabolismo glucosídico. Los genes activados por PPAR- $\gamma$  estimulan la captación de lípidos y la adipogénesis en los adipocitos, incrementan la sensibilidad a la insulina al reducir la cantidad de ácidos grasos libres circulantes, inducen la diferenciación de macrófagos y

modulan la respuesta inmune. PPAR- $\gamma$  es blanco de diferentes fármacos antidiabéticos como las Tiazolidindionas (TZDs) las cuales son ligandos de alta afinidad del mismo, así como también de ácidos grasos electrofílicos, entre ellos los nitroalquenos OA-NO<sub>2</sub> y LNO<sub>2</sub><sup>139,140</sup>. Los ácidos grasos nitrados actúan como agonistas parciales de PPAR- $\gamma$  uniéndose de manera covalente en el residuo de Cys-285, reduciendo eventos secundarios indeseados que se generan con los TZDs, como la ganancia de peso. La activación de PPAR- $\gamma$  dependiente de LNO<sub>2</sub> estimula la expresión de CD36 en macrófagos incrementando la capacidad de captar LDL oxidada y promueve la diferenciación de adipocitos<sup>141</sup>. A su vez, OA-NO<sub>2</sub> induce la sobreexpresión de genes que incrementan la sensibilidad a la insulina y reduce la acumulación de grasa y citoquinas proinflamatorias<sup>140</sup>.

### ***Nrf-2/Keap1 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2/ kelch-like ECH-associated protein 1)***

Nrf2 es un factor de transcripción nuclear que responde frente al estrés celular induciendo genes que codifican para enzimas detoxificantes de fase II a través de la inducción del elemento de respuesta antioxidante (ARE). Estas enzimas incluyen a Hemooxigenasa-1 (HO-1), NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1 (NQO1), Cisteína glutamato ligasa (GCLM), Glutación peroxidasa, Superóxido dismutasa, entre aproximadamente otras cien enzimas. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a su proteína inhibidora keap1, rica en cisteínas y reactiva a electrófilos (Figura 3.5). Los ácidos grasos electrofílicos se aductan a las cisteínas 273 y 288 de keap1 causando la disociación con Nrf2 y provocando su translocación al núcleo generando una respuesta detoxificante y citoprotectora<sup>12,142</sup>. LNO<sub>2</sub> induce un aumento del ARNm y la expresión proteica de HO-1 en células endoteliales de aorta humana, así como también provoca una inducción importante de HO-1 en las células musculares lisas y endoteliales durante experimentos de incubación *ex vivo* en segmentos de aorta de rata<sup>143</sup>. Por otro lado, se ha observado que la administración tanto *in vitro* como *in vivo* de NO<sub>2</sub>-OA provoca la sobre expresión de HO-1 induciendo protección vascular en un modelo de injuria arterial<sup>13,144</sup>.



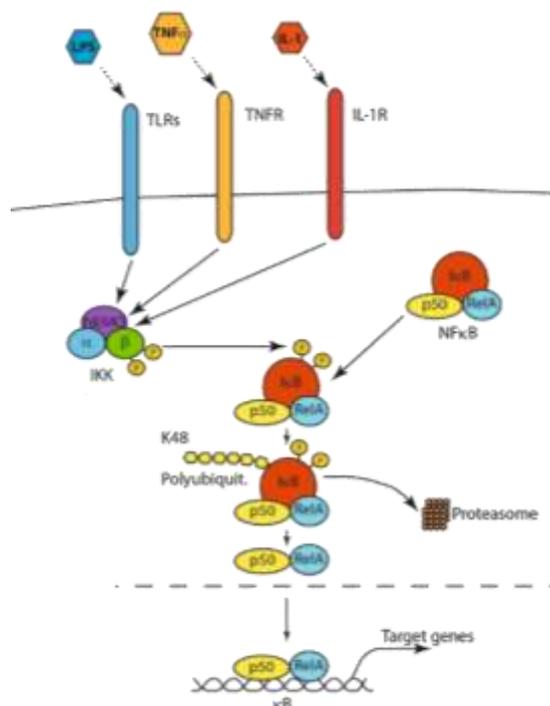
**Figura 3.5. Esquema de activación del sistema Nrf-2/Keap1.** Tomado de: Mitsuishi, Y. *et al* Front. Onc., 2012 <sup>145</sup>.

### **HSR (*Heat Shock Response*)**

La respuesta al choque térmico (HSR) es una respuesta al estrés celular que actúa para mantener la proteostasis celular induciendo la expresión de proteínas de choque térmico, a través de los factores de transcripción de choque térmico (HSF). Luego de su activación, los factores HSF sufren modificaciones postraduccionales que resultan en su unión a los elementos de choque térmico en el núcleo, resultando en la transcripción de una familia de genes que codifican para proteínas esenciales en la protección celular frente al estrés proteotóxico, principalmente chaperonas y proteasas <sup>146</sup>. Estas proteínas previenen o revierten el mal plegamiento proteico contrarrestando los efectos causados por factores de estrés como la temperatura, el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplasmático. En estudios *in vitro* en células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC) se ha observado la sobreexpresión de los genes que regulan HSF-1 y HSF-2 luego de la administración de NO<sub>2</sub>-OA. Los niveles de proteína y de ARNm de la proteína chaperona HSP70 se vieron aumentados de manera dosis-dependiente luego de la administración de dicho nitroalqueno <sup>13</sup>.

## NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor- $\kappa$ B*)

El factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B es un complejo proteico que regula la supervivencia de la célula, la proliferación y la respuesta inmune, siendo esencial frente a las infecciones<sup>147</sup>. NF- $\kappa$ B induce la expresión de una variedad de genes proinflamatorios, incluyendo los genes que codifican para citoquinas y quimioquinas, también participando en la regulación de los inflammasomas<sup>148,149</sup>. También juega un rol fundamental en la supervivencia, activación y diferenciación de células del sistema inmune innato y de los linfocitos T. NF- $\kappa$ B representa una familia de factores de transcripción inducibles compuesta por cinco miembros estructuralmente relacionados que incluyen a NF- $\kappa$ B1 (subunidad p50), NF- $\kappa$ B2 (subunidad p52), RelA (subunidad p65), RelB y c-Rel, los cuales deben dimerizar (dos de ellos) para que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo y se una al elemento  $\kappa$ B en el ADN<sup>59</sup>. NF- $\kappa$ B está normalmente secuestrado en el citoplasma por una familia de proteínas inhibitorias que incluyen a la familia de proteínas I $\kappa$ B que enmascaran su secuencia de localización nuclear<sup>150,151</sup>. Frente a un estímulo, las quinasas de I $\kappa$ B (IKK) fosforilan a las proteínas I $\kappa$ B dejándolas propensas a sufrir ubiquitinación y degradación proteosómica, permitiendo que NF- $\kappa$ B se transloque al núcleo y provoque la transcripción de genes proinflamatorios (Figura 3.6)<sup>152</sup>.



**Figura 3.6.** Vía de señalización de NF- $\kappa$ B. Tomado de: Hoesel, B. *et al* Mol. Cancer., 2013<sup>152</sup>.

La activación de NF- $\kappa$ B es consecuencia del reconocimiento de PAMPs y DAMPs por parte de los receptores de patrones (PRR) expresados en las células del sistema inmune innato, principalmente. Sus funciones proinflamatorias se han estudiado de manera extensa en macrófagos, ya que los mismos se encuentran en la primera línea de defensa de la respuesta inmune y residen en una variedad de tejidos. En respuesta a los diferentes estímulos, los macrófagos se activan rápidamente y secretan citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión incrementando la respuesta inmune. A su vez, pueden diferenciarse a estados fenotípicamente diferentes que incluyen al clásico fenotipo M1 o al fenotipo alternativo M2. Los macrófagos de tipo M1 se caracterizan por producir citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$  y quimioquinas, relacionadas a una variedad de procesos inflamatorios, así como también promueven la diferenciación de células T inflamatorias, incluyendo Th1 y Th17. En contraste, los macrófagos M2 producen citoquinas proinflamatorias como IL-10 e IL-13, importantes en la resolución de la inflamación. Los ligandos para los receptores TLR tienen un rol importante en regular la polarización de los macrófagos. En particular, el ligando lipopolisacárido (LPS) para el receptor TLR4 promueve la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo M1 <sup>59</sup>.

***La desregulación en la activación de NF- $\kappa$ B es un proceso distintivo de las enfermedades crónicas relacionadas a la inflamación, por lo tanto, diferentes estrategias terapéuticas se han desarrollado con el objetivo de inhibir su activación crónica.***

Los nitroalquenos de ácidos grasos reducen la activación de NF- $\kappa$ B y por consecuencia la transcripción de genes que codifican para proteínas proinflamatorias. NO<sub>2</sub>-OA y LNO<sub>2</sub> se aductan a través de reacciones de alquilación a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF $\alpha$  y MCP-1 luego de la estimulación con LPS en macrófagos y células endoteliales <sup>11</sup>. Se ha comprobado que dicha disminución es independiente de la formación de óxido nítrico o de la activación/inducción de PPAR $\gamma$  y HO-1 respectivamente <sup>11</sup>. La administración *in vivo* de NO<sub>2</sub>-OA inhibe el reclutamiento de leucocitos al endotelio vascular y reduce la expresión en aorta de moléculas de adhesión dependientes de NF- $\kappa$ B. NO<sub>2</sub>-OA actúa suprimiendo

la señalización de TLR4 luego de un estímulo con LPS inhibiendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras y proteínas reguladoras de NF- $\kappa$ B hacia las bolsas lipídicas (“*lipid rafts*” en inglés) presentes en las membranas de macrófagos y células endoteliales y que están implicadas en los mecanismos de señalización celular <sup>153</sup>. Otros lípidos electrofílicos inhiben la activación de NF- $\kappa$ B <sup>154,155</sup>. La prostaglandina 15d-PGJ2 induce la sobreproducción de glutatión induciendo la activación de Nrf2 y promoviendo modificaciones a nivel de cisteínas de la subunidad p65 haciéndolo susceptible para la adición electrofílica de glutatión. Además inhibe la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  lo cual impide la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B <sup>156,157</sup>.

En la siguiente sección, presentaremos los nitroalquenos de *segunda generación* desarrollados por nuestro grupo, en la búsqueda de mejorar o potenciar los efectos de los nitroalquenos previamente mencionados sobre diferentes patologías.

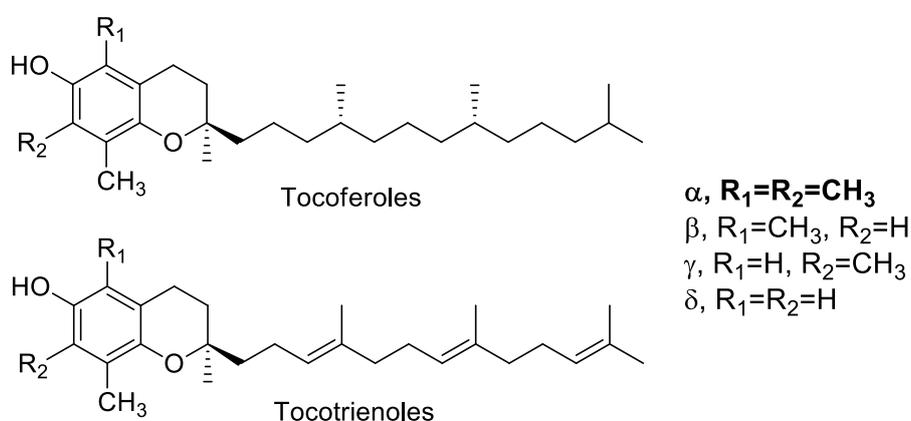
### **3.2 Nitroalquenos derivados del $\alpha$ -Tocoferol, principal componente de la Vitamina E.**

En los últimos años nuestro equipo de trabajo se ha enfocado en la generación de nuevas estrategias terapéuticas haciendo uso de las propiedades antiinflamatorias y citoprotectoras del grupo nitroalquenilo, el cual se ha unido a diferentes sillares estructurales con el fin de tratar diferentes patologías relacionadas a la inflamación.

En este sentido, se seleccionó a la Vitamina E como un sillar estructural de origen natural y seguro que a su vez puede aportar propiedades biológicas beneficiosas *per se*. Esta vitamina es el componente antioxidante liposoluble principal de las células y es obtenida exclusivamente de la dieta mediante el consumo de alimentos que contienen grasas, como las nueces, semillas, aceites vegetales, vegetales verdes y cereales. Su principal función es actuar como antioxidante inhibiendo la producción de especies reactivas del oxígeno, y se encuentra localizada en las membranas celulares, membranas de organelos y en las lipoproteínas plasmáticas, donde actúa como primera línea de defensa frente a la peroxidación lipídica. Entre los tocoferoles, el  $\alpha$ -Tocoferol es el que se encuentra en mayor proporción en plasma gracias a la proteína transferidora de  $\alpha$ -Tocoferol ( $\alpha$ -TTP) presente en el hígado, que une preferencialmente el  $\alpha$ -Tocoferol a las VLDL, para luego

ser liberadas a la circulación.

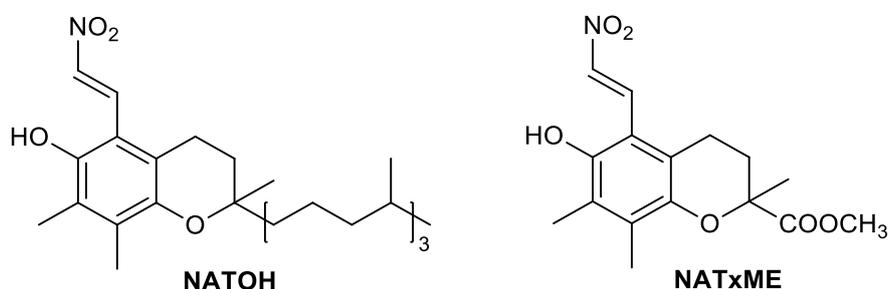
Estructuralmente, la vitamina E comprende una familia de ocho moléculas relacionadas que incluyen cuatro tocoferoles (alfa, beta, gama, delta) y cuatro tocotrienoles (alfa, beta, gama, delta) (Figura 3.7). Todas poseen un anillo de tipo cromanol de 6 átomos y una cadena lateral isoprenoide, la cual permite su penetración en las membranas biológicas. De estas estructuras el  $\alpha$ -Tocoferol es el biológicamente más activo (donde  $R_1$  y  $R_2 = \text{CH}_3$ , Figura 3.7) y fue la estructura utilizada para generar derivados con el grupo nitroalqueno desarrollado por el grupo.



**Figura 3.7.** Componentes naturales de la Vitamina E.

Teniendo en consideración la aterosclerosis como una enfermedad de base inflamatoria, de distribución mundial y epidémica, donde su lesión básica está formada por un núcleo lipídico (comprendido principalmente por colesterol y sus productos de oxidación) y donde las lipoproteínas, en particular las LDL juegan un rol fundamental, es que se desarrollaron los primeros nitroalquenos derivados de  $\alpha$ -tocoferol. Durante la tesis de doctorado del Dr. Jorge Rodríguez-Duarte (PEDECIBA Química, 2018) se sintetizaron y evaluaron compuestos híbridos formados por una estructura mimética del  $\alpha$ -Tocoferol y el grupo nitroalqueno<sup>26,27,158</sup>. Con este diseño, se encontraron dos propiedades juntas en una misma molécula: la acción antiinflamatoria/antiaterogénica del grupo nitroalqueno sumado al transporte selectivo del  $\alpha$ -Tocoferol en el organismo a través de las LDL. Es importante destacar además que las LDL constituyen la principal fuente de lípidos y colesterol que forman y contribuyen al desarrollo de la placa de ateroma. De

esta forma, la estrategia consistió en cargar a las lipoproteínas con el farmacóforo nitroalqueno y que la LDL actúe como un transportador del compuesto bioactivo a la placa de ateroma. Las moléculas híbridas obtenidas se denominaron **NATOH** y **NATxMe** (Figura 3.8). Estructuralmente, el **NATOH** contiene el grupo nitroalquenilo localizado en la posición 5 del anillo cromano del  $\alpha$ -Tocoferol y en **NATxMe** se encuentra en la misma posición, pero del éster metílico de Trolox™, dando por resultado una molécula menos liposoluble (Figura 3.8). Los resultados obtenidos con **NATOH** se resumen en el Anexo de esta tesis.

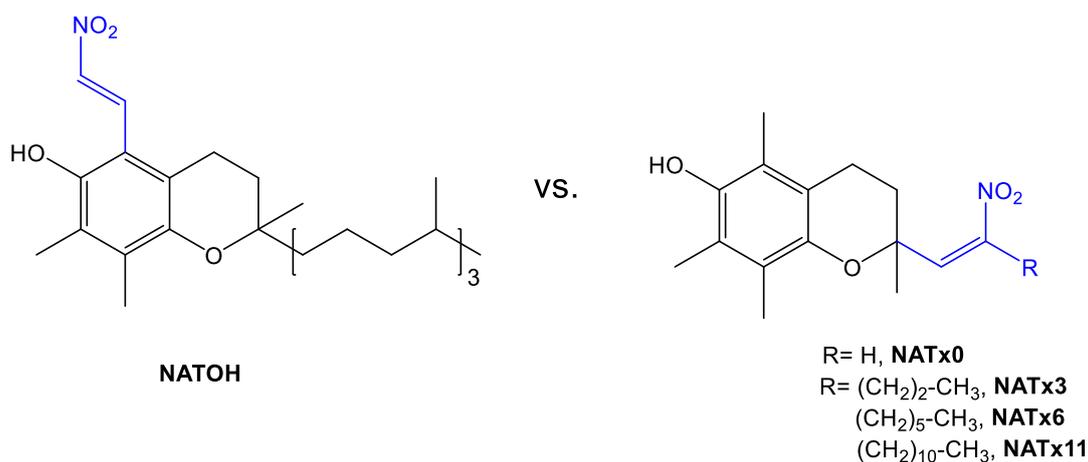


**Figura 3.8.** Estructuras de las moléculas híbridas derivadas del Tocoferol: NATOH y NATxMe.

*Durante el presente trabajo, se sintetizaron nitroalquenos derivados del Trolox™, cambiando de posición al grupo nitroalquenilo respecto al NATOH en la estructura del  $\alpha$ -Tocoferol así como también variando el largo de la cadena lateral hidrocarbonada (Figura 3.9).* Mientras que **NATOH** y **NATxMe** poseen el grupo nitroalquenilo conjugado con el anillo aromático, los compuestos sintetizados en la presente tesis poseen el grupo nitroalquenilo en la cadena lateral del Tocoferol, no conjugado al aromático. Con esta estrategia, nos propusimos modular la electrofilia y/o farmacocinética de los nitroalquenos derivados del  $\alpha$ -Tocoferol previamente desarrollados por el grupo, en la búsqueda de moléculas más activas para el tratamiento de enfermedades metabólicas crónicas.

Para ello, nos enfocamos en el estudio del nitroalqueno menos liposoluble, **NATxO**, por diferentes motivos. Por un lado, fue el compuesto inicialmente obtenido y preliminarmente evaluado, al cual se le encontró propiedades biológicas interesantes que nos estimularon a ahondar más en sus efectos. Por otro lado, al ser el derivado menos liposoluble, permitió una fácil vehiculización para los diferentes estudios,

mientras que los otros derivados requirieron vehiculización en liposomas o mediante el uso de detergentes. Si bien nuestro objetivo inicial fue evaluar todos los compuestos, el estudio de **NATx0** consumió la mayor parte del trabajo experimental desarrollado en la presente tesis, así como también la participación de la tesista en el desarrollo de otros nitroalquenos montados en distintos sillares estructurales, que mostraron poseer propiedades biológicas interesantes.



**Figura 3.9.** Estructura del **NATOH** y de los nitroalquenos sintetizados en la presente tesis: **NATx0**, **NATx3**, **NATx6** y **NATx11**.

En este contexto, en paralelo a la presente tesis, el grupo de trabajo inició el desarrollo de un nitroalqueno derivado del salicilato, ácido 5-(2-Nitroetenil)salicílico, denominado SANA. El salicilato es una droga ancestral utilizada para disminuir la inflamación y el dolor, que actúa mediante la inhibición de la ciclooxigenasa, de NF- $\kappa$ B y de la producción de citoquinas proinflamatorias. Previamente, el salicilato demostró poseer propiedades beneficiosas para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 a altas dosis, presentando efectos secundarios indeseados. En este sentido, en base a los efectos beneficiosos observados con **NATx0** sobre el metabolismo de ratones obesos así como también por otros nitroalquenos, se desarrolló el compuesto SANA, el cual combina la eficacia del salicilato con los efectos beneficiosos de los nitroalquenos. El SANA ha sido ampliamente evaluado en el modelo de obesidad inducido por dietas ricas en grasas demostrando que promueve la pérdida de peso y protege contra la ganancia de peso, la resistencia a la insulina, la hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática. Estos efectos superan a los obtenidos con el salicilato solo, a dosis efectivas hasta 40 veces más bajas. Se resumirán los resultados obtenidos con SANA en el Anexo de esta tesis.

## Hipótesis de trabajo

Como hipótesis general de trabajo nos planteamos que la acción biológica de los nitroalquenos puede ser modulada modificando las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los sillares que los contienen. Proponemos que los nitroalquenos derivados del análogo hidrosoluble de la vitamina E, así como también otros nitroalquenos montados en diferentes sillares estructurales, son potentes antiinflamatorios no-convencionales que contrarrestan los efectos metabólicos indeseados que se generan durante el desarrollo de la obesidad, como ser el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2.

## 4. Objetivo general

Diseño, síntesis y estudio del efecto de nitroalquenos derivados del análogo hidrosoluble del  $\alpha$ -tocoferol en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas a la inflamación, en particular de las enfermedades metabólicas crónicas.

# 5. Objetivos específicos

## 1. Síntesis orgánica y caracterización estructural.

- Síntesis de derivados del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromancarboxílico (Trolox™) conteniendo el grupo nitroalquenilo con una cadena hidrocarbonada de largo variable (**NATx0**, **NATx3**, **NATx5** y **NATx11**).
- Caracterización estructural de los derivados obtenidos mediante espectroscopía de RMN y espectrometría de masas.

## 2. Caracterización fisicoquímica de NATx0.

- Reactividad frente a nucleófilos modelo.
- Inhibición de la enzima GAPDH como nucleófilo modelo.
- Estabilidad en buffer y en plasma.

## 3. Evaluación de los efectos biológicos *in vitro* de NATx0.

- Estudio de la citotoxicidad en macrófagos.
- Estudio de la inhibición de NF- $\kappa$ B en macrófagos mediante la detección de citoquinas proinflamatorias y estudio de la translocación celular de NF- $\kappa$ B.
- Estudio de la activación del sistema Nrf2/keap1.
- Estudio de la inhibición del inflamasoma NLRP3.

## 4. Evaluación de los efectos biológicos *in vivo* de NATx0.

- Estudio de la capacidad antiinflamatoria en un modelo de inflamación aguda inducida por LPS en ratón.
- Estudio de la capacidad antiinflamatoria en un modelo de inflamación aguda inducida por daño en pez cebra.
- Evaluación de los efectos de **NATx0** en un modelo de ratón con obesidad inducida por dietas ricas en grasas.

## **6. Metodología**

## 6.1 Síntesis orgánica

### Generalidades.

\* Los disolventes se purifican y secan, previo a su utilización, por métodos convencionales. Otros reactivos fueron adquiridos en empresas comerciales y usados sin purificación.

\* El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por cromatografía en capa fina (TLC). Para esto se utiliza sílica gel o alúmina con indicador fluorescente en placas de poliéster o de aluminio. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

- exposición a la luz ultravioleta a 254 nm
- asperjado con: a) mezcla de Etanol: Ácido sulfúrico: Anisaldehído (95:4:1) (v:v:v) y posterior quemado, o b) reactivo de Brady (solución de 2,4-Dinitrofenilhidrazina en Ácido sulfúrico y EtOH).
- exposición a vapores de yodo.

\* Para las cromatografías en columna (CC), se utiliza sílica gel (Kieselgel, tamaño 0.063-0.2 mm, J. T. Baker)

\* Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y de  $^{13}\text{C}$ -RMN se realizan en un equipo Bruker DPX 400 (400 MHz) utilizando los disolventes indicados en cada caso y TMS como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de  $\delta$  (ppm) y las multiplicidades según s: singulete, d: doblete, dd: doblete de doblete, t: triplete, c: cuarteto, q: quinteto, m: multiplete, sa: señal ancha. La completa caracterización se realiza con la combinación de experimentos HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), COSY (CORrelated SpectroscopY) y DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).

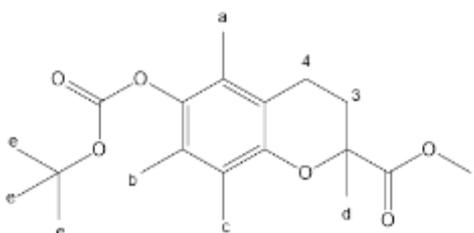
\* Los espectros de masa se obtienen por impacto electrónico (IE) utilizando un equipo Shimadzu GCMS QP 2010 ULTRA a un potencial de ionización de 70 eV por inyección directa.

### 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de metilo (Éster metílico de Trolox)

En un reactor de presión de acero inoxidable equipado con agitador se coloca 1,4-dihidroxi-2,3,5-trimetilbenceno (10 g, 65.7 mmol), paraformaldehído (4 g, 133.2 mmol), metacrilato de metilo (35 mL, 327 mmol) y agua (3 mL). La mezcla se deja reaccionar a 180 °C por 3h bajo agitación. Luego de completada la reacción, la mezcla de reacción se enfría a T.A. y se adiciona metanol a la misma, lo cual provoca la precipitación de los cristales. Los mismos se filtran para dar el éster metílico correspondiente como sólido blanco. Se recristaliza de metanol (11.28 g, 69%). Caracterización espectroscópica de acuerdo a la literatura <sup>159</sup>.

### 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de metilo (**1b**)

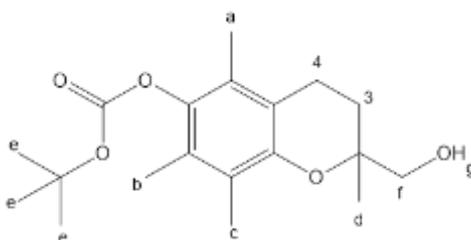
A una solución de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de metilo (éster metílico de Trolox) en DCM bajo flujo de N<sub>2</sub>, se le añadió di-*tert*-butil-dicarbonato (1.1 g, 5.11 mmol) y DMAP (0.07 g, 0.57 mmol). Luego de 2h de agitación a T.A., se evaporó el disolvente, se agregó acetato de etilo (20 mL) y se lavó con HCl 10% (50 mL) y solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL). Las fases orgánicas resultantes se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el solvente fue evaporado a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por columna (SiO<sub>2</sub>, Hexano: Acetato de etilo, 7:3) resultando un sólido blanco (1.3 g, 65 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 3.70 (s, 3 H, Hf), 2.69 (m, 1 H, H4), 2.53 (m, 1 H, H3), 2.45 (m, 1 H, H4'), 2.18, 2.11, 2.02 (s, 3H, Ha Hb Hc), 1.88 (m, 1 H, H3'), 1.62 (s, 3H, Hd), 1.57 (s, 9H, He).<sup>26</sup>



### 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2-hidroximetil-2,5,7,8-tetrametilcromano (**2b**)

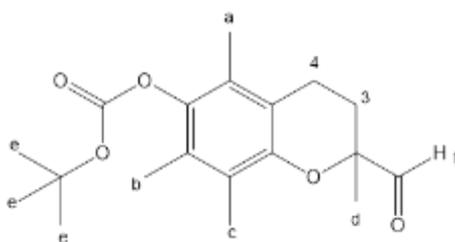
A una suspensión de LiAlH<sub>4</sub> (1.8 mmol, 0.07 g) en THF seco (2 mL) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y en baño a 0 °C, se le agregó el éster metílico **1b** (1.6 mmol, 0.6 g) disuelto en THF seco

(4 mL) de a pequeñas cantidades. La reacción se mantuvo a 0 °C en agitación por 45 min, la cual posteriormente se lavó con las soluciones saturadas de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL) y NaCl (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y se evaporó el solvente mediante presión reducida para dar un sólido blanco, sin otra purificación (0.50 g, 94%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 3.70 (m, 2 H, Hf), 2.70 (m, 2 H, H3), 2.11, 2.10, 2.07 (s, 3 H, Ha Hb Hc), 2.00 (m, 1 H, H4), 1.91 (t, 1 H, Hg), 1.76 (m, 1H, H4'), 1.58 (s, 9 H, He), 1.25 (s, 3 H, Hd). <sup>26</sup>



#### 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbaldehído (3b)

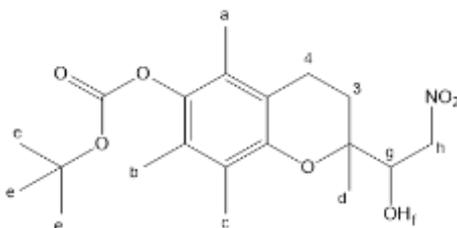
A una solución del alcohol **2b** (1.5 mmol, 0.50 g) y TEMPO (0.32 mmol, 0.047 g) en acetona, se le añadió (diacetoxiiodo)benceno (2.0 mmol, 0.65 g). Luego de 20h de agitación a T.A., la mezcla de reacción se lavó con agua (100 mL) y se extrajo con éter etílico (4 x 10 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el solvente fue evaporado bajo presión reducida. El residuo líquido se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub> flash, Hexano: Acetato de etilo, 95:5) resultando un sólido amarillo (0.16 g, 60%). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 9.65 (s, 1 H, Hf), 2.67 (m, 2 H, H3), 2.31 (m, 1H, H4), 2.22, 2.13, 2.03 (s, 3 H, Ha Hb Hc), 1.87 (m, 1 H, H4'), 1.58 (s, 9 H, He), 1.42 (s, 3 H, Hd). <sup>26</sup>



#### 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2-(1-hidroxi-2-nitroetil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (4b)

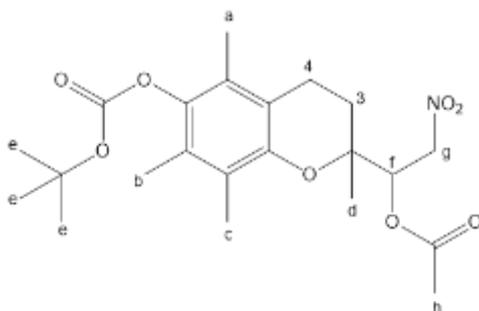
A una solución de imidazol (1.3 mmol, 0.09 g) en nitrometano (3.5 mL, 65 mmol), se le

añadió el aldehído **3b** (0.65 mmol, 0.16 g). Luego de 2 días de agitación a T.A., el solvente fue evaporado bajo presión reducida, el crudo se lavó con NaCl saturado y se extrajo con acetato de etilo. El residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub> flash, Hexano: Acetato de etilo, 8:2) resultando un sólido blanco (0.12 g, 60 %). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 4.81 (m, 1 H, Hh), 4.61 (m, 1 H, Hh'), 4.44 (m, 1 H, Hg), 2.84 (d, J= 4 Hz, 1 H, Hf), 2.74 (m, 2 H, H3), 2.11 2.09 2.07 (s, 3 H, Ha Hb Hc), 1.99 (m, 2 H, H4), 1.58 (s, 9 H, He), 1.26 (s, 3 H, Hd). MS (EI, 70eV): m/z (%) 395 (M<sup>+</sup>, 3), 295 (38), 234 (37), 205 (100), 189(5), 177(4).



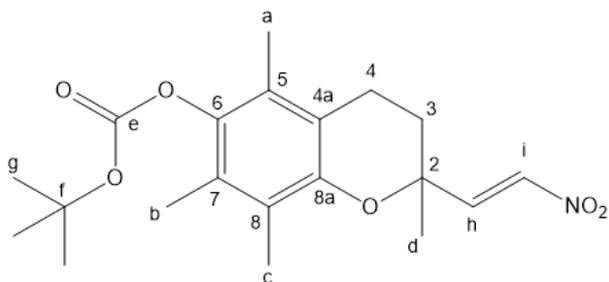
#### 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2-(1-acetoxi-2-nitroetil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (**5b**)

A una solución del nitroaldol **4b** (0.092 mmol, 0.036 mg) en anhídrido acético (2.9 mmol, 0.28 mL) se le agregó cantidades catalíticas de ácido p-toluensulfónico y se dejó en agitación por 16 h bajo flujo de N<sub>2</sub>. Luego, se añadió agua (10 mL) y se dejó en agitación por 10 min más para remover el exceso de anhídrido acético. El producto fue extraído con éter etílico (4 mL) y la fase orgánica fue lavada con agua (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el disolvente fue evaporado bajo presión reducida resultando en un sólido blanco (0.037 g, 93%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 5.85 (m, 1 H, Hf), 4.88 (m, 1 H, Hg), 4.74 (m, 1 H, Hg'), 2.80 (m, 1 H, H3), 2.65 (m, 1 H, H3'), 2.14 (s, 3H, Hh), 2.10, 2.08, 2.06 (s, 3H, Ha Hb Hc), 1.90 (m, 2H, H4), 1.57 (s, 9H, He), 1.29 (s, 3H, Hd).



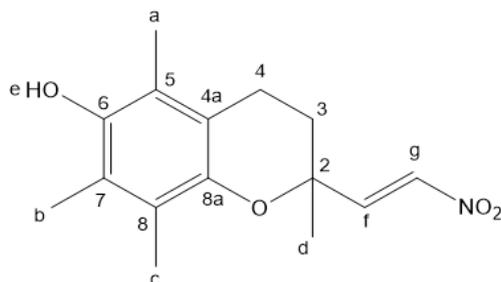
### 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2,5,7,8-tetrametil-2-(*E*)-(2-nitrovinil)cromano (6b)

A una solución de **5b** (0.04g, 0.09 mmol) en tolueno seco, se le añadió carbonato de sodio (0.03g, 0.09 mol) y se calentó a 110 °C por 2 h. Luego que la reacción alcanzó la temperatura ambiente, se lavó con NaCl saturado (10 mL) y se extrajo con éter etílico (3 x 5 mL) para obtener un sólido amarillo sin otra purificación (0.03 g, 94%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 7.28 (d, J= 12 Hz, 1H, Hi), 7.02 (d, J= 12 Hz, 1H, Hh), 2.76 (m, 1H, H3), 2.57 (m, 1H, H3'), 2.17, 2.13, 2.07 (s, 3H, Ha Hb Hc), 2.05 (m, 2H, H4), 1.57 (s, 9H, Hg), 1.28 (s, 3H, Hd). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 152.1 (Ce), 147.9 (C8a), 144.6 (Ch), 141.8 (C6), 139.6 (Ci), 127.9, 125.6, 122.8 (C5 C7 C8), 116.7 (C4a), 82.9 (Cf), 74.1 (C2), 31.4 (C3), 27.7 (Cg), 25.9 (Cd), 20.5 (C4), 12.7, 11.9, 11.8 (Ca Cb Cc). MS (EI, 70eV): m/z (%) 377 (M<sup>+</sup>, 6), 277 (100), 164 (55).



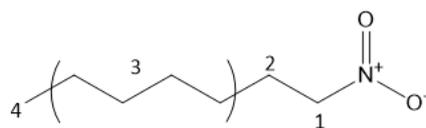
### 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-(E)-(2-nitrovinil)cromano (7, NATx0)

A una solución de **6b** (0.03 g, 0.08 mmol) en DCM, se le añadió TFA (135  $\mu$ L, 1.75 mmol) y se agitó por 2 h a T.A. Luego la mezcla de reacción se lavó con soluciones de NaHCO<sub>3</sub> y NaCl saturadas (10 mL) y se extrajo con DCM (3 x 2 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el solvente se evaporó bajo presión reducida. El crudo fue purificado mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub> flash, Hexano: Acetato de etilo, 8:2) resultando un sólido amarillo (0.07 g, 30%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 7.28 (d, J= 13.6 Hz, 1H, Hg), 6.99 (d, J= 13.2 Hz, 1H, Hf), 4.31 (s, 1H, He), 2.77 (m, 1H, H4), 2.56 (m, 1H, H4'), 2.20, 2.19, 2.11 (s, 3H, Ha Hb Hc), 2.09 (m, 1H, H3), 2.00 (m, 1H, H3'), 1.53 (s, 3H, Hd). <sup>13</sup>C-RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ = 145.5 (C8a), 144.8 (Cf), 144.1 (C6), 139.6 (Cg), 122.3, 121.6, 118.3 (C5 C7 C8), 116.6 (C4a), 73.7 (C2), 31.8 (C4), 26.0 (Cd), 20.8 (C3), 12.2, 11.8, 11.3 (Ca Cb Cc). HRMS m/z calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup> 277.1314, encontrado 277.1321.



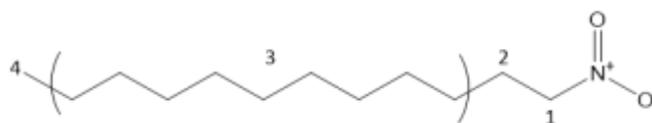
### 1-nitroheptano

A una mezcla de 1-bromo-heptano (1.1 g, 6.4 mmol, Sigma) en agua (40 mL) se le añadió AgNO<sub>3</sub> (1.6 g, 19 mmol) y NaNO<sub>2</sub> (1.7 g, 26 mmol) y se dejó en agitación a T.A. en la oscuridad por 48 h. Luego, se agregó hexano (5 mL) y se dejó agitando 1 h. Posteriormente, se filtró lavando con hexano. El filtrado se extrajo con hexano (5 x 15 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El crudo fue purificado mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, Hexano: Acetato de etilo, 9:1) resultando un líquido amarillo (0.15 g, 67%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$ = 4.32 (t, J= 7.2 Hz, 2H, H-1), 1.97 (m, 2H, H-2), 1.33 (m, 8H, H-3), 0.84 (t, J= 7.2 Hz, 3H, H-4).



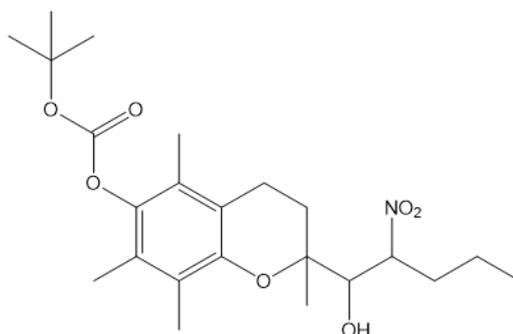
### 1-nitrododecano

A una mezcla de 1-bromododecano (0.5 g, 2.0 mmol, Sigma) en agua (30 mL) se le añadió  $\text{AgNO}_3$  (1.0 g, 6 mmol) y  $\text{NaNO}_2$  (0.6 g, 8 mmol) y se dejó en agitación a T.A. en la oscuridad por 48 h. Luego, se agregó hexano (5 mL) y se dejó agitando 1 h. Posteriormente, se filtró lavando con hexano y se realizaron extracciones con hexano (6 x 15 mL). Las fases orgánicas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtraron y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El crudo fue purificado mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , Hexano: Acetato de etilo, 9:1) resultando un líquido amarillo (0.16 g, 60%).  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 4.31$  (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H-1), 1.95 (m, 2H, H-2), 1.32 (m, 18H, H-3), 0.84 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H-4).



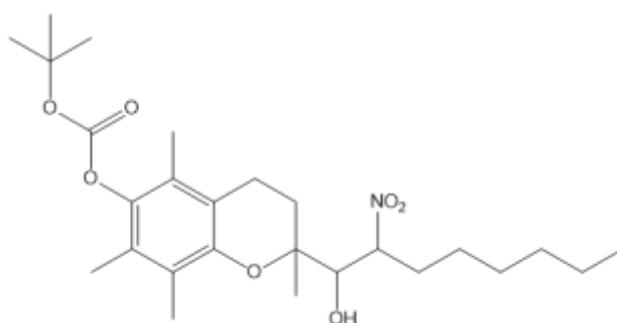
### 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2-(1-hidroxi-2-nitropentil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (8)

Una mezcla de 1-nitrobutano comercial (0.023 g, 0.22 mmol), el aldehído derivado de Trolox **3** (0.075 g, 0.22 mmol) y DBU (0.1 mL, 0.02 mmol) en acetonitrilo (1 mL), fue agitada a T.A. por 24 h. Luego el disolvente fue removido bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , Hexano: Acetato de etilo 85:15) para dar el producto nitroaldol como mezcla de diasterómeros (sólido blanco, 0.075 g, 81%). MS ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  (%): 437 ( $\text{M}^+$ , 4), 337 (22), 234 (39), 205 (100), 149 (21), 57 (94). HRMS:  $m/z$  [ $\text{M}^+$ ] calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_7$ : 437.2414, encontrado: 437.2421.



**6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2-(1-hidroxi-2-nitrooctil)-2,5,7,8-tetrametilcromano (9)**

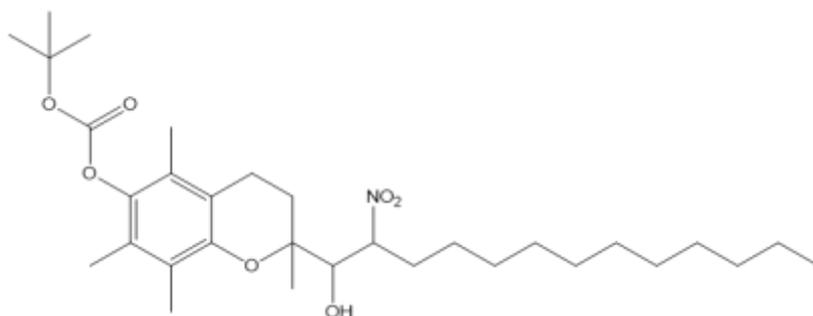
Una mezcla de 1-nitroheptano (0.087 g, 0.60 mmol), el aldehído derivado de Trolox **3** (0.2 g, 0.6 mmol) y DBU (0.1 mL, 0.06 mmol) en acetonitrilo (2 mL) fue agitada a T.A. por 24 h. Luego el disolvente fue removido bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, Hexano: Acetato de etilo 85:15) para dar el producto nitroaldol como mezcla de diasterómeros (aceite amarillo, 0.214 g, 76%). MS (EI+): m/z (%): 479 (M+, 1.4), 379 (18), 234 (44), 205 (99), 57 (100). HRMS: m/z [M+] calculado para C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>7</sub>: 479.2883, encontrado: 479.2867.



**6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2-(1-hidroxi-2-nitrotridecano)-2,5,7,8-tetrametilcromano (10)**

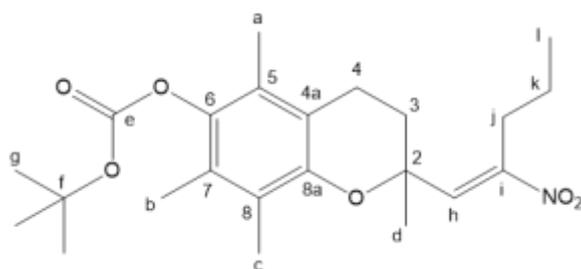
Una mezcla de 1-nitrododecano (0.13 g, 0.60 mmol), el aldehído derivado de Trolox **3** (0.2 g, 0.6 mmol) y DBU (0.1 mL, 0.06 mmol) en acetonitrilo (2 mL) fue agitada a T.A. por 24 h. Luego el disolvente fue removido bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, Hexano: Acetato de etilo 85:15) para dar el

producto nitroaldol como mezcla de diastereómeros (aceite amarillo, 0.14 g, 42%). MS (EI<sup>+</sup>): m/z (%): 449 (6), 234 (27), 205 (61), 57 (100).



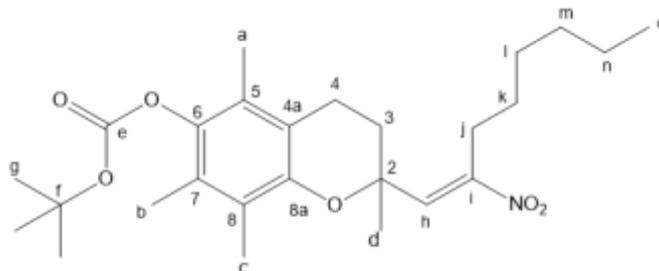
**(E)-6-((*tert*-Butoxycarbonyl)-oxi)-2,5,7,8-tetrametil-2-(2-nitro-1-pentenil)cromano (11)**

Al nitroaldol **8** (0.07 g, 0.16 mmol) en DCM seco (3 mL), se le añadió cloruro de metansulfonilo (0.037 g, 0.32 mmol) y trietilamina (0.058 mL, 0.42 mmol) en baño de hielo. Luego de 2 h, la formación completa del derivado mesilado fue observada como mezcla diastereotópica (doble banda). Posteriormente, se añadió DBU (0.06 g, 0.4 mmol) y la reacción se dejó en agitación toda la noche. Al día siguiente, se agregó agua (20 mL), se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 x 5 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtró y se evaporó el disolvente mediante presión reducida. El producto fue purificado en columna cromatográfica (SiO<sub>2</sub>, Hexano: Acetato de etilo 85:15) resultando el producto deseado como aceite amarillo (0.046 g, 69%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ= 6.93 (s, 1H, Hh); 2.67 (t, *J*= 10 Hz, 2H, Hj), 2.60 (m, 1H, H4), 2.53 (m, 1H, H4'), 2.07 (s, 3H, Hb), 2.02 (s, 3H, Ha), 1.97 (m, 1H, H3), 1.95 (s, 3H, Hc), 1.84 (m, 1H, H3'), 1.47 (s, 9H, Hg), 1.46 (s, 3H, Hd), 1.40 (m, 1H, Hk), 1.20 (m, 1H, Hk'), 0.82 (t, *J*= 10 Hz, 3H, Hl). <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 153.7 (Ce), 152.1 (Ca), 148.4 (Ci), 141.7 (C6), 137.4 (Ch), 128.2, 125.7, 122.7 (C5 C7 C8), 117.2 (C4a), 82.9 (Cf), 74.7 (C2), 32.9 (C3), 28.2 (Cj), 27.6 (Cg), 21.6 (C4), 20.7 (Ck), 13.9 (Cl), 12.77, 12.08, 11.91 (Ca Cb Cc). MS (EI<sup>+</sup>): m/z (%): 419 (M<sup>+</sup>, 2.04), 319 (29.04), 164.08 (19.62), 57.07 (100). HRMS: m/z [M<sup>+</sup>] calculado para C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>6</sub>: 419.2308, encontrado: 419.2308.



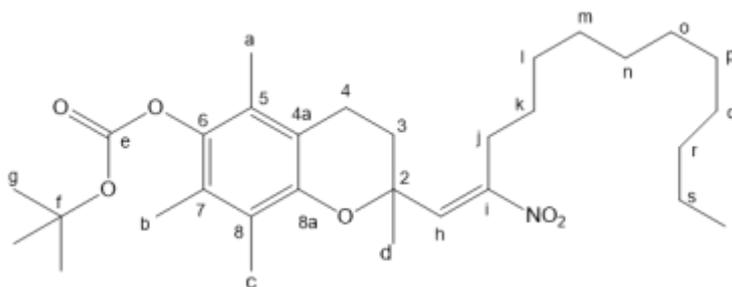
**(E)-6-((*tert*-Butoxycarbonyl)-oxi)-2,5,7,8-tetrametil-2-(2-nitro-1-octenil)cromano (12)**

Al nitroaldol **9** (0.2 g, 0.42 mmol) en DCM seco (5 mL), se le añadió cloruro de metansulfonilo (0.048 g, 0.42 mmol) y trietilamina (0.15 mL, 1.1 mmol) en baño de hielo. Luego de 2 h, la formación completa del derivado mesilado fue observada como mezcla diasterotópica (doble banda). Posteriormente, se añadió DBU (0.16 g, 1.0 mmol) y la reacción se dejó en agitación toda la noche. Al día siguiente, se agregó agua (20 mL), se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 x 5 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtró y se evaporó el disolvente mediante presión reducida. El producto fue purificado en columna cromatográfica (SiO<sub>2</sub>, Hexano: Acetato de etilo 85:15) resultando el producto deseado como aceite amarillo (0.09 g, 47%). <sup>1</sup>H- RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ= 6.91 (s, 1H, H<sub>h</sub>), 2.69 (t, J= 10.2 Hz, 2H, H<sub>j</sub>), 2.60 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 2.54 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 2.07 (s, 3H, H<sub>a</sub>), 2.01 (s, 3H, H<sub>b</sub>), 1.99 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3H, H<sub>c</sub>), 1.83 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 1.48 (s, 9H, H<sub>g</sub>), 1.47 (s, 3H, H<sub>d</sub>), 1.35 (m, 1H, H<sub>k</sub>), 1.19 (m, 6H, H<sub>l</sub> H<sub>m</sub> H<sub>n</sub>), 1.06 (m, 1H, H<sub>k'</sub>), 0.81 (t, J= 10.2 Hz, 3H, H<sub>o</sub>). <sup>13</sup>C- RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 153.9 (C<sub>e</sub>), 152.1 (C<sub>8a</sub>), 148.4 (C<sub>i</sub>), 141.7 (C<sub>6</sub>), 137.1 (C<sub>h</sub>), 128.2, 125.7, 122.6 (C<sub>5</sub> C<sub>7</sub> C<sub>8</sub>), 117.2 (C<sub>4a</sub>), 82.8 (C<sub>f</sub>), 74.7 (C<sub>2</sub>), 32.9 (C<sub>3</sub>), 31.5 (C<sub>m</sub>), 29.4 (C<sub>l</sub>), 28.3 (C<sub>j</sub>), 27.7 (C<sub>g</sub>), 22.6 (C<sub>k</sub>), 21.0 (C<sub>h</sub>), 20.7 (C<sub>4</sub>), 14.0 (C<sub>o</sub>), 12.7, 12.1, 11.9 (C<sub>a</sub> C<sub>b</sub> C<sub>c</sub>). MS (EI+): m/z (%): 461 (M<sup>+</sup>, 5.50), 361 (72.10), 164.08 (30.36), 57.07 (100). HRMS: m/z [M<sup>+</sup>] calculado para C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>6</sub>: 461.2777, encontrado: 461.2763.



**(E)-6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)-2,5,7,8-tetrametil-2-(2-nitro-1-tridecenil)cromano (13)**

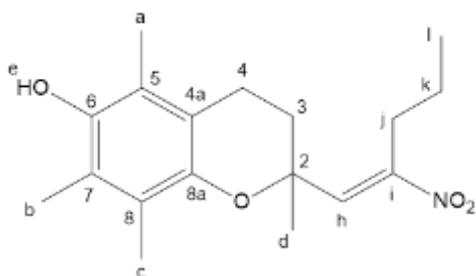
Al nitroaldol **10** (0.14 g, 0.26 mmol) en DCM seco (3 mL), se le añadió cloruro de metansulfonilo (0.030 g, 0.26 mmol) y trietilamina (0.068 mL, 0.7 mmol) en baño de hielo. Luego de 2 h, la formación completa del derivado mesilado fue observada como mezcla diastereotópica (doble banda). Posteriormente, se añadió DBU (0.1 g, 0.65 mmol) y la reacción se dejó en agitación toda la noche. Al día siguiente, se agregó agua (20 mL), se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 x 5mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtró y se evaporó el disolvente mediante presión reducida. El producto fue purificado en columna cromatográfica (SiO<sub>2</sub>, Hexano: Acetato de etilo 85:15) resultando el producto deseado como aceite amarillo (0.06 g, 44%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ= 6.91 (s, 1H, Hh), 2.69 (t, J=8.1 Hz, 2H, Hj), 2.60 (m, 1H, H4), 2.55 (m, 1H, H4'), 2.07 (s, 3H, Ha), 2.01 (s, 3H, Hb), 1.97 (m, 1H, H3), 1.96 (s, 3H, Hc), 1.83 (m, 1H, H3'), 1.47 (s, 9H, Hg), 1.46 (s, 3H, Hd), 1.31 (m, 1H, Hk), 1.18 (m, 16H, Hl Hm Hn Ho Hp Hq Hr Hs), 1.08 (m, 1H, Hk'), 0.82 (t, J= 8.1 Hz, 3H, Ht). <sup>13</sup>C- RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ 154.0 (Ce), 152.1 (C8a), 148.4 (Ci), 141.7 (C6), 137.1 (Ch), 127.8, 125.7, 122.7 (C5 C7 C8), 117.2 (C4a), 82.8 (Cf), 74.6 (C2), 32.9 (C3), 31.8 (Cj), 29.72, 29.63, 29.62, 29.59, 29.55, 29.34, 28.32 (7C: Cl,m,n,o,r,p,r), 27.7 (Cg), 26.5 (Ck), 22.7 (C4), 21.0 (Cs), 14.1 (Ct), 12.7, 12.1, 11.9 (Ca Cb Cc). MS (EI+): m/z (%): 531 (M+, 2.11), 431 (100), 164 (36), 57 (98). HRMS: m/z [M+] calculado para C<sub>31</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>6</sub>: 531.3560, encontrado: 531.3588.



**(E)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-(2-nitro-1-pentenil)cromano (14)**

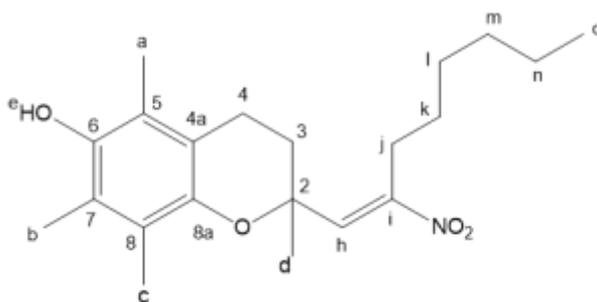
A una solución del nitroalqueno **11** (0.02 g, 0.048 mmol) en DCM (0.8 mL), se le añadió TFA (0.081 mL, 1.05 mmol) y se dejó en agitación por 2 h a T.A. Luego, la reacción se lavó

con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) y NaCl (10 mL) y se realizaron extracciones con DCM (3 x 2 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el disolvente fue evaporado bajo presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub> flash, Hexano: Acetato de Etilo 9:1) resultando un aceite amarillo (0.014 g, 93%). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ= 6.93 (s, 1H, Hh), 4.19 (s, 1H, He), 2.67 (t, J= 8 Hz, 2H, Hj), 2.61 (m, 1H, H4), 2.55 (m, 1H, H4'), 2.09 (s, 6H, Ha Hb), 2.02 (s, 3H, Hc), 2.00 (m, 1H, H3), 1.84 (m, 1H, H3'), 1.47 (s, 3H, Hd), 1.38 (m, 1H, Hk), 1.18 (m, 1H, Hk'), 0.83 (t, J= 8 Hz, 3H, Hl). MS (EI+): m/z (%): 319 (M+, 74), 164 (100), 121 (19). HRMS: m/z [M+] calculado para C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>: 319.1784, encontrado: 319.1761. <sup>13</sup>C-RMN.



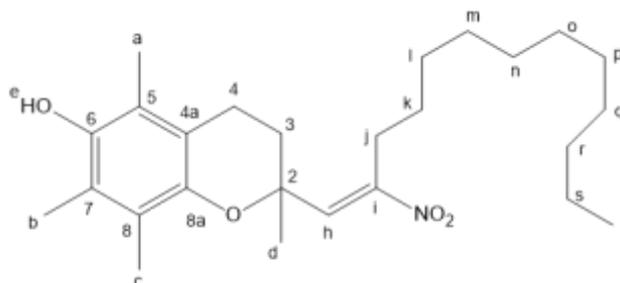
#### **(E)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-(2-nitro-1-octenil)cromano (15)**

A una solución del nitroalqueno **12** (0.02 g, 0.043 mmol) en DCM (0.74 mL), se le añadió TFA (0.074 mL, 0.95 mmol) y se dejó en agitación por 2 h a T.A. Luego, la reacción se lavó con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) y NaCl (10 mL) y se realizaron extracciones con DCM (3 x 2 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el disolvente fue evaporado bajo presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub> flash, Hexano: Acetato de Etilo 85:15) resultando un aceite amarillo (0.013 g, 90%). <sup>1</sup>H- RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ= 6.91 (s, 1H, Hh), 4.18 (s, 1H, He), 2.68 (m, 2H, Hj), 2.61 (m, 1H, H4), 2.51 (m, 1H, H4'), 2.09 (s, 3H, Ha), 2.08 (s, 3H, Hb), 2.03 (s, 1H, Hc), 1.99 (m, 1H, H3), 1.80 (m, 1H, H3'), 1.47 (s, 3H, Hd), 1.29 (m, 1H, Hk), 1.21 (m, 6H, Hl Hm Hn), 1.06 (m, 1H, Hk'), 0.81 (t, J=6.8 Hz, 3H, Ho). MS (EI+): m/z (%): 361 (M+, 100), 164 (91), 121 (18). HRMS: m/z [M+] calculado para C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>: 361.2253, encontrado: 361.2239. <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ= 153.94 (Ci), 145.38 (C8a), 144.71 (C6), 137.41 (Ch), 122.22 (C8), 121.54 (C7), 118.65 (C5), 117.07 (C4a), 74.26 (C2), 33.35 (C3), 31.60, 29.35, 28.26, 26.41, 20.96 (Cj-n), 26.66 (Cd), 22.66 (C4), 14.13 (Co), 12.21, 12.06, 11.32 (Ca-c).



**(E)-6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-(2-nitro-1-tridecenil)cromano (16)**

A una solución del nitroalqueno **13** (0.02 g, 0.038 mmol) en DCM (0.64 mL), se le añadió TFA (0.064 mL, 0.83 mmol) y se dejó en agitación por 2 h a T.A. Luego, la reacción se lavó con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) y NaCl (10 mL) y se realizaron extracciones con DCM (3 x 2 mL). Las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtraron y el disolvente fue evaporado bajo presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub> flash, Hexano: Acetato de Etilo 85:15) resultando un aceite amarillo (0.01 g, 63%). <sup>1</sup>H- RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ= 6.98 (s, 1H, Hh), 4.23 (s, 1H, He), 2.75 (m, 2H, Hj), 2.68 (m, 1H, H4), 2.63 (m, 1H, H4'), 2.16 (s, 3H, Ha), 2.15 (s, 3H, Hb), 2.10 (s, 3H, Hc), 2.06 (m, 1H, H3), 1.91 (m, 1H, H3'), 1.54 (s, 3H, Hd), 1.30 (m, 17H, Hk Hl Hm Hn Ho Hp Hq Hr Hs), 1.14 (m, 1H, Hk'), 0.90 (t, J=8.0 Hz, 3H, Ht). MS (EI+): m/z (%): 431 (M+, 100), 164 (77), 57 (20). HRMS: m/z [M+] calculado para C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>: 431.3036, encontrado: 431.3030. <sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ= 153.94 (Ci), 145.38 (C8a), 144.70 (C6), 137.40 (Ch), 122.22 (C8), 121.54 (C7), 118.65 (C5), 117.07 (C4a), 74.25 (C2), 33.34 (C3), 31.92, 29.70, 29.63, 29.61, 29.53, 29.39, 29.34, 28.30, 26.41, 20.96 (Cj-s), 26.64 (Cd), 22.70 (C4), 14.13 (Ct), 12.22, 12.07, 11.32 (Ca-c).



### **Detección mediante HPLC de los nitroalquenos derivados del Trolox obtenidos.**

Para la obtención del cromatograma de HPLC se utilizó una columna en fase reversa C30 con un flujo de 1.5 mL/min y las siguientes fases móviles: A= H<sub>2</sub>O, B= MeOH. El gradiente utilizado fue: 0-3 min 75 % B; 3-10 min 100 % B; 10-14 min 100 % B; 14-15 min 75 % B; 15-20 min 75 % B. Estas condiciones fueron utilizadas para todos los experimentos realizados con HPLC en esta tesis. Los compuestos fueron detectados a 266 nm luego de una co-inyección de 10 nmol preparada en 75% B.

## **6.2 Caracterización fisicoquímica**

Para estos ensayos, preparamos stocks de **NATx0** en DMSO (100mM), los cuales se almacenaron en freezer por aproximadamente 6 meses, ya que se encontró un alto grado de estabilidad en esas condiciones.

### **Reactividad de NATx0 frente a nucleófilos modelo.**

En espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio se obtuvo el espectro de absorción de NATx0 (100  $\mu$ M) y posteriormente se incubó con  $\beta$ -mercaptoetanol BME (1 mM) en buffer fosfato 20mM pH 7.4. Inmediatamente se obtuvieron los espectros de absorción durante 5 minutos, cada 60s. Las mediciones cinéticas en stopped-flow fueron realizadas en un espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent) acoplado a una unidad "Rx 2000 stopped flow analyzer" de rápido mezclado (Applied Photophysics). Para ello, 150  $\mu$ L de NATx0 (25 $\mu$ M) fueron incubados con 0.54 mM, 1.09 mM, 1.64 mM, 2.18 mM, y 2.73 mM de BME. La reacción fue monitoreada a 260 nm y se obtuvieron los gráficos de Abs. vs tiempo. Las curvas obtenidas se ajustaron a una exponencial simple utilizando el programa Originlab (versión 8.0). Se obtuvo de la ecuación la constante de pseudo-primer orden para cada concentración de BME y se graficaron en función de la concentración de BME. La constante de segundo orden de la reacción (Kf) se obtuvo de la pendiente del ajuste de la curva obtenida y la constante de eliminación (kr) del intercepto. Estos experimentos fueron realizados a 25°C por triplicado. De la misma manera, NATx0 (130  $\mu$ M) fue incubado con glutatión (2 mM, Sigma) en buffer fosfato 100 mM pH 7.4. Las mediciones cinéticas en stopped flow fueron realizadas con 25  $\mu$ M

de NATx0 y 0.54 mM, 1.09 mM, 1.64 mM, 2.18 mM, y 2.73 mM de GSH. Se analizaron los datos de la misma manera que con BME.

### **Inhibición de la enzima GAPDH como nucleófilo modelo en una proteína.**

La enzima GAPDH de conejo (G2267-1KU, Sigma) fue previamente reducida con ditioneitol DTT (5 mM), 30 min a 4°C. Transcurrido el tiempo, la muestra se purificó dos veces mediante gel filtración en biospin equilibrado con Tris 100 mM, pH 7.4, 0.1 mM pentaacetato de dietilentiamina (DTPA) para eliminar el exceso de DTT y se midieron los tioles con el método de Ellman (DTNB)<sup>160</sup>. La GAPDH reducida (1 µM) se incubó con NATx0 (5-20 µM) a 25°C en buffer Tris 0.1 M, pH 7.4 y 0.1 mM DTPA. A tiempos crecientes, alícuotas (0.1 µM) fueron mezcladas con 0.5 mM DL- gliceraldehído-3-fosfato (GAP), 1 mM dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD<sup>+</sup>) y 15 mM de arsenito de sodio, se midió la absorbancia a 340 nm En espectrofotómetro Varian Cary 50 y se determinó la velocidad inicial de formación de NADH (µMs<sup>-1</sup>). Los resultados se ajustaron a una exponencial simple y se determinaron los valores de  $k_{obs}$  para cada concentración de NATx0.

### **Estabilidad de NATx0 en buffer fosfato.**

NATx0 (20 µM) se preparó en buffer fosfato 100 mM pH 7.4 y se inyectó 4 nmol en HPLC en una columna en fase reversa C30 con un flujo de 1.5 mL/min y las siguientes fases móviles: A= H<sub>2</sub>O, B= MeOH. El gradiente utilizado fue: 0-3 min 75 % B; 3-10 min 100 % B; 10-14 min 100 % B; 14-15 min 75 % B; 15-20 min 75 % B. La solución se incubó en estufa a 37°C y se controló la estabilidad de la misma manera luego de 1.5 y 19h.

### **Estabilidad de NATx0 en plasma.**

Se tomaron 95 µL de plasma y se añadió NATx0 (50 nmol). Esto se realizó por cuatuplicado y se incubó a 37°C. Luego de 15 min de incubación, se tomaron 50 µL y se añadieron 900 µL de MeOH frío. Se centrifugó, y se tomaron 100 µL del sobrenadante para inyectar en HPLC. A los 50 µL restantes se les añadió 20 µL de HgCl<sub>2</sub> y se incubó 30 min a 37°C. Luego se agregaron 880 µL de MeOH frío, se centrifugó y se tomaron 100 µL para inyectar en HPLC. Este procedimiento se repitió a cada tiempo: 15 min, 1h, 2h, 3h.

Como control a tiempo 0, se prepararon 5  $\mu\text{L}$  de NATx0 en 95  $\mu\text{L}$  de buffer. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$ , se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato y 880  $\mu\text{L}$  de MeOH frío. Se centrifugó, y se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para inyectar en HPLC.

## 6.3 Ensayos *in vitro*

### **Cultivo celular.**

Las células THP-1 (ATCC TIB-202; 2015) se mantuvieron en medio RPMI (Capricorn) con 10% suero fetal bovino (SFB), Gibco y 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomycin. Para todos los experimentos realizados en la presente tesis las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos con 200 nM de phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich P8139) por 48h en estufa de cultivo (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ), quedando los macrófagos adheridos a la placa. Las células RAW 264.7 (ATCC TIB-71) se mantuvieron en medio DMEM con 10% SFB y antibióticos, en estufa de cultivo. Todos los tratamientos con los compuestos fueron realizados en el medio de cultivo correspondiente, sin suero, utilizando stocks de NATx0 en DMSO logrando la concentración final deseada en el medio.

### **Cuantificación de proteínas por Bradford.**

En esta tesis, se realizó la cuantificación de proteínas para western blot utilizando el reactivo de Bradford. Para ello, se preparó una curva de concentraciones con seroalbúmina bovina (BSA) de 0 a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en PBS, como estándar. Se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar por triplicado y se agregó 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford en placa de 96 pozos. La placa se agitó en el lector de placas y se leyó la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína de cada muestra se calculó a partir de la ecuación de la recta de la curva de BSA obtenida.

### **Estudio de la toxicidad *in vitro* de NATx0 en macrófagos.**

Los macrófagos THP-1 y Raw 264.7 fueron sembrados en placas de 96 pocillos y fueron tratados con concentraciones crecientes de NATx0 (0, 2.5, 5, 10, 17.5, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ )

por 24h a 37°C. Luego, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de MTT. Esta técnica se basa en la reducción metabólica del reactivo Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) mediada por una enzima mitocondrial, generando un compuesto coloreado (formazano) el cual se mide en espectrofotómetro a 570 nm. Para ello, se añadió el MTT a una concentración final de 0.5 mg/mL y se dejó incubar en estufa por 1h aproximadamente, o hasta ver la formación de los cristales violetas de formazano en el control sin tratamiento. Posteriormente, se descartó el medio, los cristales se disolvieron en isopropanol y se midió la absorbancia en lector de placas a 570 nm. Los resultados fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism considerando como 100 % de viabilidad a las células que fueron tratadas con 0.1% DMSO (concentración máxima de DMSO utilizada). Se calcularon los IC<sub>50</sub> como la dosis de NATx0 que reduce a la mitad la viabilidad celular luego de realizar un ajuste no-lineal en GraphPad.

#### **PCR cuantitativa (qPCR).**

Para evaluar el efecto de NATx0 sobre la expresión de citoquinas dependientes de NF- $\kappa$ B, macrófagos THP-1 fueron incubados con NATx0 (5 y 10  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) por 2h. Luego, las células fueron tratadas con LPS (1  $\mu$ g/mL) por 3h. Para evaluar la inducción de HO-1 y GCLM, macrófagos THP-1 fueron incubados con NATx0 (5 y 10  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) por 5h. Posteriormente, los sobrenadantes se removieron y se extrajo el ARNm utilizando 250  $\mu$ L de TRIzol (Invitrogen). El ARNm obtenido se resuspendió en H<sub>2</sub>O molecular (10  $\mu$ L), se cuantificó en NanoDrop y se tomaron 1000 ng de ARN. Luego se realizó una retrotranscripción a ADNc utilizando la transcriptasa SuperScript™ II Reversa (Invitrogen) y los sustratos Oligo-dT (20mer w/ 5' Phos, IDT, 1  $\mu$ L), dNTP (Fermentas, dNTP mix 25 mM, 1  $\mu$ L) y H<sub>2</sub>O molecular (c.s.p 12  $\mu$ L). La retrotranscripción se realizó en termociclador Piko 24 (Thermo Scientific). La reacción de PCR en tiempo real se realizó mezclando la muestra (2  $\mu$ L) con la sonda SYBR Green (Roche, 5  $\mu$ L) y los primers (1  $\mu$ L c/u) detallados más abajo, en un termociclador Eco Illumina. La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando el método  $\Delta\Delta$ Ct utilizando  $\beta$ -actina como gen de referencia.

Secuencia de primers utilizados:  $\beta$ -Actin forward: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3';  $\beta$ -Actin reverse: 5'CTCCTTAATGTACCCACGAT-3'; IL-6 forward: 5'-

AGTGAGGAACAAGCCAGAGC-3'; IL-6 reverse: 5'-ATTTGTGGTTGGGTCAGGGG-3'; TNF $\alpha$  forward: 5'-GCCTCTTCTCCTTCTGATCG-3'; TNF $\alpha$  reverse: 5'-TCGAGAAGATGATCTGACTGCC-3'; HO-1 forward: 5'-AAGACTGCGTTCCTGCTCAA-3'; HO-1 reverse: 5'-GGGGCAGAATCTTGCACTT-3'; GCLM forward: 5'-AGACGGGGAACCTGCTGAA-3'; GCLM reverse: 5'-TCATGAAGCTCCTCGCTGTC-3'.

### **Detección de citoquinas mediante ELISA.**

Para el análisis de las citoquinas pro-inflamatorias, macrófagos RAW 264.4 fueron sembrados en placas de 12 o 24 pozos el día anterior a los tratamientos en medio DMEM completo. Luego, las células fueron tratadas con NATx0 (5 y 10  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) por 2h y posteriormente se les agregó LPS (1  $\mu$ g/mL) por 16h. Los sobrenadantes se recolectaron y se utilizaron para analizar la concentración de citoquinas liberadas mediante un kit de ELISA según las instrucciones del fabricante (BD 555240 para IL-6 y BD 555260 para MCP-1, BD OptEIA).

### **Inmunocitoquímica para NF- $\kappa$ B.**

Macrófagos THP-1 fueron incubados con NATx0 (10  $\mu$ M) o vehículo (DMSO) por 2h para posteriormente ser activados con LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma Aldrich; 1  $\mu$ g/mL) por 30 min. Luego, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (PFA) por 30 min a T.A, permeabilizadas con 2% seroalbúmina bovina (BSA)- Tritón 0.3% en buffer fosfato por 30 min y bloqueadas por 1h con 3% BSA en buffer. Se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo de conejo anti-p65 (Cell Signaling) y luego de tres lavados con buffer- Tritón se incubó por 1h con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa-Flúor 488. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con buffer fosfato y se tiñeron los núcleos con DAPI. Las imágenes obtenidas fueron adquiridas en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 equipado con una cámara Orca-Hamamatsu CCD y analizadas en ImageJ(Fiji).

### **Ensayos de activación del inflamasoma NLRP3.**

**Metodología de activación:** Macrófagos THP-1 fueron sembrados en placas de 12 o 24 pozos y tratados en medio de cultivo sin SFB con LPS (*Escherichia coli* 0111:B4; 250

ng/mL) o LPS+NATx0 (0.5 – 20  $\mu$ M) o LPS+DMSO (0.1%) por 3h a 37°C (**protocolo “primera señal”**). Luego, las células fueron estimuladas con la sal disódica de adenosina 5'-trifosfato (ATP; 5mM) o ATP+NATx0 (0.5 – 20  $\mu$ M) o ATP+DMSO (0.1%) por 45 min (**protocolo “segunda señal”**). También se añadió un control negativo con solo medio. Luego, los sobrenadantes se removieron y fueron analizados para determinar la concentración de IL-1 $\beta$  liberada en cada caso utilizando un kit de ELISA, según las instrucciones del fabricante (BD 557953BD, BD OptEIA™). Los mismos medios se utilizaron para determinar la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa LDH utilizando un kit, según las instrucciones del fabricante (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit; Thermo Scientific). La viabilidad celular fue analizada mediante MTT, del modo previamente descrito y se calculó el porcentaje de viabilidad utilizando el control negativo (solo medio) como el 100%.

**Western blots:** Macrófagos THP-1 fueron sembrados en placas de 6 pozos y luego se procedió a la activación del inflammasoma NLRP3, siempre utilizando el protocolo “segunda señal” donde NATx0 es agregado en conjunto con el ATP. Luego de los tratamientos, se removieron los sobrenadantes y guardaron a -20°C y las células fueron lavadas con PBS (2x 1 mL). Posteriormente, en hielo, las células se levantan con PBS frío (1 mL) utilizando un raspador celular y se centrifugan a 3000 rpm por 1 min. Los pellets se resuspendieron en 100  $\mu$ L de buffer de lisis RIPA (Tris 20mM pH 8, NaCl 100mM, EDTA 1mM, 0.5% NP40 con NaF 1M, Nicotinamida 1M,  $\beta$ -glicerofosfato 1M pH 7.9 and cocktail inhibidor de proteasas, Roche) y se dejaron en agitación por 1h a 4°C. Seguidamente, se centrifugó a 10.000 g por 10 min y se cuantificó la cantidad de proteína en los sobrenadantes mediante la técnica de Bradford. Se prepararon las muestras para sembrar con 20-50  $\mu$ g/mL de proteína en buffer de muestra Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 0.125 M Tris HCl, pH 6.8). Las proteínas liberadas al medio de cultivo fueron precipitadas con acetona fría utilizando un volumen 4 veces mayor al volumen de la muestra incubando 1h a -20°C. Luego de centrifugar 10 min a 13.000 g, los pellets fueron lavados repetidamente con acetona fría. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 20  $\mu$ L de buffer Laemmli. Todas las muestras se calentaron a 100°C por 2 min y luego de enfriadas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida al 12% para su electroforesis (SDS-PAGE). Se

utilizó un buffer de corrida con Tris 25 mM, Glicina 192 mM y 0.1% SDS, pH 8.3 y un marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-180 KDa. La electroforesis se realizó a 20-30 mA y se terminó al momento en que el frente de corrida (visualizado por el azul de bromofenol presente en las muestras) llegó al final del gel. Seguidamente, se realizó una transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia semi-seca en buffer de transferencia (preparado con 80% buffer de corrida, 20 % EtOH al 95%) por 30 min a 20V. Posteriormente, la membrana se incubó en una solución de leche en polvo descremada al 5% en TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, Tween 20 al 0.2%, Azida de sodio 1:10000 solución 10%) durante 2h a T.A. Luego, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente en BSA al 2% en TBST a 4°C en agitación toda la noche:  $\beta$ -Actina (Abcam, ab8224), caspasa-1 (Santa Cruz, sc-515), IL-1 $\beta$  (Santa Cruz, sc-7884), ASC (Santa Cruz, sc-514414). Al día siguiente, la membrana fue lavada 3 veces con TBST e incubada por 1h a T.A con el anticuerpo secundario conjugado a HRP apropiado (IgG anti-ratón o IgG anti-conejo, Sigma), diluido en BSA al 2% en TBST. La membrana se lavó repetidas veces con TBST y se incubó con los sustratos de quimioluminiscencia (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo) según instrucciones del fabricante. Se procedió al revelado manual utilizando películas de revelado. Las placas fueron posteriormente escaneadas y analizadas mediante ImageJ(Fiji).

**Detección de oligómeros de ASC:** La activación del inflammasoma se realizó de la misma manera descrita para el western blot. Para los ensayos de “cross-linking”, se añadió formaldehído al 16% en RPMI y se dejó 10 min a T.A en agitación suave. Luego, se añadió Glicina 1.25M para inhibir el formaldehído que no reaccionó y las células fueron lavadas dos veces con PBS frío. Se utilizó raspador celular para levantar la monocapa celular en PBS frío en hielo y se centrifugó 10 min a 5000 rpm. Los pellets se disolvieron en buffer RIPA y se agitaron 1h a 4°C. Se cuantificó la concentración de proteína mediante Bradford y se prepararon las muestras en buffer Laemmli para western blot, sin calentamiento. Se realizó la electroforesis y western blot de la misma manera ya descrita. Para la detección de los “specks” de ASC por microscopía de fluorescencia, luego de la activación del inflammasoma, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min y

permeabilizadas con BSA 2% - Triton 0.3% en PBS y bloqueadas con una solución de BSA al 3% en PBS. Se incubó con el anticuerpo primario anti-ASC (Santa Cruz, sc-514414) toda noche a 4°C en cámara húmeda, se realizaron 3 lavados con PBS – Tritón y se incubó con un anticuerpo secundario de ratón conjugado a Alexa Flúor 633 durante 1h a T.A. Luego de 3 lavados, se tiñeron las células con DAPI y se tomaron imágenes en microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

## 6.4 Ensayos *in vivo*

Tanto los ratones como los peces cebra utilizados en esta tesis fueron mantenidos en el Bioterio del Institut Pasteur de Montevideo (UBAL). Los protocolos de experimentación animal utilizados en esta tesis fueron aprobados por el comité de ética animal del mismo Instituto (CEUA, Protocolos 014-14 y 019-15).

### **Ensayo de inflamación aguda inducida por daño en pez cebra (*Danio rerio*)**

Para estos ensayos se utilizó la cepa Tg (mpx:GFP)i114, referida en esta tesis como Tg(mpx:GFP), la cual expresa GFP (proteína verde fluorescente) bajo el promotor de mieloperoxidasa específico de neutrófilos. Se utilizaron entre 5-10 larvas por condición en cada experimento de 3 a 5 dpf (días post-fertilización). Inicialmente, se juntaron varias parejas de peces adultos en estadio reproductivo en cajas especiales para la recolección de los embriones. Al día siguiente, se recolectaron los embriones y se descartaron los no fecundados observando en microscopio. El resto se incubó en una estufa a 32°C en agua de osmosis reversa hasta el día del ensayo. El día del ensayo se seleccionaron las larvas adecuadamente desarrolladas observando en microscopio y se pasaron a placas de 6 pozos con agua de osmosis reversa fresca, contando 5-10 larvas por pozo. Posteriormente, fueron incubadas con los compuestos preparados en agua por 2h (DMSO, 0.2 y 0.5  $\mu$ M de NATx0, 2 y 4  $\mu$ M de Trolox o Ibuprofeno 20  $\mu$ M). Se anestesiaron con triclaína y se realizó un corte con bisturí en la aleta caudal como fue previamente descrito<sup>201</sup>. Luego fueron incubadas en presencia de los compuestos por 4h y fijadas en 4% PFA toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó 3 veces con PBS y se realizó una inmunohistoquímica de cuerpo entero utilizando un anticuerpo anti-GFP (Invitrogen A-11122) y un anticuerpo secundario Alexa-Flúor 488 (Invitrogen). Las larvas fueron

montadas en portaobjetos y se capturaron imágenes en un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus) con una magnificación de 10x. Los neutrófilos presentes en la región de interés definida fueron contados para cada larva en cada condición.

#### **Ensayo de inflamación aguda inducida con LPS en ratones.**

Ratones C57BL/6J fueron inyectados vía intraperitoneal (i.p) con 20 mg/kg de NATx0 (0.1 mL/ratón) o vehículo (0.1 mL DMSO) 1h antes de la inyección vía i.p de 10 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) o PBS (0.1 mL). Luego de 2h, los animales fueron sacrificados, se extrajo el líquido peritoneal luego de un lavado con PBS y sangre por punción para obtener plasma. El lavado peritoneal se centrifugó a 5000 rpm por 10 min y se guardó a -20°C para su posterior análisis. Se determinó la concentración de IL-1 $\beta$  en plasma y peritoneo utilizando un kit de ELISA, según las instrucciones del fabricante (BD 559603, BD OptEIA).

#### **Ensayo de obesidad e intolerancia a la glucosa en ratones.**

Se asignaron al azar ratones machos C57BL/6J de 24 semanas de edad en dos grupos (n=4-5/grupo). Al comienzo del ensayo, los animales fueron alimentados con dieta normal (normal chow diet, ND) por 4 semanas en conjunto con la administración oro-gástrica del vehículo o NATx0 (150 mg/kg) una vez por día, de lunes a viernes. El agua fue ofrecida ad libitum durante todo el experimento.

El vehículo consistió en una solución de carboximetilcelulosa (MC) al 1% con 1% de Tween 80 (MC/Tween 1%) preparado en agua de alta pureza. La preparación del compuesto se realizó 1 vez por semana de acuerdo al promedio semanal de los pesos del grupo NATx0. Para ello, se pesó el compuesto, se disolvió en MC/Tween 1% (volumen suficiente para administrar 0.1 mL/ratón) y se aplicaron 3 ciclos de 15 seg de sonicado hasta obtener una suspensión apropiada. Mediante HPLC, determinamos que en estas condiciones NATx0 permanece estable durante por lo menos 1 semana a T.A.

La administración de NATx0 o vehículo se realizó por vía oro-gástrica utilizando sondas de polipropileno descartables (Plastic feeding tubes, 20ga x 38mm, sterile, FTP-20-38; INSTECH). Luego de 4 semanas, los animales fueron alimentados con una dieta rica en

grasas (AIN 93 G Western Diet for Rodents, 5TJN/ 1813029, PMI Nutrition International) continuando con la administración de NATx0 (150 mg/kg) o vehículo de la misma manera descrita por 8 semanas más. Los animales fueron pesados semanalmente.

Los animales fueron colocados en cajas metabólicas dentro del laboratorio de experimentación animal de la UBAL por 24h antes de iniciar la administración del compuesto y luego de 3 semanas de administración del compuesto en ND. Para ello, cada animal se coloca en una caja metabólica con comida y agua (peso y volumen determinado, respectivamente). Cada uno de los recipientes que contienen las cajas fueron pesados para obtener la cantidad de comida y agua consumida así como también la orina y las heces depositadas luego de 24h.

La glicemia basal de los animales fue controlada al comienzo del experimento y antes de comenzar la administración. Para ello, se les realizó un ayuno de 12-18 horas aproximadamente, cambiando los animales a cajas sin comida, con agua ad libitum. Al día siguiente, se realizó una punción con aguja en la punta de cola para obtener una gota de sangre, la cual se colocó en tira de glicemia y se midió en glucómetro (ACCU-CHEK Active, Roche).

Para los ensayos de tolerancia a la glucosa (GTT), los animales fueron puestos en ayuno (12-18 h aprox.) y al día siguiente se les controló la glicemia basal. Seguidamente, se les inyectó 1.5 g de glucosa por kg de ratón vía intraperitoneal (i.p) y se les midió la concentración de glucosa en sangre con glucómetro a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección. Los valores fueron graficados y analizados en GraphPad, obteniéndose las áreas bajo la curva de las respuestas a la glucosa de cada animal utilizando la regla del trapecio.

Al final del experimento, los animales fueron inyectados con insulina (0.5U/kg) y luego de 20 min fueron anestesiados con una solución de ketamina/xilacina. Se obtuvo la sangre mediante punción cardiaca utilizando jeringas heparinizadas y se sacrificaron los animales por dislocación cervical. El plasma se obtuvo por centrifugación a 5000 rpm por 10 min y se almacenó a -80°C. Se extrajeron los órganos de interés, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Se realizó la extracción de proteínas de los músculos esqueléticos obtenidos de cada ratón y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se prepararon las muestras en buffer Laemmli para sembrar entre 40-60 µg/µl de proteína por carril y se calentaron a 100 °C por 2 min. Las muestras se analizaron por western blot, en las siguientes condiciones: gel de poliacrilamida de 12%, buffer de corrida Tris 25 mM, Glicina 192 mM y 0.1% SDS, pH 8.3, utilizando el marcador de peso molecular PageRuler™. La electroforesis se realizó a 20-30 mA y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (sistema de transferencia semi-seca) en buffer de transferencia (preparado con 80% buffer de corrida, 20 % EtOH al 95%) por 30 min a 20V. Posteriormente, se realizó un western blot en las condiciones ya descritas, utilizando los siguientes anticuerpos primarios: IL-1β (Santa Cruz sc-7884), p-Akt (Cell Signaling T308), Akt (Cell Signaling 9272), GAPDH (Cell Signaling 14C10).

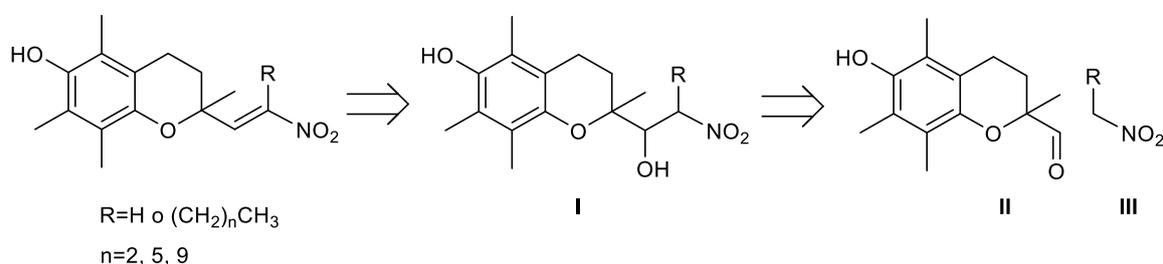
### **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos aquí mostrados fueron realizados con el software GraphPad Prism 6.0. Todos los experimentos *in vitro* fueron realizados con réplicas técnicas de duplicados o más, en al menos dos experimentos independientes, excepto en los ensayos explicitados. En los experimentos *in vivo* se utilizaron al menos 3 ratones en cada grupo o al menos 17 larvas de pez cebra. El n de cada experimento será especificado en los pies de Figura. Los test estadísticos utilizados fueron el test de ANOVA de una o dos vías seguido de ajuste por Bonferroni (comparación de dos variables entre grupos y la interacción entre ellas) y test de Student no pareado. En todos los casos se consideró un p valor < 0.05 como estadísticamente significativo.

## **7. Resultados y discusión**

## 7.1 Síntesis orgánica

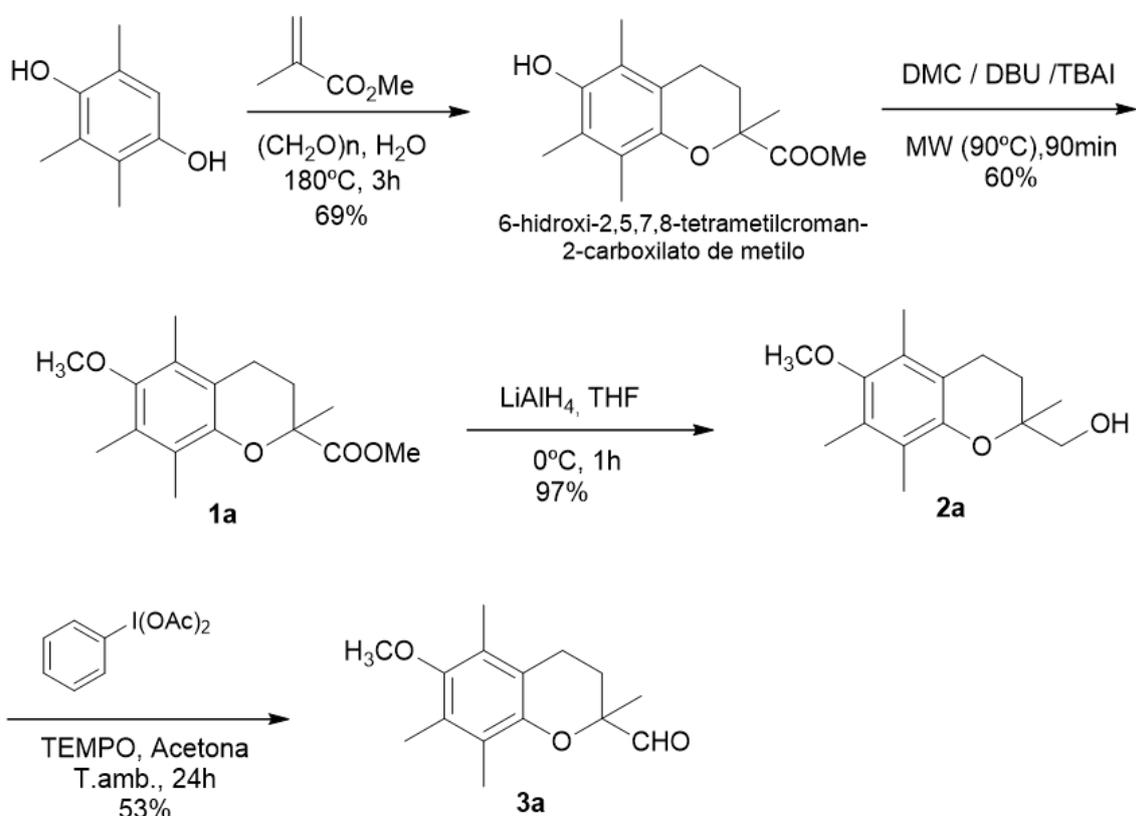
Para la obtención de los nitroalquenos derivados de Trolox propuestos en esta tesis, nos planteamos la estrategia sintética mostrada en el Esquema 7.1, la cual involucra una reacción de Henry o nitroaldólica. La funcionalidad nitroalqueno podría ser obtenida de forma directa mediante reacción de condensación entre nitroalcanos (III, Esquema 7.1) y el 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbaldehído (II, Esquema 7.1). Otra posibilidad de obtención es mediante la formación del nitroaldol correspondiente en una primera etapa (I, reacción de adición), para posteriormente bajo condiciones de eliminación formar la funcionalidad nitroalqueno.



**Esquema 7.1.** Retrosíntesis propuesta para los nitroalquenos derivados del Trolox diseñados en la presente tesis.

Dada la estrategia sintética planteada, como primer paso nos propusimos obtener el aldehído II. En base a la experiencia del grupo y a trabajos previos que describen la baja estabilidad del aldehído II a nivel del grupo fenol libre, nos planteamos obtener un derivado adecuadamente protegido. En este sentido, la tesista se encontraba colaborando en otros proyectos de investigación en el grupo, para los cuales existía un interés en la obtención del aldehído II protegido. Con este objetivo, en una primera etapa nos propusimos proteger el grupo fenol bajo la forma de éter metílico (Esquema 7.2). Para ello, utilizamos como material de partida al éster metílico del análogo hidrosoluble de  $\alpha$ -Tocoferol (Trolox), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxilato de metilo. Este derivado se obtiene mediante una técnica en un único paso de reacción, donde un derivado de fenol, un derivado de acrilato de metilo y formaldehído reaccionan en ausencia de catalizador, en presencia de agua y sin la utilización de co-disolventes <sup>159</sup> (Esquema 7.2). De este modo, el éster metílico de Trolox se obtuvo con buen

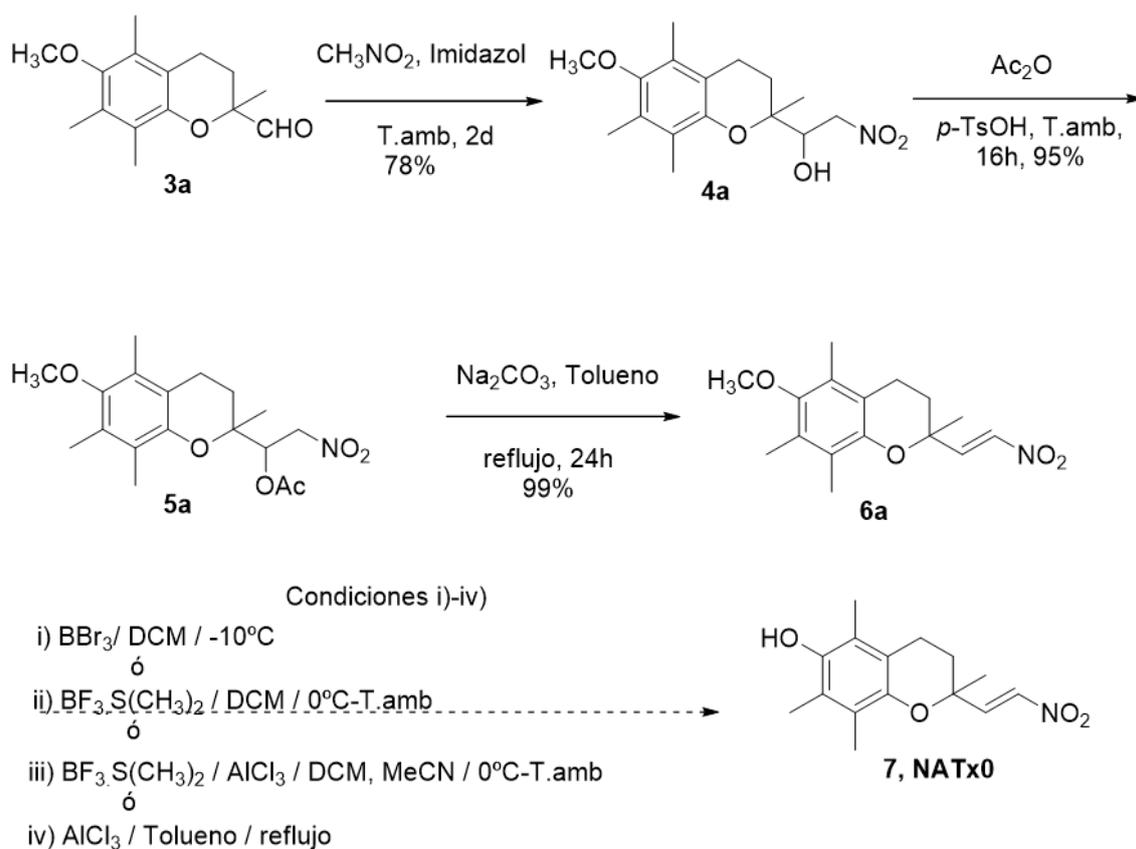
rendimiento, gracias a la utilización de un reactor de presión para llevar a cabo la reacción. Posteriormente, mediante calentamiento en microondas con DBU como base, en presencia de dimetil carbonato (DMC) como agente metilante y ioduro de tetrametilamonio (TBAI) como catalizador, se obtuvo el éter metílico **1a** deseado, con buen rendimiento. Seguidamente, el éster **1a** protegido se redujo al alcohol **2a** en presencia del agente reductor fuerte hidruro de litio y aluminio, en excelente rendimiento. Por último, la funcionalidad alcohol primario fue oxidada selectivamente al aldehído **3a** adecuadamente protegido, utilizando diacetoxiiodo benceno y TEMPO como catalizador (Esquema 7.2).



**Esquema 7.2.** Síntesis del 6-Metoxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbaldehído (**3a**).

Una vez obtenido el aldehído **3a**, se ensayó una metodología sintética para la obtención del nitroalqueno **7** deseado, la cual se muestra en el Esquema 7.3. Para ello, el primer paso de reacción consistió en la obtención del nitroaldol **4a** mediante reacción de Henry o adición nitroaldólica entre el aldehído **3a** y nitrometano en presencia de imidazol como base <sup>163</sup>, con buen rendimiento. Seguidamente, la funcionalidad alcohol fue transformada en un buen grupo saliente mediante acetilación, obteniendo el

correspondiente derivado **5a** con excelente rendimiento. El siguiente paso, consistió en la reacción de eliminación en presencia de carbonato de sodio como base, bajo calentamiento a reflujo en tolueno, para rendir de manera cuantitativa el nitroalqueno **6a**. Finalmente, se ensayaron diferentes condiciones clásicas para desprotección del grupo fenol (Esquema 7.3). Sin embargo, bajo ninguna de las condiciones ensayadas se logró aislar el producto **7** deseado, observándose en la mayoría de las condiciones descomposición del material de partida o formación de mezclas complejas de reacción.

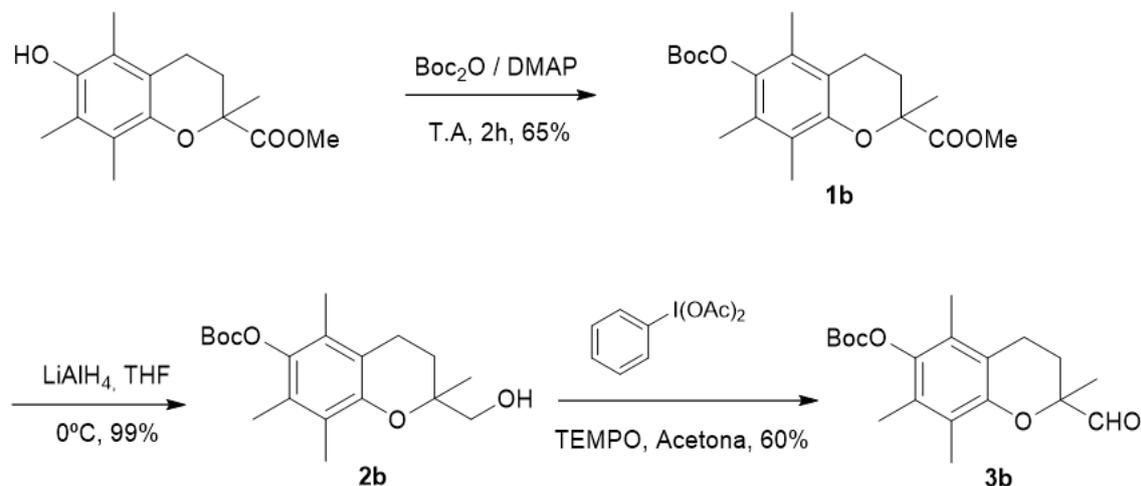


**Esquema 7.3.** Metodología sintética estudiada para la obtención de **NATx0 (7)** a partir de **3a**.

En base a estos resultados, el grupo protector Boc fue seleccionado, ya que puede ser fácilmente introducido a nivel del grupo fenol y puede ser removido en condiciones ácidas suaves, lo cual podría evitar la degradación observada anteriormente.

Como primer paso, el grupo Boc fue introducido en el éster metílico de Trolox mediante reacción con di-*tert*-butil dicarbonato ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) en presencia de DMAP, obteniendo el

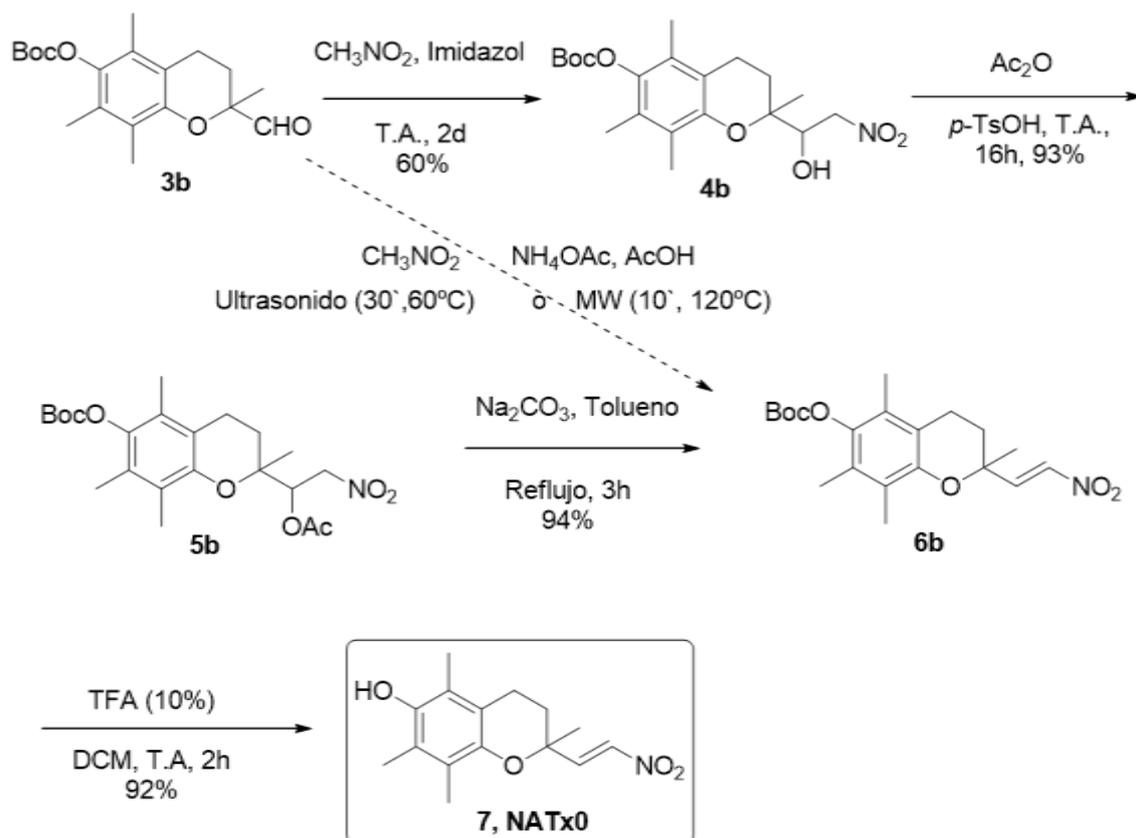
derivado adecuadamente protegido **1b** con buen rendimiento (Esquema 7.4). Luego, mediante la reducción del éster metílico **1b** al alcohol **2b** y oxidación del mismo utilizando (diacetoxiiodo)benceno y TEMPO, se obtuvo el aldehído **3b**.



**Esquema 7.4.** Síntesis del 6-((*tert*-Butoxicarbonil)-oxi)- 2,5,7,8-tetrametilcroman- 2-carbaldehído (**3b**).

Con el objetivo de obtener el producto **6b** en un solo paso, ensayamos condiciones de condensación nitroaldólica con nitrometano utilizando acetato de amonio como catalizador. A su vez, tomando como base trabajos previos para este tipo de reacción, nos propusimos utilizar irradiación de microondas y ultrasonido como fuentes de calentamiento eficientes. Sin embargo, no se obtuvo el nitroalqueno deseado o se detectó en pequeñas cantidades en el crudo de reacción (Esquema 7.5). Por lo tanto, en base a la experiencia previa, ensayamos la adición nitroaldólica y posterior reacción de eliminación para formar la funcionalidad nitroalqueno. Partiendo del aldehído **3b** por reacción con nitrometano en presencia de imidazol como base, luego de 2 días a temperatura ambiente se obtuvo el nitroaldol **4b** con 60% de rendimiento (Esquema 7.5). El producto se obtuvo como mezcla de diastereómeros, ya que el aldehído **3b** se utiliza como mezcla racémica, y el nitroaldol generado produce un nuevo centro quiral. Seguidamente, el grupo alcohol se transformó en un buen grupo saliente mediante acetilación (derivado **5b**), el cual posteriormente fue eliminado en presencia de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base, bajo calentamiento a reflujo de tolueno, generando el nitroalqueno **6b** con excelente rendimiento. La desprotección del grupo Boc en el derivado **6b** mediante

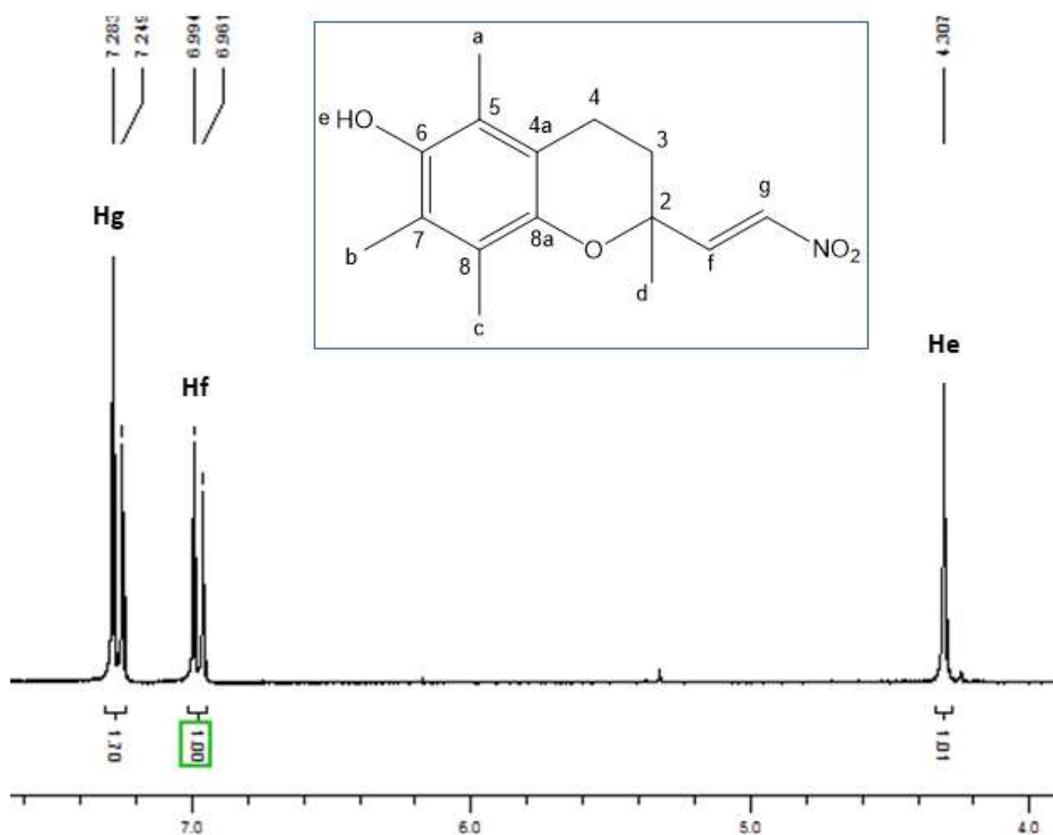
tratamiento con TFA al 10% en DCM generó el nitroalqueno derivado de Trolox **7** (**NATx0**). De este modo, las condiciones suaves de desprotección, temperatura ambiente y baja cantidad de ácido, permitieron la obtención del producto de interés en corto tiempo y con excelente rendimiento (Esquema 7.5).

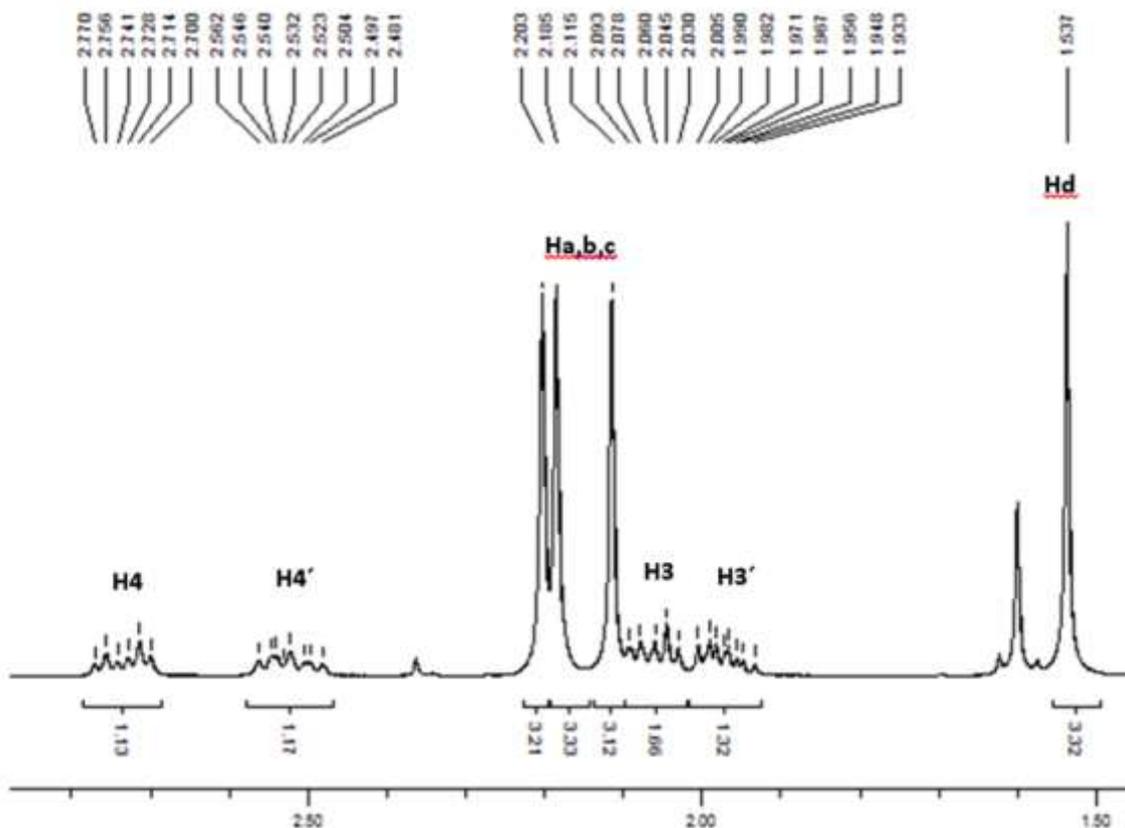


**Esquema 7.5.** Síntesis del 6-(tert-butoxicarboniloxi)-2,5,7,8-tetrametilcroman- 2-nitrovinilo (**7, NATx0**).

La estructura de los compuestos sintetizados fue confirmada mediante experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN (productos intermedios y finales) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (productos finales), donde se identificaron las señales correspondientes a los distintos tipos de protones y carbonos presentes en las moléculas. La correcta asignación de las señales fue realizada mediante la ayuda de experimentos de correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY), y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a un enlace y más de un enlace (HSQC y HSBC). También se confirmó la estructura de los compuestos finales mediante espectrometría de masas (impacto electrónico) y masas de alta resolución.

En la Figura 7.6 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del nitroalqueno **7 (NATxO)**, donde se identificaron las señales correspondientes a los distintos tipos de protones de la molécula. En dicho espectro, se pueden apreciar dos dobletes en  $\delta = 6.99$  y  $7.28$  ppm (ambos con integración 1H), los cuales corresponden a los hidrógenos presentes en el grupo nitroalqueno. La constante de acoplamiento obtenida para estos protones es de 13.2 Hz, indicando la presencia del compuesto como isómero geométrico *E (trans)*. El singulete en  $\delta = 4.30$  ppm (integración 1H) corresponde a la señal del OH del anillo cromanol, los multipletes entre  $\delta = 2.80$  y  $2.0$  ppm corresponden a las señales de los metilenos del anillo de cromano y entre  $\delta = 1.50$  y  $2.20$  ppm se encuentran los distintos metilos del benceno y anillo cromano (singuletes que integran 3H).





**Figura 7.6.** Zonas ampliadas del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  obtenido para el derivado **7** (NATx0).

En la Figura 7.7 se muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de dicho compuesto, donde se identificaron cada una de las señales de carbono características de la estructura propuesta. Por ejemplo, las señales a  $\delta=139.6$  y  $144.8$  ppm corresponden a los carbonos del grupo nitroalquénico, las cuales fueron confirmadas mediante el experimento HSQC (Figura 7.8).

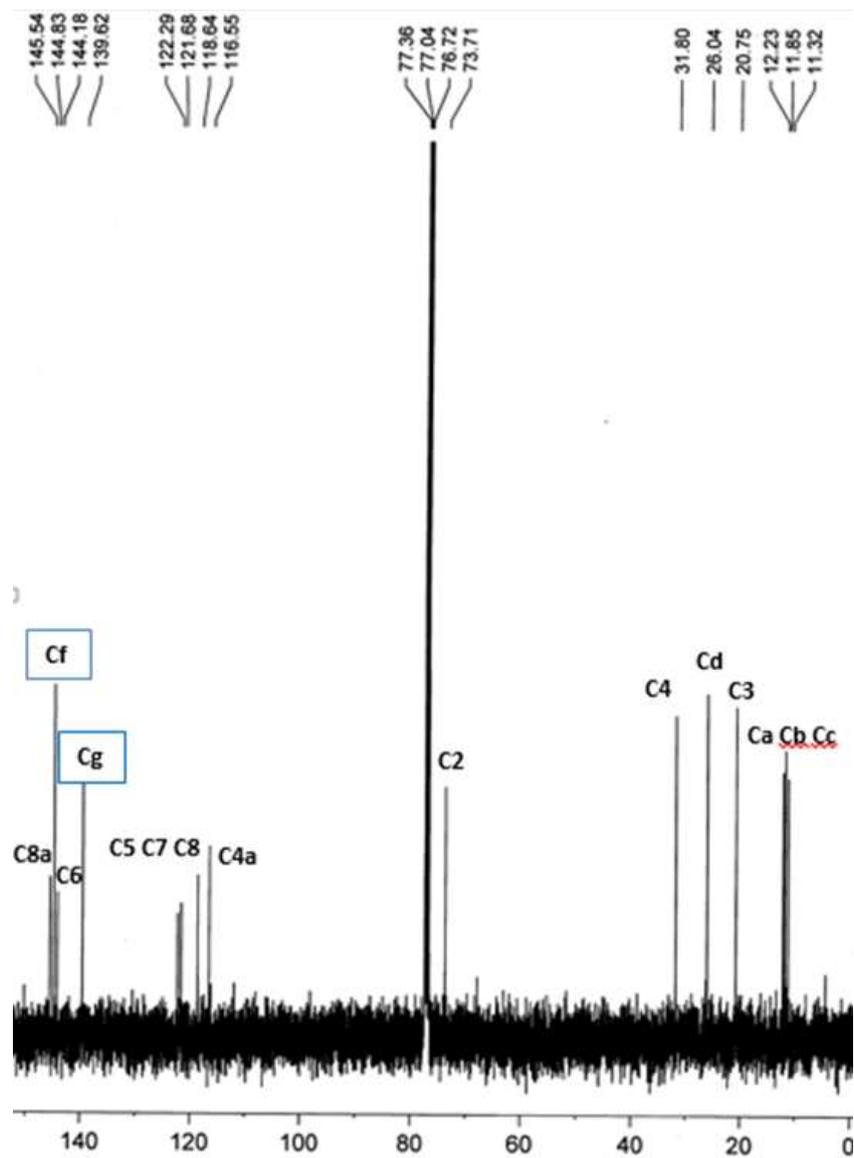


Figura 7.7. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  obtenido para el derivado 7 (NATx0).

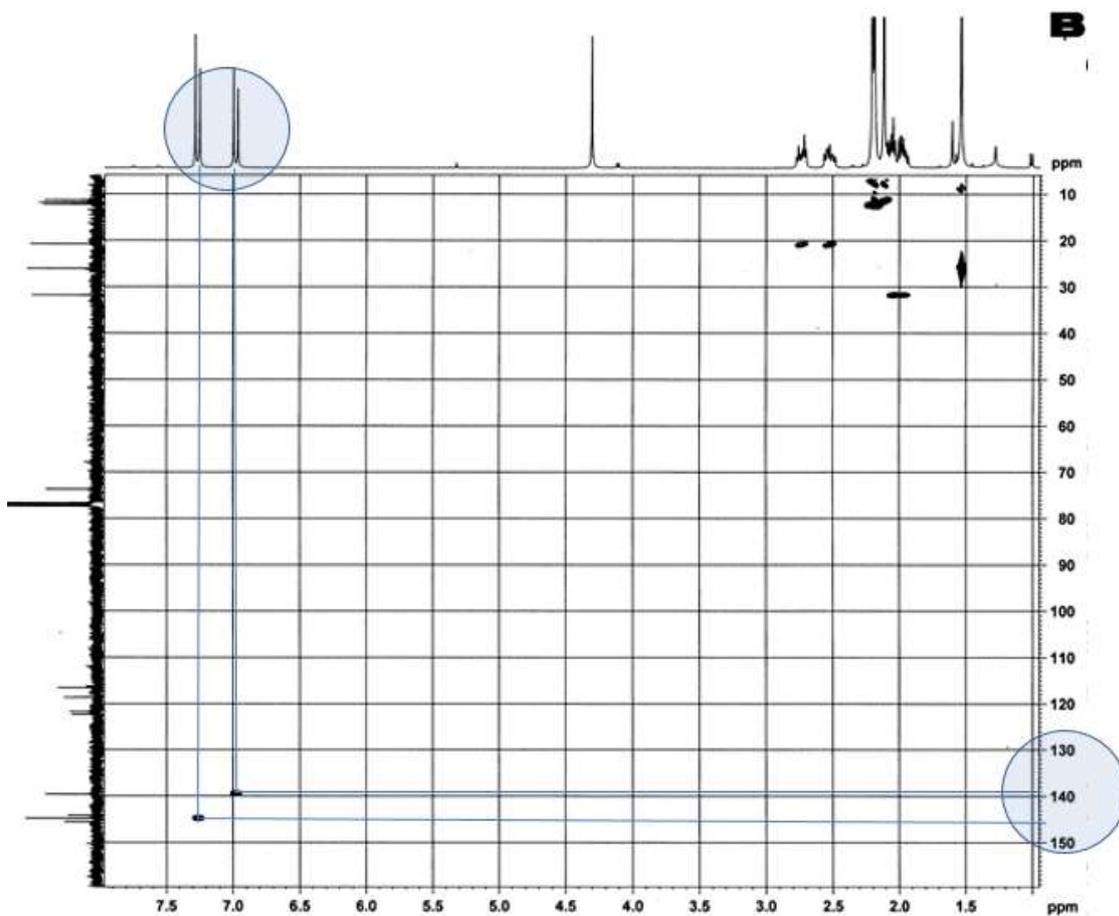


Figura 7.8. Espectro de HSQC obtenido para el derivado **7 (NATx0)**.

El espectro de masa de **NATx0** obtenido por impacto electrónico se presenta en la Figura 7.9. En dicho espectro, se puede observar principalmente la presencia del ion molecular ( $M^+$ , 277) con una abundancia de 72% y el ion más abundante (164, 100%). Dicho ion podría formarse por la reacción con un radical libre produciendo el radical fenóxido (estabilizado por resonancia) y posterior ruptura del anillo cromano para formar una quinona radical de peso molecular 164.

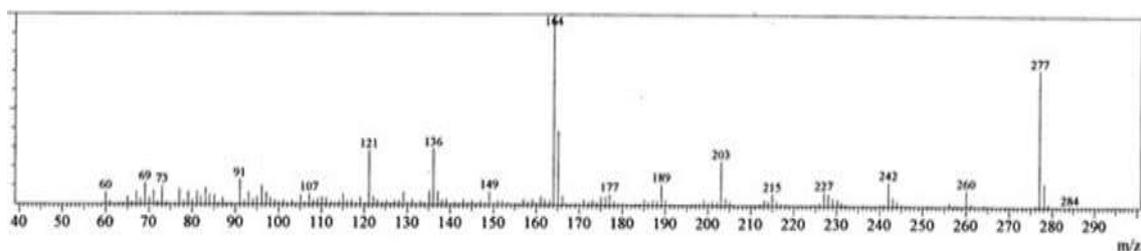
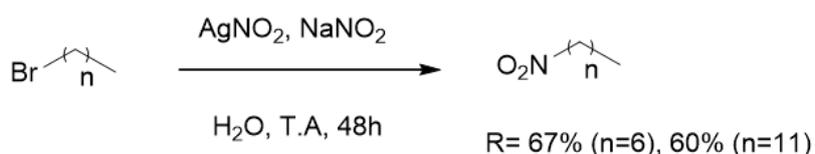


Figura 7.9. Espectro de masas obtenido por impacto electrónico (EI MS) para el derivado **7 (NATx0)**.

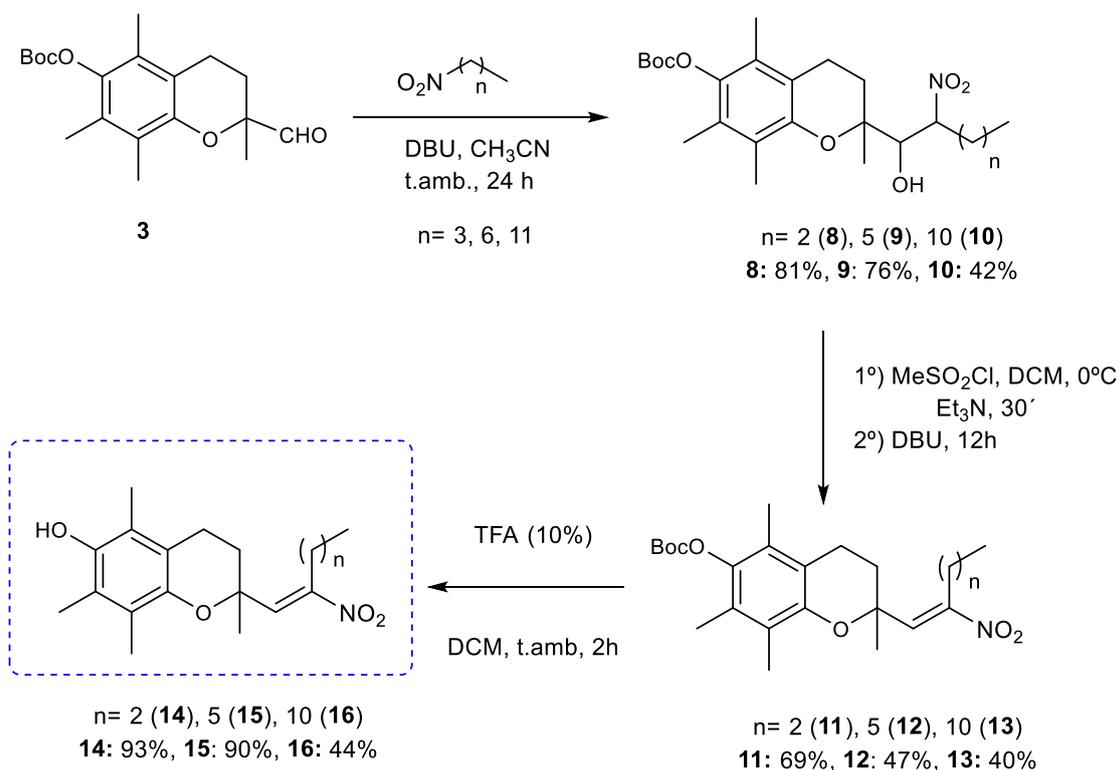
Cabe destacar que la síntesis de **NATx0** pudo ser reproducida a mayor escala para poder realizar los estudios *in vivo* (hasta 10g), mediante la contratación de los servicios de la empresa SIQUIMIA.

Teniendo como referencia la metodología sintética empleada para el nitroalqueno **7** (**NATx0**), el siguiente paso fue la obtención de los demás nitroalquenos diseñados con diferentes largos de cadena carbonada. Para ello, a partir del aldehído **3b** se ensayaron diferentes condiciones de reacción de Henry o nitroaldólica utilizando nitroalcanos de diferentes largos de cadena, uno comercial (1-nitrobutano) y dos sintetizados en nuestro laboratorio (1-nitroheptano y 1-nitrododecano). En este último caso, la síntesis de los mismos se realizó a partir del 1-bromoalcano comercial en presencia de nitrato de plata y nitrito de sodio, utilizando agua como disolvente a temperatura ambiente <sup>164</sup>, con rendimientos de 60-70% (Esquema 7.10).



**Esquema 7.10.** Síntesis de 1-nitroheptano y 1-nitrododecano.

De forma similar a la estrategia mostrada en el Esquema 7.5, cuando partimos del aldehído **3b** en presencia de 1-nitrobutano comercial e imidazol como base, luego de 2 días a temperatura ambiente, el respectivo nitroaldol no fue evidenciado. Por lo tanto, decidimos ensayar la utilización de una base más fuerte como DBU en cantidades catalíticas a temperatura ambiente, obteniendo los nitroaldoles correspondientes, con moderados a buenos rendimientos (Esquema 7.11, compuestos **8**, **9** y **10**). Los nitroalquenos **11**, **12** y **13** fueron generados mediante la mesilación del aldol correspondiente y su eliminación en presencia de DBU (Esquema 7.11). Finalmente, la desprotección del grupo Boc con TFA rindió los nitroalquenos finales deseados con excelentes rendimientos para los compuestos **14** (**NATx3**) y **15** (**NATx6**), y con rendimiento moderado para el de mayor largo de cadena carbonada, compuesto **16** (**NATx11**).

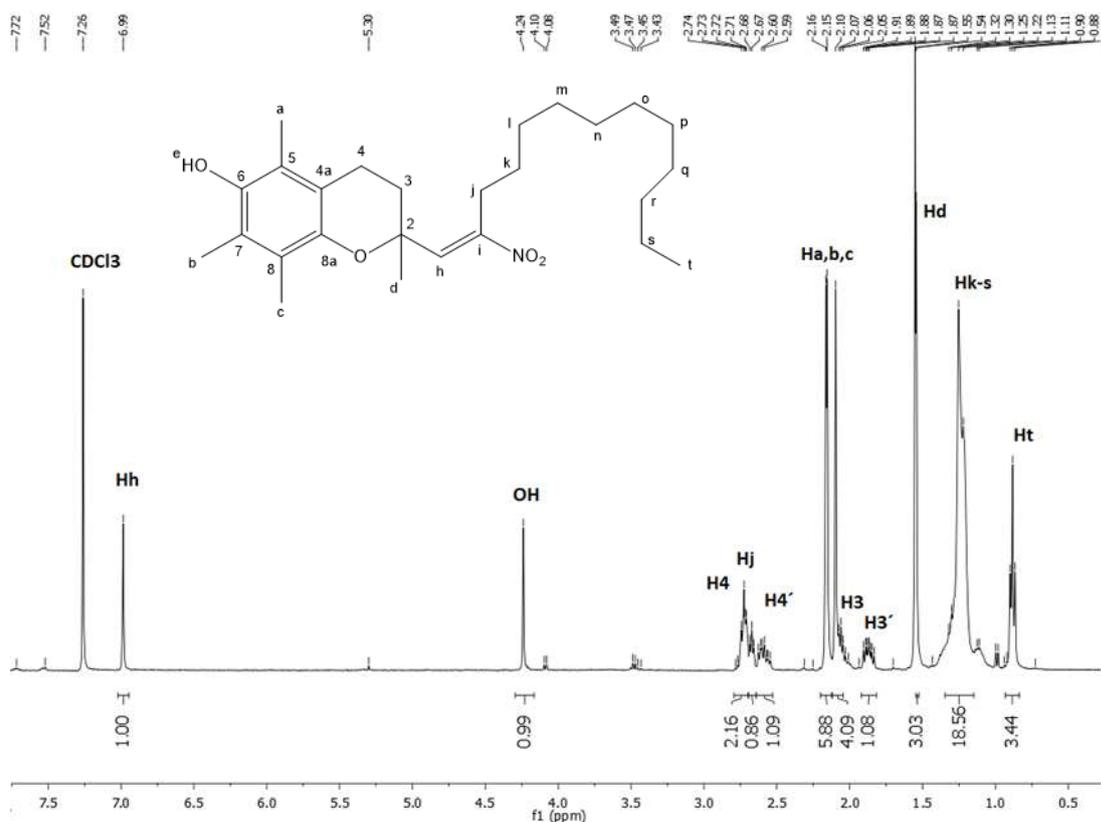


**Esquema 7.11. Obtención de los nitroalquenos 14 (NATx3), 15 (NATx6) y 16 (NATx11).**

En todos los nitroalquenos así obtenidos se identificó la presencia de un único isómero geométrico por análisis de los correspondientes espectros de  $^1\text{H-RMN}$ . A diferencia de **NATx0**, donde la isomería geométrica del compuesto se puede predecir por la constante de acoplamiento entre los protones olefínicos, en el caso de los nitroalquenos de cadena larga hay un solo protón en la funcionalidad nitroalqueno, por lo tanto se necesitó realizar otro tipo de experimento para confirmar la isomería. Para ello, realizamos experimentos de diferencia NOE (efecto nuclear Overhauser), irradiando el protón olefínico de la funcionalidad nitroalqueno. Debido a que no se evidenció efecto espacial sobre los protones metilénicos de la cadena carbonada, pudimos confirmar la presencia del isómero *E* (trans) para los tres nitroalquenos (**NATx3**, **6** y **11**).

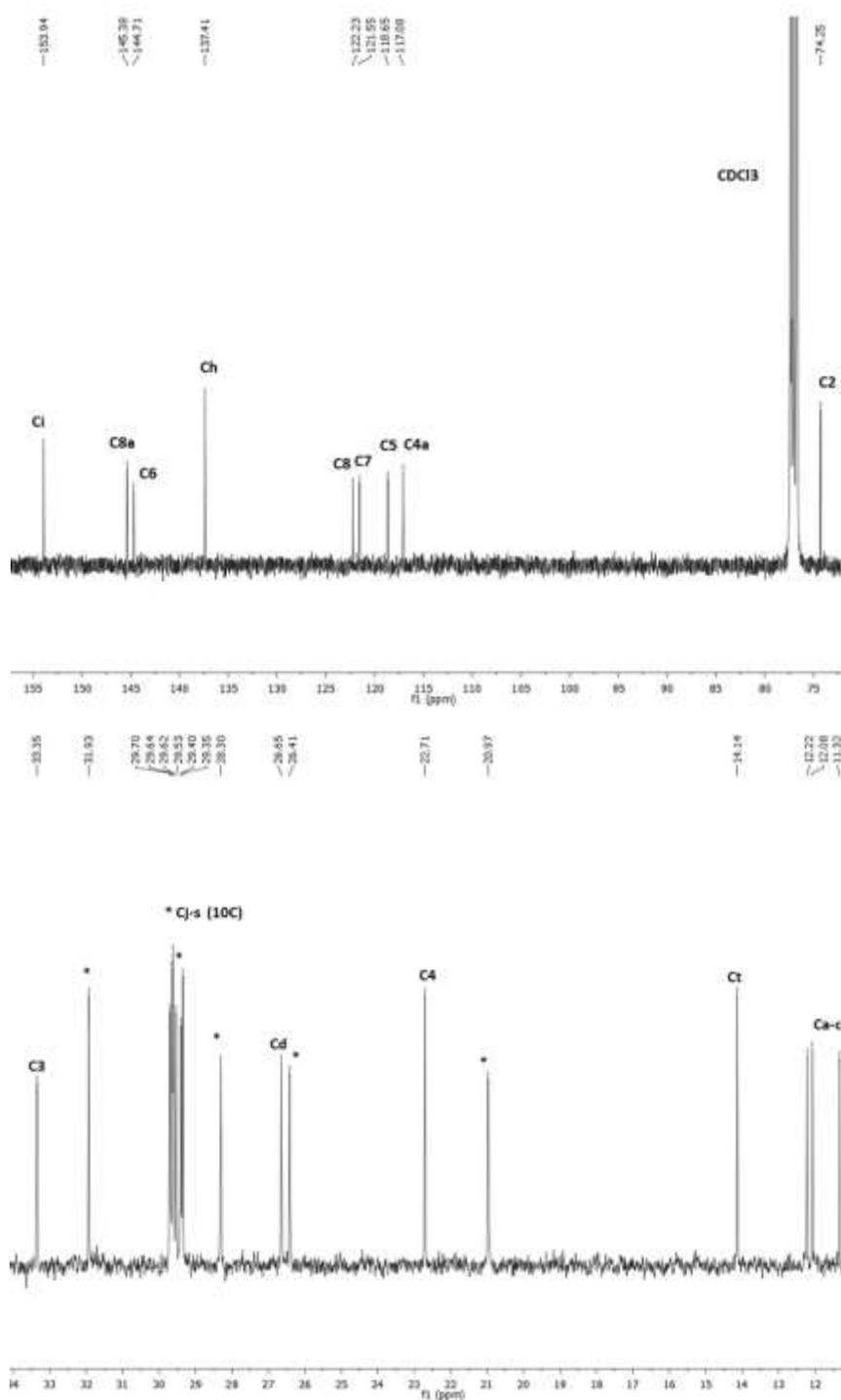
A modo de ejemplo, aquí se presenta el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  obtenido para **NATx11**, el nitroalqueno de cadena más larga (Figura 7.12). En dicho espectro, se identificaron las señales correspondientes a los distintos tipos de protones de la molécula, destacándose un singulete en  $\delta=6.99$  ppm con integración 1H, correspondiente al protón olefínico del nitroalqueno. También se puede observar en  $\delta=1.25$  ppm, un multiplete

correspondiente a las señales de los protones metilénicos de la cadena hidrocarbonada, excepto por el -CH<sub>2</sub> próximo al carbono alfa del nitroalqueno, el cual se encuentra más desapantallado ( $\delta=2.7$  ppm).



**Figura 7.12.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub> obtenido para el derivado **16 (NATx11)**.

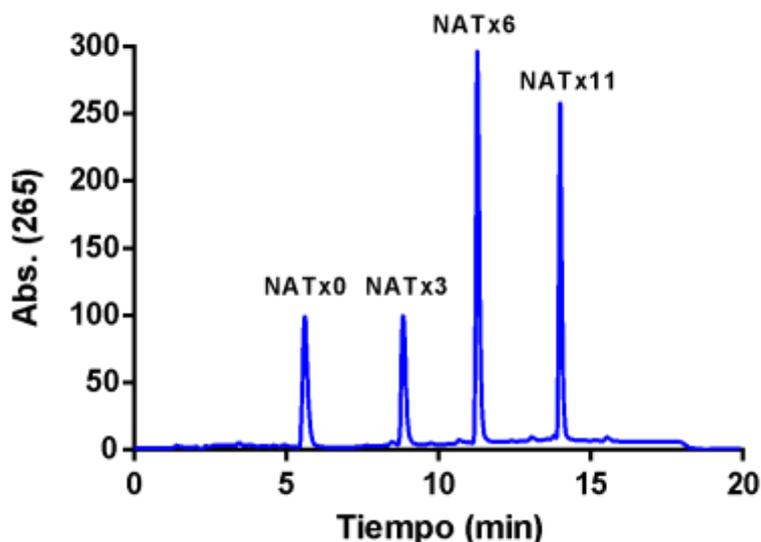
Asimismo, caracterizamos cada una de las señales correspondientes a los carbonos de los compuestos obtenidos mediante experimentos de <sup>13</sup>C-RMN y experimentos de correlación HSQC y HSBC. A modo de ejemplo, se presenta el espectro ampliado de <sup>13</sup>C-RMN obtenido para **NATx11** (Figura 7.13), donde se pueden observar las señales características de los carbonos del grupo nitroalqueno en  $\delta= 153$  y  $137$  ppm, así como también las señales correspondientes a los 11 carbonos de la cadena hidrocarbonada entre  $\delta= 14$ - $31$  ppm.



**Figura 7.13.** Zonas ampliadas del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN obtenido en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto NATx11.

Finalmente, se optimizaron las condiciones para la detección de los diferentes nitroalquenos obtenidos mediante HPLC (Figura 7.14). De este modo, se lograron diferenciar los picos correspondientes a cada compuesto en una columna de fase reversa utilizando un gradiente, obteniendo tiempos de retención escalonados según el número

de carbonos de la cadena hidrocarbonada, donde **NATx0** se retiene menos en la columna por ser menos hidrofóbico y **NATx11** se retiene más (Figura 7.14).



**Figura 7.14.** Cromatograma de HPLC obtenido para **NATx0**, **NATx3**, **NATx6** y **NATx11**. Se utilizó una columna en fase reversa donde los nitroalquenos fueron co-inyectados en 75% de MeOH bajo las siguientes condiciones de corrida: A= H<sub>2</sub>O, B=MeOH; Gradiente: 0-3 min 75% B; 3-10 min 100% B; 10-14 100% B; 14-15 75% B; 15-20 75% B. Flujo: 1.5 mL/min.

Si bien se lograron obtener los diferentes compuestos propuestos, desde un punto de vista cronológico, **NATx0** fue el primer compuesto sintetizado (así como también escalado) y evaluado preliminarmente, lo cual llevó a enfocarnos en el estudio del mismo. Por lo tanto, a partir del siguiente capítulo ahondaremos en la evaluación de **NATx0**, en particular estudiaremos propiedades fisicoquímicas relevantes de la molécula así como también estudiaremos sus efectos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo* en nuestro modelo de interés.

## 7.2 Caracterización fisicoquímica de NATx0.

### 7.2.1 Reactividad de NATx0 frente a nucleófilos modelo.

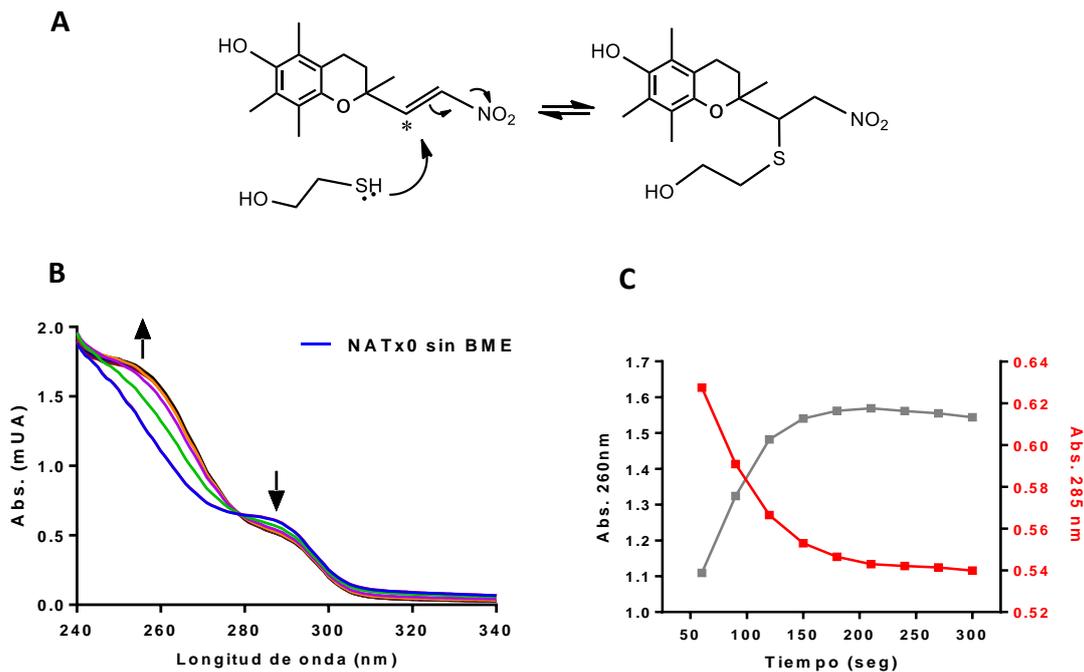
La reactividad de los nitroalquenos es mediada por su reacción con nucleófilos en proteínas, principalmente con los grupos tiol en las mismas. Los tioles presentan un rol fundamental en la señalización, detoxificación y respuesta antioxidante en las células. Son excelentes nucleófilos que reaccionan a través del ataque nucleofílico del tiolato ( $\text{RS}^-$ ) sobre diferentes electrófilos. Los tioles reactivos se encuentran principalmente en las proteínas intracelulares así como también en el glutatión (GSH), el principal tiol de bajo peso molecular en el citosol (2-17 mM) <sup>165,166</sup>. En plasma, la concentración total de tioles es más baja, encontrándose incluso mayoritariamente oxidados, e incluyen a tioles de bajo peso molecular como cisteína y GSH (12-20  $\mu\text{M}$ ) y al tiol en la cisteína 34 en la albúmina sérica humana (600  $\mu\text{M}$ , principalmente en estado reducido) <sup>166</sup>.

Debido a que el grupo nitro es uno de los grupos funcionales más electrón-atrayentes, la conjugación con un alqueno le confiere excelentes propiedades electrofílicas a los nitroalquenos, que pueden reaccionar a través de reacciones de adición de Michael. En medios biológicos, la formación de aductos nitroalquilados de tipo Michael se ha evidenciado en eritrocitos y en plasma humano. Por ejemplo, se han detectado conjugados de GSH con ácidos grasos nitrados en concentraciones del orden nM y también aductos covalentes y reversibles con proteínas como GAPDH <sup>10</sup>. Se demostró que la conjugación de los nitroalquenos con GAPDH aumenta su hidrofobicidad, induciendo su translocación a membranas, indicando la modificación postraduccional de proteínas como un mecanismo de regulación en la función enzimática, señalización celular y tráfico de proteínas <sup>10</sup>. ***Las reacciones de adición de Michael de los nitroalquenos de ácidos grasos son reversibles y cinéticamente rápidas.*** Estas características los diferencian de otros electrófilos endógenos como el aldehído HNE, el cual reacciona más lentamente con nucleófilos, no  $\beta$ -elimina fácilmente y puede formar productos de Schiff irreversibles. En este sentido, la irreversibilidad de las reacciones de Michael en medios biológicos puede producir toxicidad celular <sup>167</sup>.

Tomando en consideración que los mecanismos de acción de los nitroalquenos dependen fundamentalmente de las reacciones de tipo Michael que generen en los medios biológicos, en esta tesis estudiamos la reacción de **NATxO** con dos nucleófilos modelo de bajo peso molecular, ambos conteniendo un grupo tiol reactivo:  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) y GSH.

Las características cinéticas de las reacciones fueron estudiadas mediante espectrofotometría, evaluando los cambios en las propiedades ópticas del nitroalqueno en el tiempo. El espectro de absorción característico de **NATxO** realizado en buffer fosfato reveló la presencia de dos máximos de absorción en aproximadamente 260 y 285 nm, característicos de los dobles enlaces del anillo aromático y de la olefina conjugada con el grupo nitro, respectivamente <sup>157</sup> (Figura 7.15, curva en azul).

Cuando **NATxO** fue incubado en buffer fosfato en presencia de un exceso de BME, se observó un aumento en el máximo de absorción a 260 nm y una disminución en el pico de absorción a 280 nm en el tiempo (Figura 7.15B y C). Esta reacción demuestra que existe la formación de un producto que absorbe principalmente a 260 nm e implica la pérdida del alqueno conjugado al grupo nitro al disminuir la absorbancia a 280 nm (Figura 7.15A). A su vez, presenta un comportamiento espectrofotométrico similar al ejercido por la reacción de ácidos grasos nitrados con nucleófilos <sup>165,168</sup>.



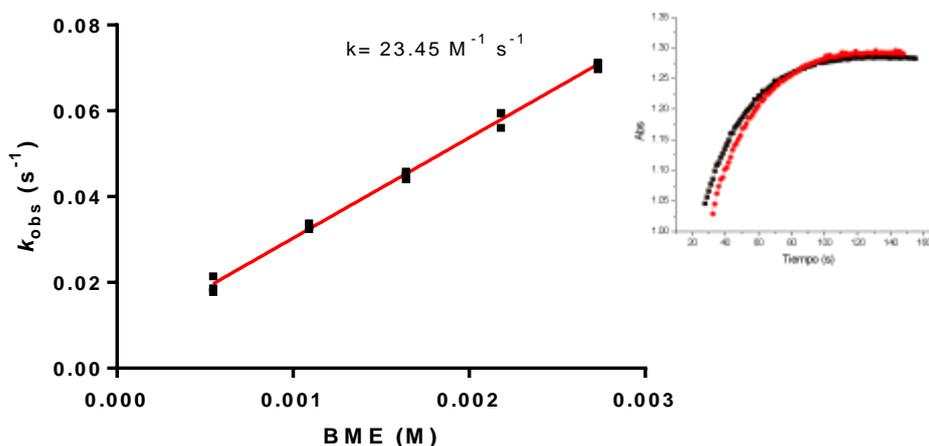
**Figura 7.15. Estudio de la reacción de NATx0 con BME mediante espectrofotometría. A,** Reacción de NATx0 con  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) para dar lugar al producto nitroalquilado correspondiente. **B,** NATx0 (espectro en azul) se incubó con BME en exceso (1 mM) en buffer fosfato 20mM pH 7.4 y se obtuvieron los espectros de absorción durante 5 minutos (cada 60s). **C,** Disminución de la absorbancia a 285 nm y aumento de la absorbancia a 260 nm de NATx0 en un lapso de tiempo luego de reaccionar con BME.

La cinética de reacción entre **NATx0** y BME se estudió mediante mediciones con un accesorio de flujo detenido o “stopped flow”, acoplado a un espectrofotómetro, siguiendo los cambios en la absorbancia a 260 nm en presencia de concentraciones crecientes de BME (0-3 mM) y 25  $\mu$ M de NATx0. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Lucía Turell del Laboratorio de Enzimología de la Facultad de Ciencias, UdelaR.

El equipamiento para “stopped flow” permite estudiar reacciones que ocurren rápidamente, desde milisegundos a minutos, al mezclar los reactivos justo antes de su medición espectrofotométrica. Debido a que BME se encuentra siempre en exceso respecto a **NATx0**, se asume que su concentración se mantiene constante en el tiempo durante la reacción. Por lo tanto, la reacción se considera de pseudo-primer orden y se trata con la ley de velocidad de primer orden, donde:

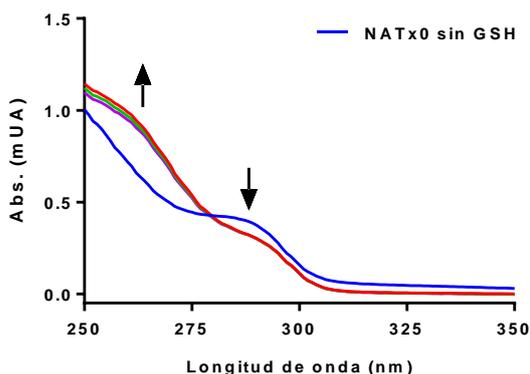
$$k_{\text{obs}} = k_f [\text{NATx0}] + k_r$$

Las constantes aparentes de pseudo-primer orden ( $k_{obs}$ ,  $s^{-1}$ ) a cada concentración de BME fueron extraídas de la ecuación correspondiente al ajuste a una exponencial simple de las curvas obtenidas en un intervalo de tiempo (Inserto, Figura 7.16). Luego, las constantes de pseudo-primer orden fueron graficadas en función de la concentración de BME. El ajuste lineal de la curva obtenida de este gráfico permite obtener la pendiente, la cual corresponde a la constante aparente  $k_f$  de segundo orden, calculada en  $23.45 M^{-1} s^{-1}$  y el intercepto, el cual fue distinto de cero ( $k_r=0.0069 s^{-1}$ ) (Figura 7.16). Un intercepto distinto de cero implica que la reacción es reversible, como era esperado <sup>166</sup>. La determinación de estas constantes de reacción permite la comparación entre reacciones de manera independiente a la concentración de los reactivos <sup>165</sup>.



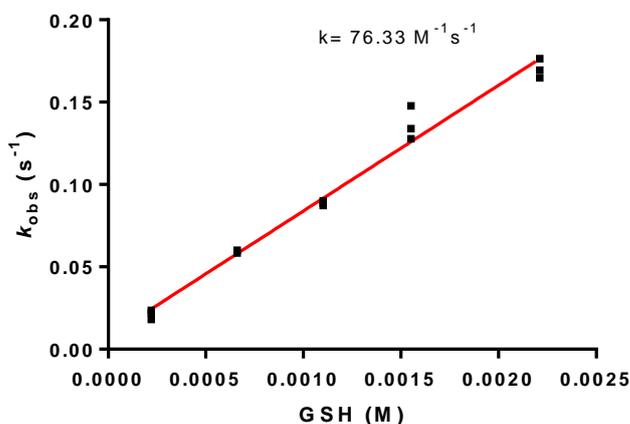
**Figura 7.16.** Estudio de la cinética de reacción de NATx0 con BME utilizando “stopped flow”. Gráfico de segundo orden de la reacción de NATx0 con diferentes concentraciones de BME y cálculo de la constante  $k_f$  (pendiente)=  $23.45 M^{-1} s^{-1}$  y  $k_r$  (intercepto)=  $0.0069 s^{-1}$ .

De la misma manera, se estudió la cinética de reacción de **NATx0** con GSH analizando el espectro de absorción de **NATx0** luego de la incubación con un exceso de GSH, como se muestra en la Figura 7.17. Nuevamente, se observó un cambio en el espectro de absorción, con un aumento de la absorbancia a 260 nm y una disminución en el pico a 280 nm luego de la incubación con el nucleófilo. Sin embargo, se puede observar en el gráfico de la Figura 7.17 que dicha reacción ocurrió más rápidamente a pH 7.4, respecto a BME.



**Figura 7.17.** Estudio de la reacción de NATx0 con GSH mediante espectrofotometría. NATx0 (100  $\mu\text{M}$ , espectro en azul) se incubó con GSH en exceso (2 mM) y se obtuvieron los espectros de absorción durante 5 minutos.

Al estudiar la cinética de la reacción mediante “stopped flow”, utilizando concentraciones crecientes de GSH, se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden de  $76.33 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , indicando que la reacción con GSH es 3 veces más rápida que con BME (Figura 7.18). Esto era esperable ya que el tiol de GSH es más ácido que el tiol de BME y por lo tanto a pH neutro el tiolato de GSH se encuentra más disponible para reaccionar <sup>26</sup>.



**Figura 7.18.** Estudio de la cinética de reacción de NATx0 con GSH utilizando “stopped flow”. Gráfico de segundo orden de la reacción de NATx0 con diferentes concentraciones de GSH y cálculo de la constante  $k_f$  (pendiente) =  $76.33 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $k_r$  (intercepto) =  $0.0076 \text{ s}^{-1}$ .

Si se comparan las velocidades de reacción de **NATx0** con nucleófilos respecto a las reacciones que ejercen otros nitroalquenos, se puede concluir que **NATx0** se comporta

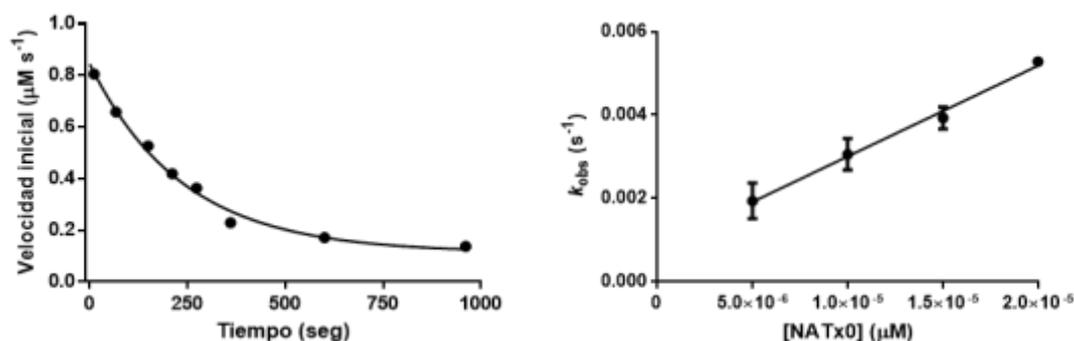
de manera similar a los ácidos grasos nitrados, presentando una constante de segundo orden con GSH similar al ácido nitrooleico ( $64 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) y al ácido nitrolinoleico conjugado ( $34 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), bajo las mismas condiciones. Por otro lado, **NATxO** reacciona más lentamente que **NATxMe**, el cual reacciona con GSH con una constante de  $1370 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y con BME con una constante de  $349 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . **NATxMe** contiene un nitroalqueno aromático que se comporta de manera diferente a los nitrolípidos alifáticos como son los ácidos grasos nitrados y como es el caso de **NATxO**. En el caso de **NATxMe**, el carbono  $\beta$  al grupo nitro es más deficiente en electrones que en los nitroalquenos alifáticos debido al efecto resonante del anillo aromático y por lo tanto dicho carbono es más electrofílico. Siendo que las propiedades biológicas de los nitroalquenos dependen de la adición con nucleófilos “blandos” presentes en las proteínas (tioles en residuos de cisteínas y grupos amino en residuos de histidina y lisina), se podría esperar que **NATxO** reaccione más favorablemente con dichos residuos en comparación a **NATxMe**, el cual podría esperarse que sufra más reacciones no favorables con nucleófilos del tipo “duro”. Sin embargo, **NATxMe** ha demostrado interesantes propiedades *in vitro* tanto antiinflamatorias como citoprotectoras, dependientes de la presencia del grupo nitroalqueno <sup>26</sup>.

### 7.2.2 Inhibición de la enzima GAPDH como nucleófilo modelo en una proteína.

Si bien el estudio de la electrofilia de los nitroalquenos utilizando tioles de bajo peso molecular es una aproximación valiosa para predecir la reactividad de los nitroalquenos, en los medios biológicos la presencia de tioles ionizados en dichos nucleófilos de bajo peso es significativamente dependiente del  $pK_a$  de los mismos, encontrándose en algunos casos solo una pequeña fracción del tiol ionizado a pH fisiológico. Por ejemplo, el tiol de GSH tiene un  $pK_a$  de 8.9, por lo que a pH 7.4 solamente un 2.8% se encuentra ionizado. Sin embargo, el ambiente en el que los tioles se encuentran localizados en proteínas puede modular su nucleofilicidad hacia diferentes sustratos, de manera independiente del  $pK_a$  <sup>10,169</sup>. Por lo tanto, resulta interesante estudiar la reactividad de nuestro nitroalqueno frente a proteínas con residuos nucleófilos de manera de predecir sus potenciales efectos en la modificación postraduccional de proteínas en los medios biológicos. En este sentido, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una

enzima que contiene una cisteína catalítica, sensible a electrófilos, así como también otras cisteínas no catalíticas, y ha sido utilizada como proteína modelo para evaluar la reacción de ácidos grasos nitrados con proteínas <sup>10</sup>. Esta enzima puede formar un tetrámero (dos dímeros) que consiste en subunidades catalíticas idénticas, donde los tioles catalíticos son esenciales para su actividad. Participa en el sexto paso de la glicólisis catalizando la fosforilación oxidativa del D-gliceraldehído 3-fosfato (GAP), dando 1,3-bifosfoglicerato (primer intermediario de alta energía de la glucólisis) utilizando  $\text{NAD}^+$  y fosfato inorgánico.

En esta tesis, utilizamos GAPDH comercial de conejo, la cual contiene una cisteína catalítica (C149) y tres cisteínas no catalíticas (C153, C244, C281) <sup>170</sup>. La reacción de GAPDH con NATx0 fue evaluada luego de inicialmente incubar  $15 \mu\text{M}$  de NATx0 con  $1 \mu\text{M}$  GAPDH en estado reducido. A tiempos crecientes, alícuotas fueron tomadas e incubadas con los sustratos y cofactores necesarios para su función (GAP,  $\text{NAD}^+$ , arsenito de sodio como alternativa al fosfato). Se obtuvieron las velocidades iniciales de formación de NADH a través del cálculo de las pendientes obtenidas a partir de los ajustes lineales de la absorbancias en función del tiempo (Figura 7.19A). Al graficar las velocidades iniciales a cada tiempo se puede observar un comportamiento inhibitorio del tipo exponencial simple, indicando que **NATx0** es capaz de inhibir a la enzima. Para la obtención de las constantes de velocidad de segundo orden ( $k_{\text{obs}}$ ) se incubó la enzima con concentraciones crecientes de **NATx0** ( $5\text{-}20 \mu\text{M}$ ) en las mismas condiciones descritas previamente y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. Del gráfico velocidad vs tiempo se determina una constante  $k_{\text{obs}}$  para cada concentración y se construye el gráfico secundario  $k_{\text{obs}}$  vs **[NATx0]**, obteniéndose la constante de reacción  $k_f$  (pendiente) e intercepto  $k_r$ . La constante de reacción calculada fue de  $219 \pm 24 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , obteniéndose también un intercepto distinto de cero implicando la reversibilidad de la reacción (Figura 7.19B).



**Figura 7.19.** Reacción de NATx0 con GAPDH. **A**, GAPDH reducida (1  $\mu\text{M}$ ) fue incubada con 15  $\mu\text{M}$  de NATx0 (25°C, Tris buffer, 0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA). Durante diferentes tiempos, se tomaron alícuotas (0.1  $\mu\text{M}$ ) las cuales se mezclaron con 0.5 mM GAP, 1 mM  $\text{NAD}^+$  y 15 mM de arsenito de sodio y se midió la formación de NADH a 340 nm. **B**, Gráfico de las constantes  $k_{\text{obs}}$  vs concentraciones crecientes de NATx0 (5 - 20  $\mu\text{M}$ ).

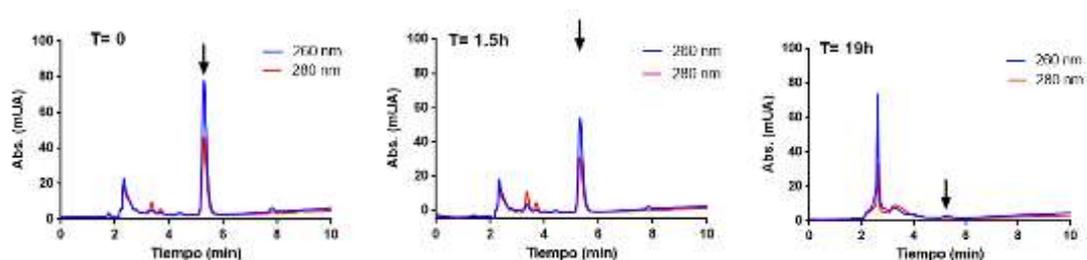
Si se analizan las constantes de reacción entre los distintos tioles estudiados, se puede observar que la reacción de **NATx0** con GAPDH es significativamente más rápida que con BME y GSH (220 vs 23 vs 76  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , respectivamente). El tiol ácido en el sitio activo de la enzima se encuentra cercano a residuos catiónicos, lo cual podría favorecer la estabilización del estado de transición aniónico generado durante la adición del nitroalqueno (ver Figura 3.1) <sup>26</sup>.

### 7.2.3 Estabilidad de NATx0 en buffer fosfato y en plasma.

Como se ha mencionado, los nitroalquenos reaccionan rápidamente con proteínas y moléculas de bajo peso molecular, principalmente presentes en el plasma. Como ejemplo, solo el 6% del ácido  $\text{NO}_2\text{-OA}$  es detectado en la circulación luego de algunos minutos post-inyección intravenosa en ratones, encontrándose un 53% aductado a la albúmina. Sin embargo, se ha detectado la transnitroalquilación del aducto del ácido nitrooleico con albúmina a BME, significando que estas reacciones son en gran medida reversibles <sup>25</sup>. De hecho, se considera que la unión reversible de los nitroalquenos a las proteínas del plasma permite retener de manera temporaria a las moléculas reactivas, para luego ser liberadas de modo de ejercer sus efectos biológicos <sup>25</sup>. Siendo que **NATx0** presentó velocidades de reacción con tioles de bajo peso molecular similares a los

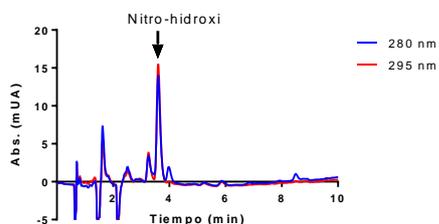
nitroalquenos de ácidos grasos, y que dichas reacciones fueron reversibles, desde este punto de vista podría esperarse que **NATx0** se comporte similarmente a los mismos en la circulación. Sin embargo, como se ha visto, los nitroalquenos de ácidos grasos sufren pasos de metabolización que involucran la saturación del doble enlace y  $\beta$ -oxidación hepática, los cuales no se espera que modifiquen a **NATx0**.

**NATx0** resultó ser estable por aproximadamente 2 horas a 37 °C en buffer fosfato a pH fisiológico, quedando completamente descompuesto a las 19 horas de incubación a 37 °C (Figura 7.20). En este tiempo, se denota la presencia de un pico que presenta el mismo patrón 260/280 de absorción que **NATx0** en aproximadamente  $t = 2.5$  min, el cual podría corresponder a un producto de descomposición más hidrofílico.



**Figura 7.20.** Evaluación mediante HPLC de la estabilidad de NATx0 en buffer fosfato pH 7.4 a 37°C. La flecha marca el pico correspondiente a NATx0.

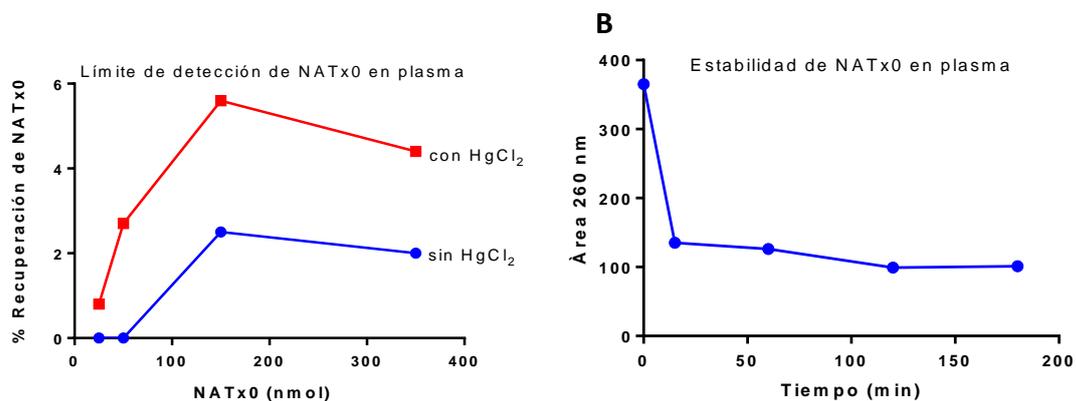
En ese sentido, dicho producto no corresponde al nitrohidroxi-derivado que pudiera haberse formado por reversión del grupo nitroalqueno en el medio acuoso (Figura 7.21), pudiendo corresponder al aldehído que se puede formar por la reacción retroaldólica.



**Figura 7.21.** Cromatograma del producto de la retro-aldólica de NATx0 (nitrohidroxi-derivado) el cual presentó un tiempo de retención de 3.6 min.

Con el objetivo de determinar la estabilidad de **NATxO** en plasma, realizamos un estudio del límite de detección del mismo y de estabilidad mediante HPLC. Para ello, inicialmente incubamos **NATxO** a diferentes concentraciones en plasma humano por 30 min a 37 °C y realizamos la extracción de proteínas con MeOH, luego de una incubación con HgCl<sub>2</sub>. El HgCl<sub>2</sub> se utiliza para detectar en mayor proporción el nitroalqueno libre, no aductado, ya que el Hg reacciona con los tioles libres resultando en la inhibición de reacciones de adición subsecuentes<sup>167</sup>. Se ha reportado que esta técnica puede aumentar la cantidad detectable del nitroalqueno libre de 10 a 20 veces<sup>134</sup>. En la Figura 7.22A, se grafica el porcentaje de recuperación de **NATxO** a cada concentración respecto al área obtenida para el pico de HPLC correspondiente al compuesto disuelto en buffer fosfato, luego de realizar el mismo procedimiento de extracción. En dicho gráfico, se puede observar que la detección de **NATxO** aumenta aproximadamente 3 veces para todos los puntos en presencia de HgCl<sub>2</sub>. El pico de **NATxO** es detectable a partir de 50 nmol en presencia de HgCl<sub>2</sub> y a partir de aproximadamente 100 nmol sin HgCl<sub>2</sub>.

Posteriormente, estudiamos la estabilidad de **NATxO** a 37 °C en el plasma a diferentes tiempos (15 min, 1 h, 2 h y 3 h) luego de la incubación con HgCl<sub>2</sub>. Las áreas del pico de HPLC a 260 nm correspondientes a **NATxO** fueron obtenidas para cada tiempo, demostrando que la molécula es estable por lo menos hasta las 3 horas de incubación en plasma (Figura 7.22B). A su vez, en dicho gráfico podemos observar que existe una fracción de **NATxO** no detectable, que es esperable que se encuentre aductada a las proteínas del plasma.



**Figura 7.22.** Evaluación del límite de detección y la estabilidad de NATx0 en plasma mediante HPLC. **A**, Diferentes concentraciones de NATx0 (50, 75, 150, 350 nmol) fueron incubadas con plasma durante 30 min a 37°C. Luego, una cantidad de plasma fue incubado con HgCl<sub>2</sub> (20 mM final) por 30 min a 37°C y se realizó una extracción con MeOH frío. Lo mismo se realizó previo a la incubación con HgCl<sub>2</sub> para evaluar la cantidad de compuesto libre (no aductado). El porcentaje de recuperación se calculó de acuerdo a una inyección estándar de 50 nmol de NATx0 en buffer, utilizando el mismo procedimiento de extracción. **B**, NATx0 (50 nmol) fue incubado en plasma a 37°C a diferentes tiempos (15 min, 1h, 2h y 3h). Luego de cada tiempo, se toma una fracción, se realiza una extracción con MeOH y luego se añade HgCl<sub>2</sub> (20 mM). Luego de 30 min de incubación con HgCl<sub>2</sub> a 37°C se realiza otra extracción con MeOH y se inyecta en HPLC. Como control (T=0), se preparan 50 nmol de NATx0 en buffer fosfato. Se toma una fracción y se realiza una extracción con MeOH.

En suma, mediante estos ensayos pudimos determinar la capacidad electrofílica de **NATx0** frente a nucleófilos modelo y frente a una enzima que contiene un tiol catalítico, demostrando también que **NATx0** se puede encontrar parcialmente aductado en plasma y que la fracción no aductada es estable por un periodo de tiempo significativo.

En la siguiente sección, estudiaremos los efectos biológicos *in vitro* de **NATx0** en macrófagos como potencial molécula antiinflamatoria y citoprotectora.

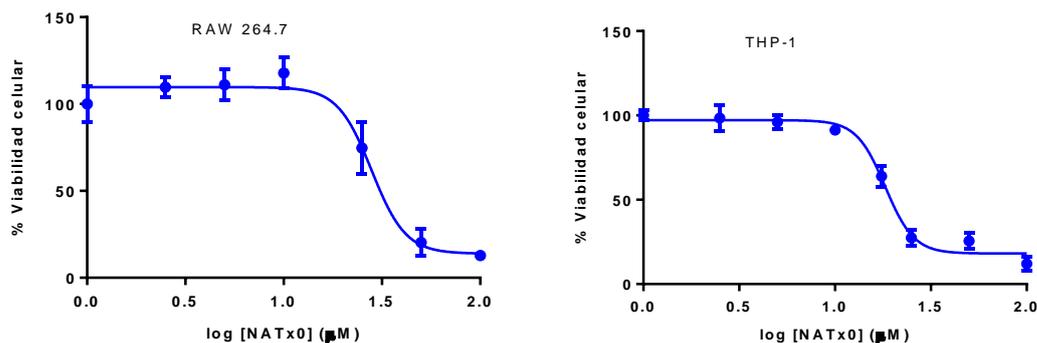
## 7.3 Evaluación de los efectos biológicos *in vitro* de NATxO.

### 7.3.1 Estudio de la citotoxicidad en macrófagos.

Con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de **NATxO** en prevenir la inflamación, realizamos experimentos *in vitro* para medir la respuesta inflamatoria en macrófagos. Como ya se ha mencionado, los estados de activación de los macrófagos están directamente relacionados con la respuesta inmune que contribuye al desarrollo del síndrome metabólico durante la obesidad.

Inicialmente, evaluamos la toxicidad *in vitro* de **NATxO** en dos líneas celulares de macrófagos tanto humanas (THP-1) como murinas (Raw 264.7) usadas para el resto de los ensayos. THP-1 es una línea celular monocítica humana derivada de cáncer de leucemia monocítico agudo, la cual se ha utilizado ampliamente para estudiar la función y regulación de monocitos y macrófagos, siendo que los monocitos pueden ser diferenciados a macrófagos *in vitro* utilizando forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), entre otros estímulos. Las células THP-1 diferenciadas adquieren un fenotipo característico de los macrófagos, los cuales se comportan como macrófagos primarios humanos en diferentes aspectos<sup>171</sup>. Los macrófagos Raw 264.7 son células derivadas de tumor murino de Leucemia inducido por virus y es una línea celular comúnmente utilizada para estudiar las respuestas celulares frente a microorganismos.

En nuestros experimentos, células THP-1 y Raw 264.7 fueron tratadas con concentraciones crecientes de **NATxO** por 24 h dando por resultado concentraciones de IC<sub>50</sub> (concentración que inhibe al 50% la viabilidad celular) de  $17.7 \pm 0.85$  y  $25.0 \pm 4.4$ , respectivamente, mediante la técnica de MTT (Figura 7.23). Estas concentraciones son del orden de otros nitroalquenos derivados de la vitamina E ( $24.7 \mu\text{M}$  **NATxMe** en Raw 264.7)<sup>26</sup>.



**Figura 7.23.** Citotoxicidad de NATx0 en macrófagos. Macrófagos Raw 264.7 fueron tratados con concentraciones crecientes de **NATx0** (0, 2.5, 5, 10, 25, 50 and 100 µM) por 24h. Los monocitos THP-1 fueron diferenciados a macrófagos con PMA por 48h y luego tratados NATx0 por 24h. Luego se realizó el ensayo de MTT y se calcularon los IC<sub>50</sub> correspondientes. Los gráficos son representativos de 3 experimentos independientes. IC<sub>50</sub> Raw = **25.0 ± 4.4**; IC<sub>50</sub> THP-1: **17.7 µM ± 0.85**. El control correspondiente al 100% de viabilidad contiene el vehículo utilizado (DMSO).

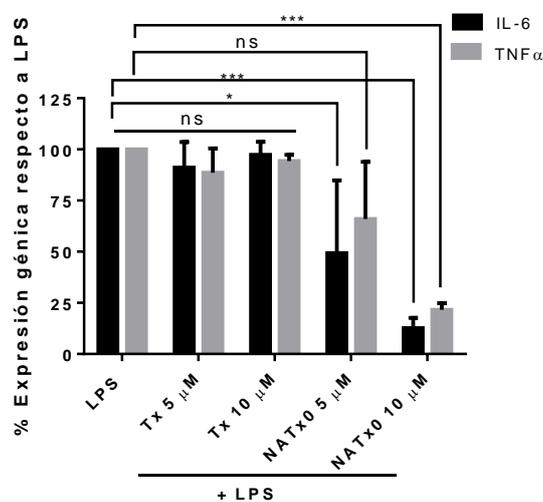
Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en estos experimentos nos permitieron seleccionar el rango de concentraciones adecuado a utilizar en los experimentos *in vitro*.

### 7.3.2 Estudio de la inhibición de NF-κB en macrófagos.

Uno de los objetivos principales de esta tesis fue evaluar las propiedades antiinflamatorias de **NATx0**, principalmente mediante el estudio de la inhibición de NF-κB. Como se ha mencionado, la activación crónica de NF-κB está directamente relacionada con el desarrollo del síndrome metabólico durante la obesidad.

Para evaluar el efecto de **NATx0** sobre ésta vía, inicialmente evaluamos la expresión a nivel del ARNm de citoquinas proinflamatorias mediante un estímulo con LPS de 3 h en macrófagos THP-1, luego de un pretratamiento con el compuesto de 2 h. De esta manera, esperábamos modular la transcripción de genes relacionados a proteínas inflamatorias mediante la modificación de NF-κB, previo a su activación. En estos ensayos, pudimos observar un aumento significativo en la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF-α luego del tratamiento con LPS. Dicha expresión se mantuvo luego de una preincubación con el precursor sin el grupo nitroalqueno, Trolox (**Tx**), en presencia de LPS. Sin embargo, la preincubación con **NATx0** en las mismas concentraciones (5 y 10

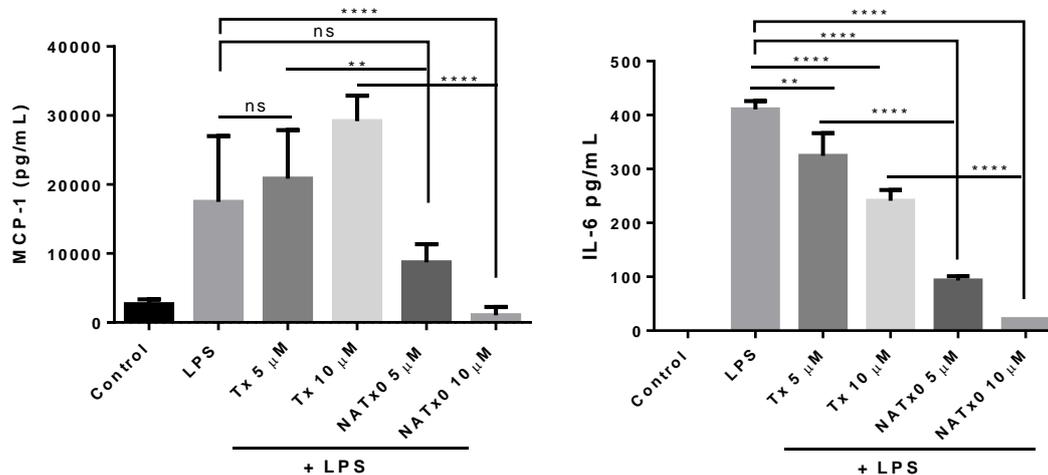
$\mu\text{M}$ ) permitió una inhibición estadísticamente significativa respecto al control tratado con LPS de ambas citoquinas (Figura 7.24).



**Figura 7.24.** Expresión génica de citoquinas proinflamatorias en macrófagos estimulados con LPS y tratados con NATx0. Macrófagos THP-1 fueron incubados con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de **NATx0** o **Tx** durante 2 h y luego tratados con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 3 h. La expresión génica de IL-6 y TNF- $\alpha$  se analizó mediante qPCR. Test estadístico: ANOVA de dos vías con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): IL-6: LPS vs Tx 5  $\mu\text{M}$  ns = 0.9796; LPS vs Tx 10  $\mu\text{M}$  ns >0.999; LPS vs NATx0 5  $\mu\text{M}$  \* = 0.0186; LPS vs NATx0 10  $\mu\text{M}$  \*\*\* = 0.0002. TNF- $\alpha$ : LPS vs Tx 5  $\mu\text{M}$  ns = 0.9454; LPS vs Tx 10  $\mu\text{M}$  ns = 0.998; LPS vs NATx0 5  $\mu\text{M}$  ns = 0.1522; LPS vs NATx0 10  $\mu\text{M}$  \*\*\* = 0.0005. Se realizaron 2 o 3 réplicas independientes.

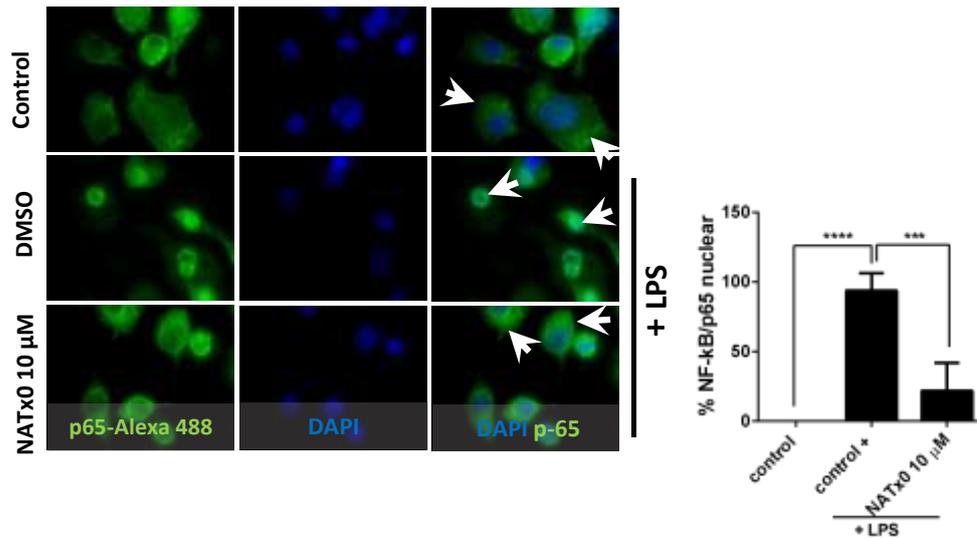
De la misma manera, se analizó la cantidad de citoquinas presentes en los sobrenadantes celulares mediante ELISA luego de un pretratamiento de 2 h seguido de un estímulo de LPS de 16 h. En este caso, se observó nuevamente un aumento en la cantidad de MCP-1 e IL-6 en presencia del estímulo LPS y una disminución estadísticamente significativa luego de una preincubación con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de **NATx0** (Figura 7.25). Cuando se incubó con Trolox, no se observaron diferencias significativas para MCP-1 respecto al control con LPS, sí encontrándose diferencias significativas cuando se evaluó el efecto de Trolox sobre la expresión de IL-6. Este resultado parece no ser concordante con la expresión del mensajero de IL-6 en los macrófagos humanos (Figura 7.24, IL-6), que como se demostró previamente no parece estar alterada en presencia de Trolox en las mismas concentraciones testeadas. Sin embargo, el efecto de **NATx0** sobre la inhibición de la

liberación de IL-6 es más pronunciado que en el caso del Trolox demostrando que la presencia del grupo nitroalquenilo promueve un efecto mayor inhibiendo la activación de NF-κB.



**Figura 7.25.** Liberación de citoquinas proinflamatorias en macrófagos estimulados con LPS y tratados con NATx0. Macrófagos murinos Raw 264.7 fueron incubados con **NATx0**, Tx (5 y 10 μM) o vehículo durante 2 h y luego fueron tratados con LPS (1 μg/mL) por 16 h. La concentración de IL-6 y MCP-1 liberadas al sobrenadante se evaluó mediante ELISA. En el control no hay tratamiento de las células. Test estadístico: ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple) IL-6: LPS vs Tx 5 μM \*\* = 0.0032; LPS vs Tx 10 μM \*\*\*\* < 0.0001; LPS vs NATx0 5 μM \*\*\*\* < 0.0001; LPS vs NATx0 10 μM \*\*\*\* < 0.0001. TNFα: LPS vs Tx 5 μM ns > 0.999; LPS vs Tx 10 μM \*\* = 0.0076; LPS vs NATx0 5 μM ns 0.1002; LPS vs NATx0 10 μM \*\*\*\* < 0.0001. Se realizaron 2 o 3 réplicas independientes.

Por otro lado, nos propusimos estudiar el efecto de **NATx0** sobre la translocación de NF-κB al núcleo en los macrófagos THP-1 mediante inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo para la subunidad p65 de NF-κB y un anticuerpo secundario correspondiente marcado con Alexa 488 (Figura 7.26). Para ello, los macrófagos THP-1 fueron tratados durante 2 h con **NATx0** o DMSO previo a un tratamiento con LPS de 30 min. En la Figura 7.26, se observa en la condición control a la subunidad p65, representada en verde, distribuida principalmente en el citoplasma apreciándose que los núcleos no presentan marca verde.

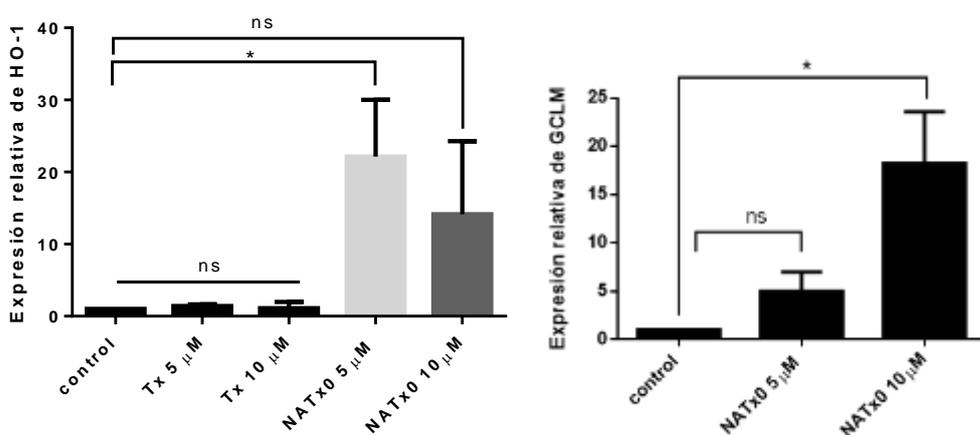


**Figura 7.26.** Estudio de la translocación celular de la subunidad p65 de NF-κB en macrófagos THP-1 tratados con NATx0. Los macrófagos fueron incubados con NATx0 (10 μM) o vehículo por 2 h y luego fueron activados con 1 μg/mL de LPS o PBS (control) durante 30 min. Se utilizó un anticuerpo anti-p65/RelA y un secundario conjugado con Alexa Flúor 488 (en verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas señalan la localización nuclear o citoplasmática de la subunidad p65/RelA. En el gráfico se muestra el porcentaje de la cuantificación de la señal nuclear para cada caso. Test estadístico: ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \*\*\*\* < 0.0001; \*\*\* = 0.0002. Se realizaron 2 réplicas independientes.

Cuando las células fueron tratadas con LPS, se encontró la marca de p65 concentrada principalmente en los núcleos (condición DMSO+LPS), mientras que las células que fueron tratadas previamente con **NATx0** presentaron una disminución de la presencia de p65 en el núcleo, encontrándose principalmente distribuida a nivel del citoplasma (Figura 7.26, condición **NATx0** 10 μM +LPS). El porcentaje de p65 a nivel nuclear respecto al total de células en el campo de imagen en cada caso fue calculado, obteniéndose diferencias significativas entre la condición DMSO+LPS vs. NATx0+LPS (Figura 7.26, Gráfico).

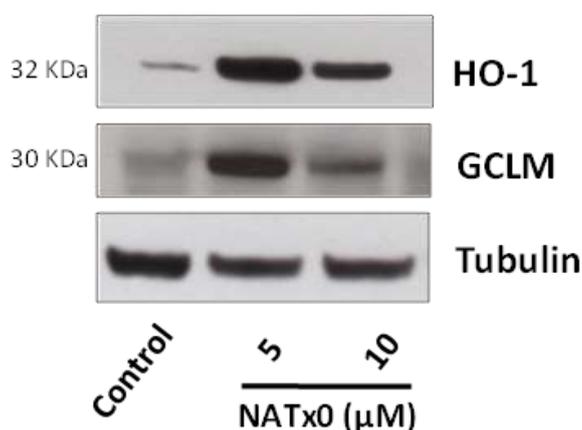
### 7.3.3 Estudio de la activación del sistema Nrf2/keap1.

Por otro lado, nos propusimos estudiar el efecto de **NATx0** sobre el sistema Nrf2/keap1 en macrófagos. Para ello, inicialmente evaluamos la expresión génica de las enzimas detoxificantes HO-1 y GCLM, las cuales se expresan en las células como respuesta al estrés oxidativo a través de la inducción del elemento de respuesta antioxidante ARE mediada por Nrf2. La incubación de macrófagos THP-1 con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de **NATx0** por 5 h provocó una expresión del ARNm de HO-1, evaluada mediante qPCR. En cambio, cuando se incubaron los macrófagos con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de Trolox no se observaron diferencias significativas respecto al control con DMSO (Figura 7.27). Estos resultados refuerzan nuevamente al grupo nitroalqueno como el responsable de ejercer los efectos antiinflamatorios y citoprotectores de **NATx0**. El ARNm de la enzima GCLM también se encontró expresado cuando los macrófagos fueron incubados con **NATx0** encontrándose diferencias significativas a 10  $\mu\text{M}$  respecto al control.



**Figura 7.27.** Estudio de la expresión génica de enzimas dependientes del sistema Nrf2/keap1 en macrófagos tratados con NATx0. La expresión génica de HO-1 y GCLM luego de 5 h de incubación con NATx0 o Tx (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) en macrófagos THP-1 se estudió mediante qPCR. Test estadístico: ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): HO-1: Control vs Tx 5 and 10  $\mu\text{M}$  ns > 0.999; Control vs NATx0 5  $\mu\text{M}$  \* = 0.010; Control vs NATx0 10  $\mu\text{M}$  ns = 0.1979; Tx 5  $\mu\text{M}$  vs NATx0 5  $\mu\text{M}$  < 0.0001; Tx 10  $\mu\text{M}$  vs NATx0 10  $\mu\text{M}$  < 0.0001. GCLM: Control vs NATx0 5  $\mu\text{M}$  ns = 0.92; Control vs NATx0 10  $\mu\text{M}$  \* = 0.041; NATx0 5 vs NATx0 10  $\mu\text{M}$  ns = 0.084. Se realizaron 3 réplicas independientes para HO-1 y 2 para GCLM.

Cuando evaluamos la expresión proteica de HO-1 y GCLM mediante western blot pudimos observar un aumento de ambas proteínas en presencia de **NATx0**, respecto al control (Figura 7.28). Estos ensayos fueron realizados incubando los macrófagos Raw 264.7 durante 5 h con **NATx0** o vehículo (control). En la Figura 7.28, se puede observar que la expresión proteica de HO-1 y GCLM aumenta ampliamente en presencia de **NATx0** a 5  $\mu$ M, y es menor a 10  $\mu$ M para ambas proteínas.



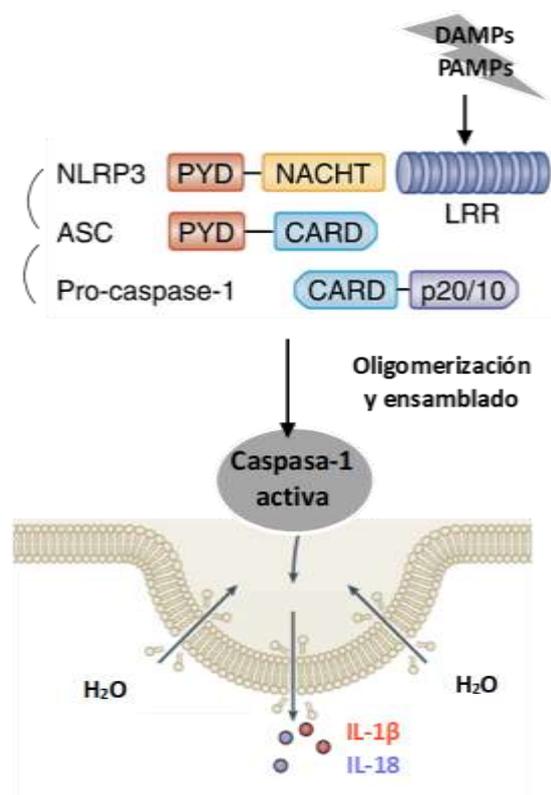
**Figura 7.28.** Expresión proteica de HO-1 y GCLM. Análisis por western blot de HO-1 y GCLM luego de 5 h de incubación con NATx0 (5 y 10  $\mu$ M).

El mismo efecto se observó con la expresión del mensajero de HO-1 pero no con el mensajero de GCLM en los macrófagos THP-1 (Figura 7.27), lo cual podría deberse a una interacción/estabilidad diferencial del compuesto a una mayor concentración en los diferentes macrófagos.

#### 7.3.4 Estudio de la inhibición del inflamasoma NLRP3.

Evidencias recientes apuntan a que la activación crónica de NLRP3, en conjunto con otros procesos inflamatorios, genera una inflamación crónica sistémica de bajo ruido que contribuye en el desarrollo de la diabetes de tipo 2, aterosclerosis y cáncer, entre otras patologías<sup>88,90</sup>. La proteína citosólica NLRP3 puede reconocer diferentes señales de daño de manera directa o indirecta a través de su dominio LRR provocando su oligomerización a través del dominio NOD (Figura 7.29). Luego de que NLRP3 oligomeriza puede reclutar a la proteína adaptadora ASC a través de interacciones PYD-PYD lo cual a su vez provoca

que ASC oligomerice y reclute a pro-caspasa-1 a través de interacciones CARD-CARD. Finalmente, pro-caspasa-1 se cliva de manera autoproteolítica a caspasa-1 activa la cual puede clivar a proIL-1 $\beta$  y proIL-18 hacia sus formas activas. La liberación de las citoquinas maduras hacia fuera de las células puede darse a través de poros en las membranas formados por gasdermina D, los cuales a su vez se generan como consecuencia de la formación y activación del inflamasoma <sup>172,173</sup>. Además, como consecuencia de esto se desencadena un tipo de muerte celular programada dependiente de caspasa-1, conocida como piroptosis. Esta muerte se caracteriza por ser lítica, con ruptura de membrana y fragmentación del ADN, con liberación de mediadores inflamatorios incluyendo las citoquinas mencionadas así como también de señales de daño (Figura 7.29).



**Figura 7.29.** Interacción de los diferentes componentes del inflamasoma NLRP3 luego de su activación por PAMPs o DAMPs que producen la activación de caspasa-1 y liberación de citoquinas proinflamatorias.

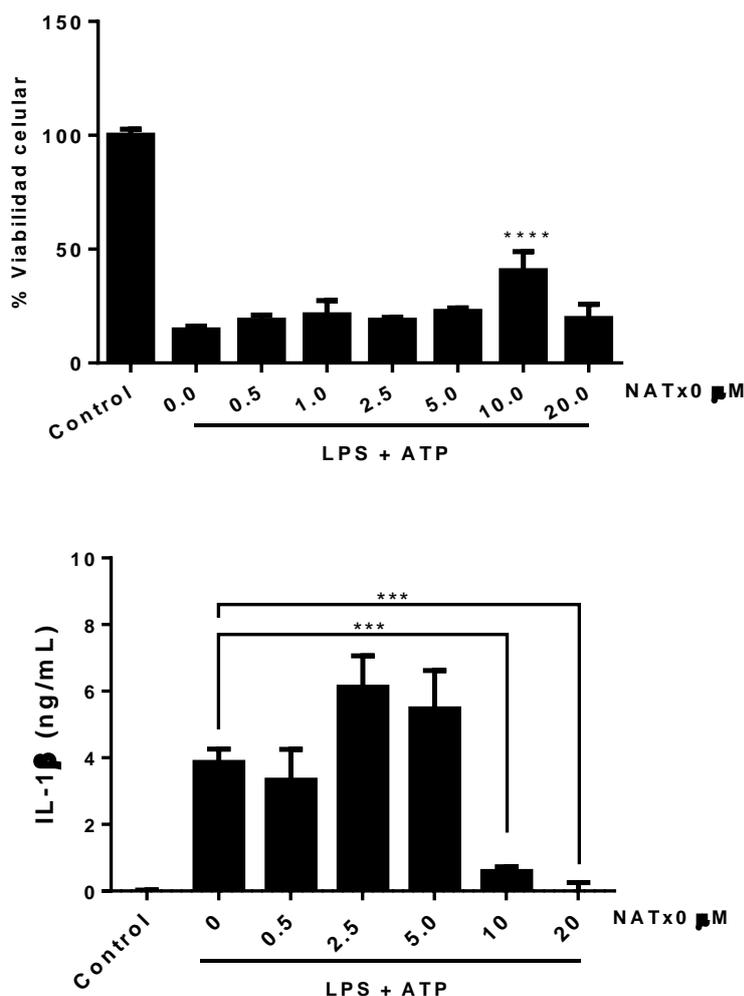
Uno de los objetivos principales de esta tesis fue evaluar la capacidad de **NATxO** de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 ya sea durante la etapa de “priming”, donde ocurre la activación de NF- $\kappa$ B a través del reconocimiento de los TLR de una señal de daño, así como también durante la posterior etapa del ensamblado del complejo, dependiente a su vez de una segunda señal. De esta manera, las dos etapas del proceso de formación del inflamasoma NLRP3 se conocen como “primera señal” y “segunda señal”, y así serán nombrados en la presente tesis. Siendo que ambas etapas conllevan a la activación de NLRP3 nos propusimos estudiar la capacidad de **NATxO** de inhibir su activación durante la primera y segunda señal.

En todos nuestros experimentos *in vitro*, la activación del inflamasoma consistió en la misma estrategia: macrófagos THP-1 fueron incubados con un lipopolisacárido (LPS) por 3 h (primera señal) seguido de la incubación con adenosin-trifosfato (ATP) por 45 min (segunda señal). Esta estrategia de activación está altamente validada en la literatura donde se describe la activación de NLRP3 en diferentes líneas celulares así como también en cultivos primarios, por ejemplo en macrófagos derivados de médula ósea. Las señales de peligro bacterianas, como el LPS, se unen a los receptores TLR/IL-1R promoviendo la ubiquitinación del dominio regulador NEMO del complejo IKK, lo cual activa IKK e inhibe I $\kappa$ B que se encuentra inhibiendo a NF- $\kappa$ B. Esto permite la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo provocando la transcripción de proteínas incluyendo NLRP3 y pro-IL1 $\beta$  <sup>174</sup>. El ATP extracelular es un componente de tipo DAMP que induce el ensamblaje de NLRP3 señalizando a través de los receptores/canales purinérgicos P2X7 presentes en las membranas celulares. Estos canales son selectivos para cationes monovalentes y divalentes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) y su apertura induce el flujo de iones a través de las membranas plasmáticas, donde el Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> entran y el K<sup>+</sup> sale. Esto provoca que el canal se ensanche permitiendo el flujo transmembrana de moléculas pequeñas hidrofílicas, como el ATP, con una masa molecular de aproximadamente 900 Da <sup>175,176</sup>. El mecanismo por el cual el ATP induce un cambio conformacional de NLRP3 es todavía objeto de estudio.

En estos experimentos, DMSO (vehículo) o **NATxO** fueron agregados en conjunto con el LPS o con el ATP (ver metodología 6.2). A continuación, se colectaron los sobrenadantes celulares para su posterior análisis (medición de la liberación de factores proinflamatorios y señales de daño) y las células se utilizaron para la evaluación de la

viabilidad celular o para el análisis de la activación del inflamasoma mediante western blot.

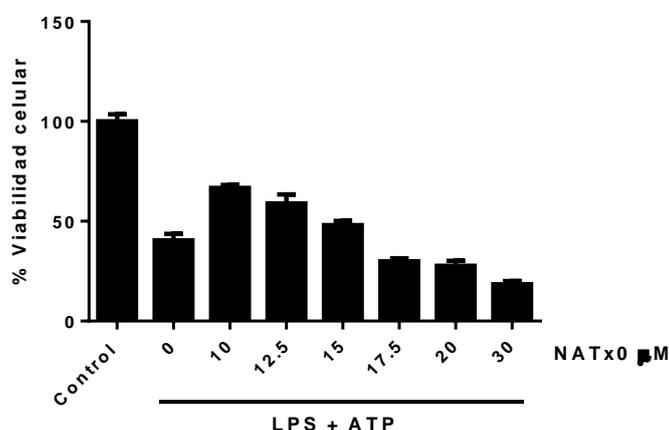
La viabilidad celular luego de los tratamientos se evaluó mediante la técnica colorimétrica de MTT. El grupo de células que no recibieron tratamiento corresponde al grupo control en los gráficos (ver Figuras 7.30 y 7.32) y su valor de absorbancia representó el 100% de viabilidad. Inicialmente, evaluamos la viabilidad celular y liberación de IL-1 $\beta$  cuando **NATxO** fue aplicado en la primera señal (Figura 7.30). Luego del tratamiento con LPS+DMSO/ATP (condición 0  $\mu$ M) se puede observar una disminución de aproximadamente el 80% de la viabilidad celular, indicando la activación de un mecanismo de muerte celular. Cuando **NATxO** fue administrado a concentraciones crecientes (0-20  $\mu$ M) junto con el LPS (LPS+**NATxO**/ATP), no se observó una toxicidad asociada al compuesto e incluso se evidenció un efecto protector a 10  $\mu$ M. Aún más, cuando evaluamos la liberación de IL-1 $\beta$  mediante ELISA pudimos observar un aumento en la concentración de IL-1 $\beta$  en la condición con LPS+DMSO/ATP y una disminución significativa en presencia de **NATxO** a 10 y 20  $\mu$ M, con un IC<sub>50</sub> calculado de 8.8  $\mu$ M (Figura 7.30, gráfico de abajo). Siendo que previamente pudimos determinar que **NATxO** inhibe la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y considerando que la transcripción de IL-1 $\beta$  es dependiente de NF- $\kappa$ B, el efecto inhibitorio observado cuando **NATxO** fue aplicado junto con la primera señal era esperado. En la condición de **NATxO** 20  $\mu$ M se obtuvo una concentración de IL-1 $\beta$  casi de 0 aunque la protección celular obtenida no fue significativa respecto al control con DMSO.



**Figura 7.30.** Modulación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos cuando NATx0 es aplicado durante la primera señal. **Gráfico arriba:** Porcentaje de viabilidad celular calculado por MTT luego de la activación del inflamasoma NLRP3 aplicando NATx0 durante la primera señal. ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \*\*\*\* < 0.0001. **Gráfico abajo:** Concentración de IL-1β en los sobrenadantes celulares calculada por ELISA luego de la activación del inflamasoma NLRP3 aplicando NATx0 durante la primera señal. ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \*\*\*= 0.001 0 vs. 10 μM NATx0; \*\*\* 0.0002 0 vs. 20 μM NATx0. El control se refiere a células que no recibieron tratamientos, mientras que la concentración 0 μM se refiere a células que recibieron 0.5 % DMSO+LPS/ATP (%DMSO máximo utilizado en los ensayos). Se realizaron al menos 3 réplicas independientes.

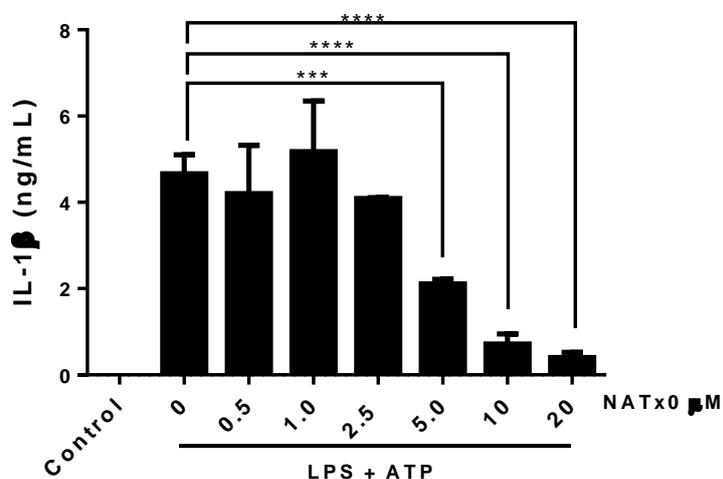
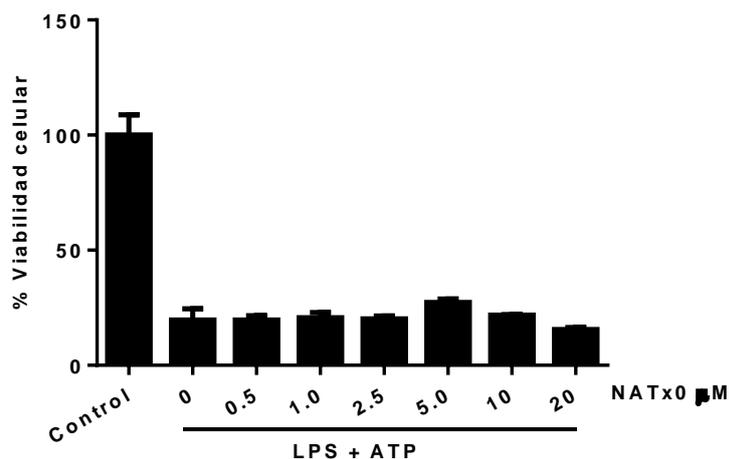
Esto consideramos que puede deberse a un efecto tóxico de **NATx0** a dicha concentración que contrarresta los efectos protectores, provocando una disminución en el número de células al final del ensayo y por lo tanto provocando una medida de

concentración IL-1 $\beta$  más baja. El efecto de toxicidad de **NATx0** aplicado junto con la primera señal fue evidenciado cuando se utilizaron concentraciones crecientes de **NATx0** superiores a 10  $\mu$ M (Figura 7.31).



**Figura 7.31.** Efecto de la toxicidad de NATx0 a concentraciones superiores a 10  $\mu$ M cuando es aplicado durante la primera señal del inflammasoma. Este experimento fue realizado 1 vez.

Cuando **NATx0** fue administrado en concentraciones crecientes junto con la segunda señal (LPS/ATP+NATx0), donde la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B ya fue establecida, no se observaron efectos protectores en la viabilidad celular ni efectos de toxicidad asociados al compuesto (Figura 7.32, gráfico de arriba). Sin embargo, encontramos una inhibición de la liberación de IL-1 $\beta$  por parte de **NATx0** aún mayor que cuando fue aplicado en la primera señal, con un IC<sub>50</sub> calculado de 6.1  $\mu$ M (Figura 7.32, gráfico de abajo). Estos resultados nos demostraron que **NATx0** es capaz de inhibir el inflammasoma NLRP3 a concentraciones de entre 5 y 10  $\mu$ M en macrófagos *in vitro*, inhibiendo la activación de NF- $\kappa$ B así como también el paso de ensamblaje del inflammasoma. Siendo que el efecto de **NATx0** fue más pronunciado durante la segunda señal, incluso siendo incubado a un tiempo más corto (IC<sub>50</sub> 1° señal: 8.8  $\mu$ M, 3 h incubación vs. IC<sub>50</sub> 2° señal: 6.1  $\mu$ M, 45 min incubación) nos propusimos estudiar de qué manera **NATx0** es capaz de modular dichos efectos.



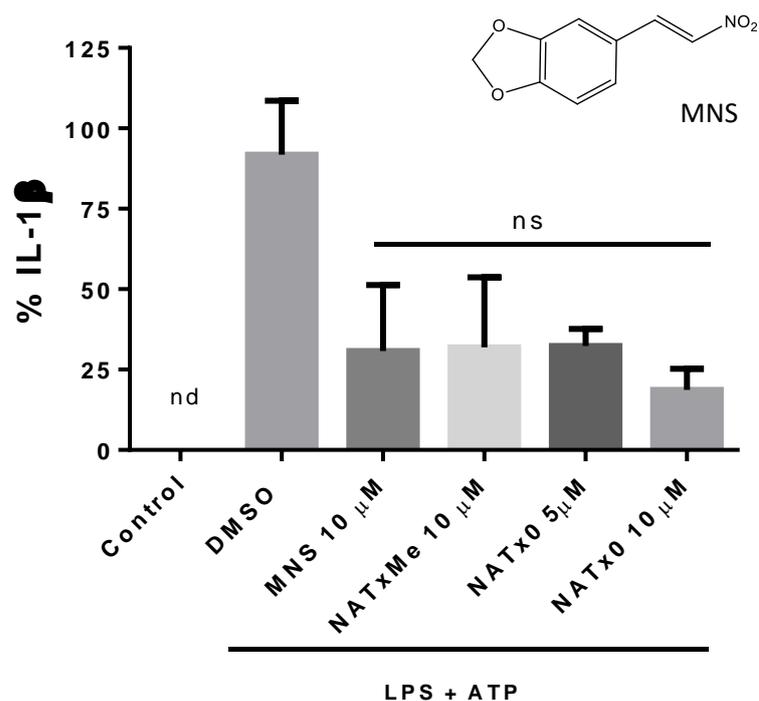
**7.32.** Modulación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos cuando NATx0 es aplicado durante la segunda señal. **Gráfico arriba:** Porcentaje de viabilidad celular calculado por MTT luego de la activación del inflamasoma NLRP3 aplicando NATx0 durante la segunda señal. **Gráfico abajo:** Concentración de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes celulares calculada por ELISA luego de la activación del inflamasoma NLRP3 aplicando NATx0 durante la segunda señal. ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \*\*\* = 0.0024; \*\*\*\* <0.0001. El control se refiere a células que no recibieron tratamiento, mientras que la concentración 0  $\mu$ M se refiere a células que recibieron LPS/ATP+0.5 % DMSO (%DMSO máximo utilizado en los ensayos). Se realizaron al menos 3 réplicas independientes.

**Por lo tanto, a continuación, para evaluar con mayor detalle el efecto de NATx0 sobre el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, NATx0 fue agregado siempre en conjunto con la segunda señal (LPS/ATP+NATx0).**

Inicialmente, con el objetivo de estudiar el efecto de otros nitroalquenos en modular el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 en nuestros ensayos, evaluamos la liberación de IL-1 $\beta$  en presencia de LPS/ATP cuando los compuestos 3,4-metilenedioxi- $\beta$ -nitroestireno (**MNS**) y **NATxMe** fueron incubados junto con la segunda señal.

El compuesto **MNS** fue inicialmente descrito como un inhibidor de la agregación plaquetaria, del crecimiento tumoral y de la apoptosis a través de la modulación de tirosinas quinasas, fosfatasa y telomerasa <sup>177-180</sup>. En un estudio que evaluó una quimioteca de 160 inhibidores de quinasas demostró que **MNS** inhibe a la tirosina-quinasa Syk <sup>180</sup>. Siendo que las quinasas tienen un rol protagonista en la traducción de señales, el rol de Syk se ha evaluado en la activación del inflamasoma. De hecho, la participación de dicha quinasa fue esencial para la activación del inflamasoma NLRP3 en células dendríticas activadas con *Candida albicans*, como respuesta a una infección fúngica, aunque no fue esencial para la activación de NLRP3 mediada por nigericina <sup>181</sup>. Cuando se estudió el mecanismo de acción de **MNS** sobre la inhibición del inflamasoma NLRP3 se encontró que la quinasa Syk contribuye en la inducción de la proIL-1 $\beta$  mediada por LPS pero no es esencial para la inhibición del inflamasoma NLRP3 por parte de **MNS** <sup>180</sup>. De hecho, los mismos autores demuestran que **MNS** se une directamente al dominio LRR y NACHT de la proteína NLRP3 y suprime la actividad ATPasa de la misma, sugiriendo una unión específica a los residuos de cisteína de NLRP3. Esto impediría la oligomerización de NLRP3 y por lo tanto los subsiguientes pasos del ensamblaje del inflamasoma. La inhibición de **MNS** es específica del inflamasoma NLRP3, no inhibiendo otros inflamasomas como NLRC4 o AIM2. A su vez, la inhibición es dependiente del grupo nitroalquenilo, potencialmente a través de una reacción de adición con los grupos tiol de las cisteínas en la proteína <sup>180</sup>.

En nuestros ensayos de activación e inhibición del inflamasoma NLRP3 en los macrófagos THP-1, tanto **MNS** como **NATxMe** (nitroalqueno derivado de Trolox previamente descrito por nuestro grupo) inhibieron con la misma potencia que **NATxO** (Figura 7.33).

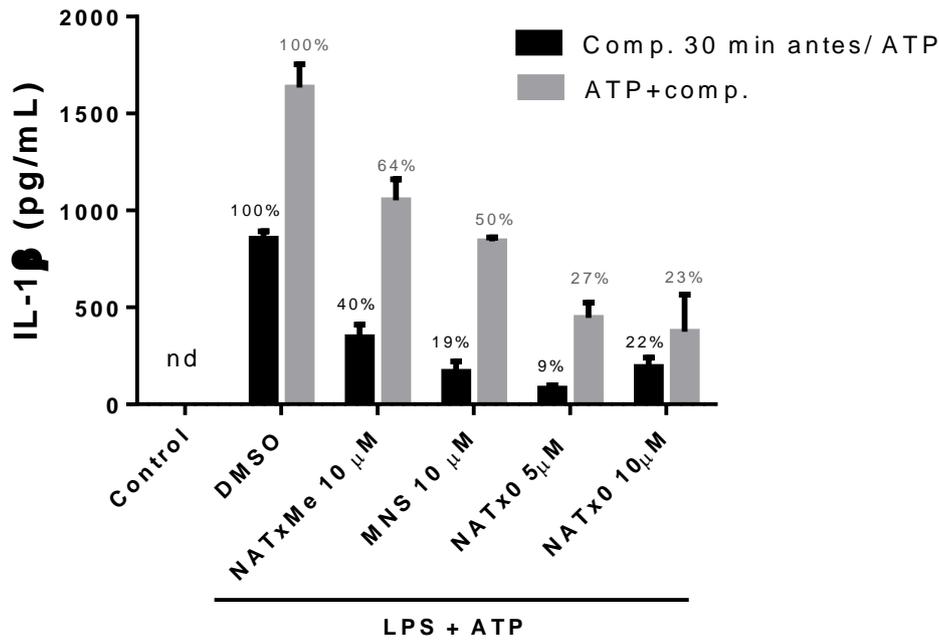


**Figura 7.33.** Modulación del inflammasoma NLRP3 mediada por nitroalquenos en macrófagos THP-1. 3,4-metilenedioxi- $\beta$ -nitroestireno (MNS, estructura representada en gráfico) 10  $\mu$ M, **NATxMe** 10  $\mu$ M y **NATxO** 5 y 10  $\mu$ M fueron incubados durante la segunda señal de activación del inflammasoma NLRP3 (LPS/ATP+compuestos). Se midió la concentración de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes celulares mediante ELISA y se calculó el %IL-1 $\beta$  liberado respecto a la condición LPS/ATP+DMSO. El control se refiere a células que no recibieron tratamiento, mientras que la condición DMSO se refiere a células que recibieron LPS/ATP+0.1 % DMSO (%DMSO máximo utilizado en los ensayos). ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): ns > 0.83. El gráfico representa 4 réplicas independientes.

En base a los resultados de la Figura 7.33, podríamos esperar que nuestro nitroalqueno derivado de Trolox presente un mecanismo de acción similar a **MNS**, posiblemente a través de la inhibición directa de la proteína NLRP3 mediante reacciones de adición de Michael con tioles en la proteína. También en función de estos resultados podemos predecir que la posición del grupo nitroalquenilo en la estructura del Trolox no tiene efecto en la inhibición de inflammasoma en estos ensayos (**NATxMe vs NATxO**).

Por otro lado, también evaluamos el efecto de los compuestos sobre la liberación de IL-1 $\beta$  cuando son agregados durante la etapa del ensamblaje del inflammasoma, aunque en este caso antes del ATP (no en conjunto). El objetivo de realizar este ensayo fue evaluar si en nuestros experimentos existen interacciones entre los nitroalquenos y el ATP (durante el preparado de las soluciones) que pudieran disminuir el efecto de los nitroalquenos sobre las proteínas blanco así como también el efecto del ATP en las células. De hecho, en el artículo donde se describe el efecto del **MNS** sobre el inflammasoma NLRP3, el compuesto no es agregado junto con el ATP sino antes.

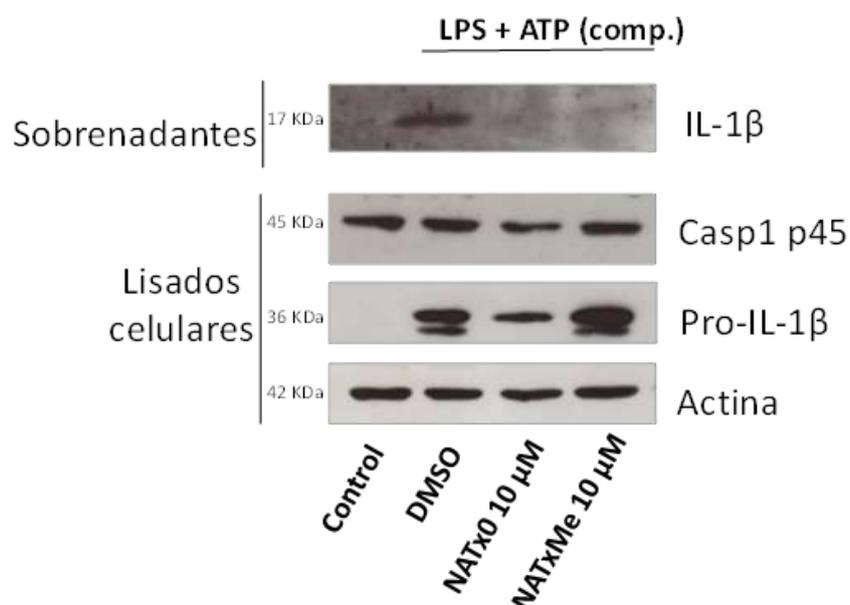
Para ello, incubamos los macrófagos THP-1 por 2.5 h con LPS, luego con los compuestos por 30 min y posteriormente con ATP (en medio fresco) por 30 min (Figura 7.34, barras negras) y se comparó con el procedimiento habitual (compuestos agregados en conjunto con el ATP, barras grises). La liberación de IL-1 $\beta$  cuando los compuestos fueron agregados 30 min antes del ATP fue menor respecto a la condición donde los compuestos se agregan junto con el ATP, en todos los casos. Los porcentajes presentados sobre las barras del gráfico corresponden al porcentaje de IL-1 $\beta$  detectado en cada condición respecto a su control (condiciones DMSO para cada caso). Preliminarmente, podríamos concluir que existen interacciones entre los nitroalquenos y el ATP que disminuyen el efecto de los mismos en los macrófagos. Notar también que existe una disminución general en la cantidad de IL-1 $\beta$  liberada en el experimento donde los compuestos se agregan 30 min antes del ATP, posiblemente debida a la menor incubación con LPS.



**Figura 7.34.** Efecto del momento de agregado de los nitroalquenos (comp.) durante el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 en macrófagos THP-1. MNS 10  $\mu$ M, NATxMe 10  $\mu$ M y NATxO 5 y 10  $\mu$ M fueron incubados 30 min antes del ATP (LPS 2.5h/comp. 30 min/ATP 30 min) o junto con el ATP (LPS/ATP+comp.). Se midió la concentración de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes celulares mediante ELISA. Los porcentajes sobre las barras se refieren al porcentaje de IL-1 $\beta$  detectado en cada condición respecto a su 100%. El control se refiere a células que no recibieron tratamiento, mientras que la condición DMSO se refiere a células que recibieron 0.1 % DMSO 30 min antes del ATP o en conjunto con el ATP. Este experimento fue realizado 1 vez.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en los ELISA, evaluamos la expresión proteica de IL-1 $\beta$  y caspasa-1 mediante western blot luego de la activación e inhibición mediada por **NATxO** del inflammasoma NLRP3 (Figura 7.35). Para ello, los macrófagos THP-1 fueron tratados con LPS/ATP+compuestos, luego se obtuvieron los sobrenadantes y las células fueron recolectadas para su posterior extracción de proteínas (lisados celulares). A su vez, se precipitaron las proteínas en los sobrenadantes de manera de detectar IL-1 $\beta$  activa liberada al medio mediante western blot. En la condición control (Figura 7.35), sin tratamiento alguno, pudimos observar que no hay expresión constitutiva de la proIL-1 $\beta$  (36 KDa) sí habiendo expresión de la pro-caspasa-1 (45 KDa). De hecho, la expresión de pro-caspasa-1 se detectó de manera similar en todas las condiciones. Este resultado era esperable ya que se conoce que la expresión de proIL-1 $\beta$  es dependiente de un estímulo

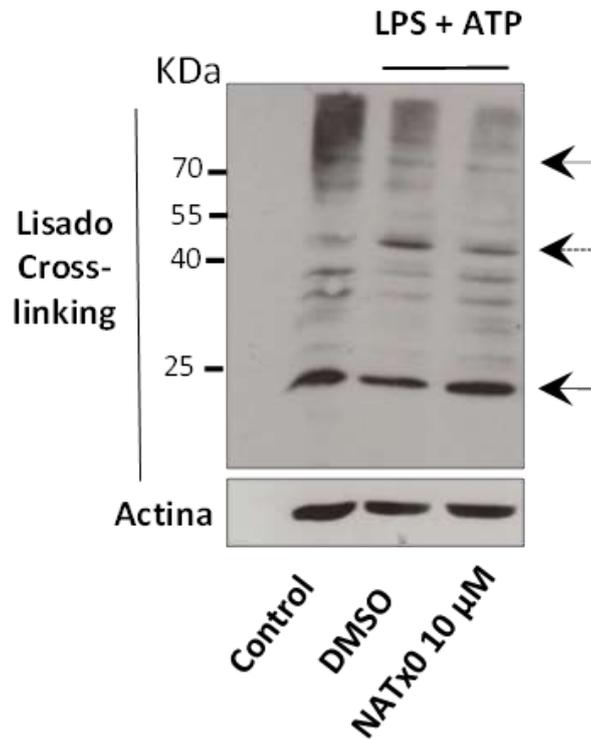
de NF- $\kappa$ B (en este caso el LPS), mientras que pro-caspasa-1 se encuentra de manera constitutiva en las células. En la condición LPS/ATP+DMSO se observó una banda correspondiente a la proIL-1 $\beta$  en los lisados celulares y una banda correspondiente a la IL-1 $\beta$  activa en los sobrenadantes, mientras que en presencia de **NATx0** o **NATxMe** la banda de IL-1 $\beta$  madura fue prácticamente indetectable.



**Figura 7.35.** Western blot de proIL-1 $\beta$ , pro-caspasa 1 (p45) e IL-1 $\beta$  activa luego de la activación del inflammasoma NLRP3. Los compuestos DMSO, NATx0 o NATxMe fueron aplicados durante la segunda señal. El control se refiere a células que no recibieron tratamiento alguno, mientras que DMSO se refiere a células que recibieron LPS/ATP+0.1 % DMSO. Blot representativo de 2 experimentos independientes.

Posteriormente, nos propusimos ahondar sobre el efecto de **NATx0** sobre el ensamblaje del inflammasoma. Como se ha mencionado previamente, la segunda señal provoca la oligomerización de NLRP3 y de la proteína adaptadora de 22 KDa ASC, la cual a través de su dominio C-terminal permite la unión de pro-caspasa-1 provocando su activación<sup>182</sup>. Las propiedades tipo priónicas de ASC son responsables de la formación de grandes agregados fibrilares conocidos como “specks” formados por dímeros de ASC. La oligomerización de ASC genera una multitud de sitios de unión para caspasa-1 actuando como un mecanismo de amplificación de la señal para la producción de la citoquinas específicas de inflammasoma<sup>183,184</sup>. Por lo tanto, la oligomerización de ASC es una evidencia directa de la activación del inflammasoma y puede ser evidenciada mediante

western blot <sup>184,185</sup>. Para realizar estos experimentos, macrófagos THP-1 fueron tratados con LPS/ATP+NATxO y a continuación se les agregó formaldehído, de manera de “fijar” las interacciones entre proteínas en las células (la técnica se conoce como cross-linking en inglés). En este sentido, el formaldehído se ha utilizado por décadas para detectar estructuras macromoleculares y se utiliza de manera rutinaria para la detección de interacciones proteína-ADN y proteína-proteína <sup>186</sup>. El formaldehído penetra fácilmente a las células y reacciona inicialmente con un nucleófilo presente en la biomolécula (comúnmente un grupo amino en un residuo de lisina) formando una imina o base de Schiff, la cual luego reacciona con un segundo nucleófilo presente en la misma u otra proteína dando por resultado el producto de cross-linking <sup>187</sup>. Para delimitar la reactividad del formaldehído a un intervalo de tiempo, a continuación se agrega un exceso de una molécula reactiva pequeña, típicamente glicina o Tris (conocidos como “quenchers” en inglés) los cuales reaccionan con el formaldehído libre <sup>187</sup>. Luego se procedió con los pasos habituales para la obtención de las muestras para SDS-PAGE, excepto que las muestras no se calientan ya que el calor puede revertir la reacción de entrecruzamiento. En la Figura 7.36, se presenta un western blot para ASC de los lisados celulares con el procedimiento de entrecruzamiento, donde se pueden observar los monómeros de ASC en las tres condiciones ensayadas (banda correspondiente a 24 KDa) con una expresión levemente mayor en la condición con **NATxO** 10  $\mu$ M. A su vez, la banda correspondiente al dímero de ASC en 48 KDa se observa disminuida respecto a la condición con DMSO y no se observa en el control sin tratamiento. Por arriba de la banda correspondiente al dímero se encontrarían los oligómeros (72 KDa, 96 KDa, etc) aunque no se evidenciaron de manera clara en nuestro blots, posiblemente por el método de fijación. Este resultado indica que **NATxO** inhibe parcialmente la oligomerización de ASC, por lo tanto su mecanismo de acción podría ser directamente interactuando con ASC y/o mediante interacciones con proteínas “por arriba” de ASC en la vía de activación del inflammasoma. Siendo que el efecto de inhibición de **NATxO** 10  $\mu$ M en la liberación de IL-1 $\beta$  parece ser más exacerbado que el efecto sobre los dímeros de ASC (Figura 7.32 vs. Figura 7.36), la interacción de **NATxO** con más de una proteína en la etapa de ensamblaje parece más probable.



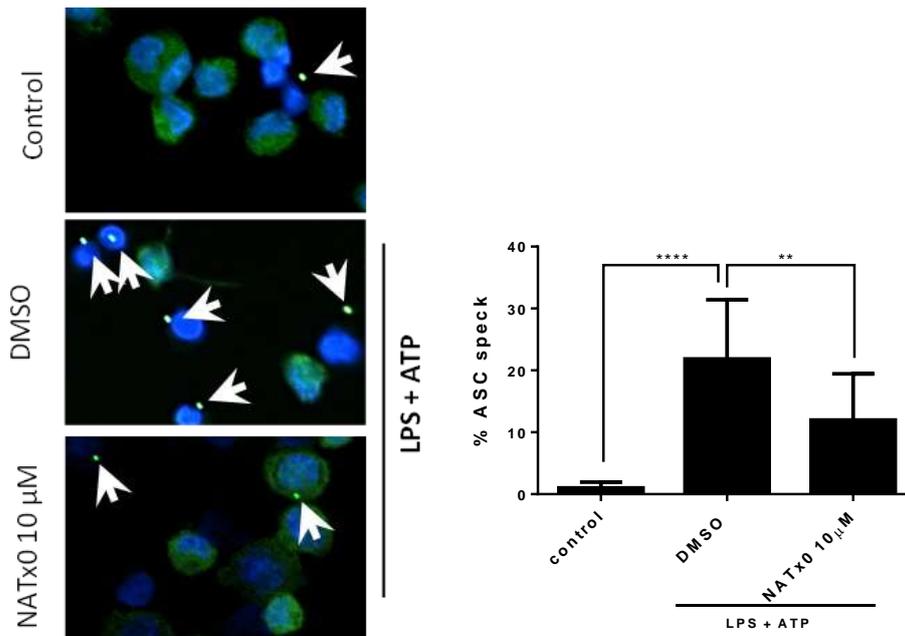
**Figura 7.36.** Western blot de ASC luego de la activación del inflamasoma en macrófagos THP-1. NATx0 fue aplicado junto con la segunda señal. Las células fueron tratadas con formaldehído al 16% (“crosslinking”) para la detección de los oligómeros de ASC. Se puede observar la banda correspondiente a los monómeros de ASC en 24 kDa, la banda correspondiente a los dímeros en 48 kDa y la/s banda/s que corresponderían a oligómeros por arriba de 70 kDa. El control se refiere a células que no recibieron tratamiento alguno, mientras que la condición DMSO se refiere a células que recibieron LPS/ATP+0.1 % DMSO. Blot representativo de 2 réplicas independientes.

Otra consecuencia de la activación de NLRP3 es la formación de agregados perinucleares de filamentos de ASC en las células, denominados en inglés “*specks*”. Estos agregados o “*specks*” pueden ser internalizados por otras células provocando la internalización de caspasa-1 en las mismas. Esto sugiere que la activación de inflamasomas propaga la inflamación de célula a célula.

La producción de “*specks*” en los sitios de inflamación produce serias implicancias en enfermedades relacionadas a la inflamación. Los grandes agregados de ASC son muy estables, resistentes a proteasas y pueden ser observados dentro y fuera de las células presentando diámetros de entre 1-2  $\mu\text{m}$ . Su liberación al medio extracelular, luego de la

inducción de la piroptosis, provoca la oligomerización de ASC soluble en otras células amplificando la señal de daño por todo el organismo (características típicas priónicas). De hecho, se ha demostrado en ratones que la inyección de “specks” *in vivo* es un factor desencadenante de propagación de la inflamación<sup>90,188</sup>. Para la formación del agregado, ASC se remueve completamente del citoplasma, formándose lo que se puede observar mediante inmunofluorescencia como un punto perinuclear en la célula<sup>189</sup>.

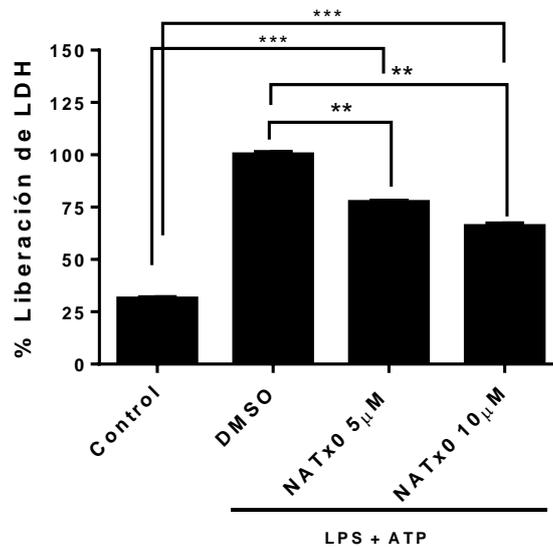
En este sentido, nos propusimos detectar los “specks” de ASC mediante microscopía de fluorescencia en los macrófagos THP-1 luego del tratamiento con LPS/ATP+NATx0. Posteriormente, realizamos una inmunofluorescencia para ASC utilizando un anticuerpo primario anti-ASC y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-Flúor 633 (ASC en verde, Núcleos teñidos con DAPI en azul; Figura 7.37). Luego de la activación del inflammasoma (condición LPS/ATP+DMSO), pudimos detectar un aumento significativo de la presencia de agregados de ASC en las células respecto a las células que no recibieron tratamiento. Los agregados o “specks” se pueden visualizar como puntos brillantes en verde ubicados mayormente cerca de los núcleos. Cuando las células fueron tratadas con **NATx0** 10  $\mu$ M en conjunto con la segunda señal, se observó una disminución significativa de dichos agregados y una mayor distribución citosólica de ASC (Figura 7.37). Estos resultados nuevamente nos indican que **NATx0** posee un efecto parcialmente inhibitorio sobre la oligomerización de ASC.



**Figura 7.37.** Detección de “specks” de ASC por microscopía de fluorescencia en macrófagos THP-1 luego de la activación del inflammasoma. NATx0 es aplicado en la segunda señal. Se muestran campos representativos de las imágenes obtenidas para cada caso (ASC: verde, Núcleos: azul). Los “specks” son denotados con flechas. Se calcula y grafica el porcentaje de formación de specks de ASC en función de las células positivas para ASC. ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \*\*\*\*  $<0.0001$ ; \*\* =  $0.0087$ . El control se refiere a células que no recibieron tratamiento. El experimento representa 2 réplicas independientes.

Como consecuencia de la activación del inflammasoma se induce un tipo de muerte celular denominada piroptosis. La piroptosis es una muerte programada dependiente de caspasa-1 morfológica y funcionalmente distinta a la apoptosis, que se caracteriza por presentar hinchazón celular, ruptura de membrana y liberación de mediadores inflamatorios. A su vez, se diferencia de la necrosis por ser dependiente de caspasa-1. La detección de la piroptosis *in vitro* puede realizarse determinando la liberación de la enzima glicolítica lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH liberada en los medios celulares puede ser cuantificada a través de una reacción enzimática acoplada, donde LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato reduciendo  $\text{NAD}^+$  a NADH, el cual es cofactor de la diaforasa que reduce una sal de tetrazolio a un producto formazano rojo que se detecta en espectrofotómetro a  $490 \text{ nm}$ <sup>190</sup>. La formación del producto formazano es directamente proporcional a la cantidad de LDH presente en los medios<sup>191</sup>.

En este sentido, realizamos la medición de LDH en los medios celulares luego del tratamiento con LPS/ATP+NATx0 en macrófagos THP-1 haciendo uso de un kit comercial (Figura 7.38). Como se puede observar en la Figura 7.38, el tratamiento con LPS/ATP+DMSO aumenta significativamente la liberación de LDH a los medios y disminuye de manera significativa y dosis-dependiente en presencia de NATx0. Este resultado representa una medida indirecta de la inhibición del inflamasoma NLRP3 mediada por NATx0.



**Figura 7.38.** Liberación de LDH (lactato deshidrogenasa) en los medios celulares luego de la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos THP-1. NATx0 es aplicado en la segunda señal. Se calcula el porcentaje de liberación de LDH en los medios respecto a la condición LPS/ATP+DMSO (100%) utilizando un kit comercial (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit). El control se refiere a células que no recibieron tratamiento. ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \*\*\* = 0.0002; \*\* = 0.0098.

En la siguiente sección, estudiaremos los efectos biológicos de NATx0 in vivo, inicialmente evaluando su capacidad antiinflamatoria en dos modelos de inflamación aguda y finalmente en un modelo de obesidad inducida por dietas ricas en grasas en el cual se desarrolla inflamación crónica.

## 7.4 Evaluación de los efectos biológicos de NATx0 *in vivo*.

### 7.4.1 Estudio de la capacidad antiinflamatoria de NATx0 en un modelo de inflamación aguda inducida por daño en pez cebra.

Con el objetivo de evaluar las propiedades antiinflamatorias *in vivo* de **NATx0**, inicialmente utilizamos un modelo de inflamación aguda en pez cebra (*Danio rerio*).

El uso de estos animales presenta importantes ventajas respecto a los mamíferos vertebrados más utilizados, como son el ratón y la rata. Los peces cebra son animales vertebrados que presentan tiempos generacionales cortos, alta tasa de fecundidad, bajo costo, brindan la posibilidad de trabajar con grandes números y presentan alta similitud genómica y molecular con otros vertebrados, incluyendo los humanos <sup>192,193</sup>. Con el genoma completamente secuenciado, se han desarrollado una cantidad de líneas transgénicas o mutantes de pez cebra así como también modelos para estudiar enfermedades humanas en diversas áreas de la investigación biomédica, incluyendo inmunología, toxicología, cáncer, enfermedades metabólicas y más <sup>194,195</sup>. Además, son muy utilizados para evaluar la toxicidad de nuevos fármacos mediante ensayos de toxicidad estandarizados, siendo el más utilizado el FET (Fish Embryo Acute Toxicity Test) <sup>196</sup>. Una gran ventaja de estos peces es que los embriones y las larvas son ópticamente transparentes durante los estadios iniciales del desarrollo, lo cual permite observar *in vivo* de manera temporal procesos celulares mediante microscopía óptica de campo claro o incluso de fluorescencia (Figura 7.39) <sup>197</sup>.



**Figura 7.39.** Principales etapas del desarrollo del pez cebra.

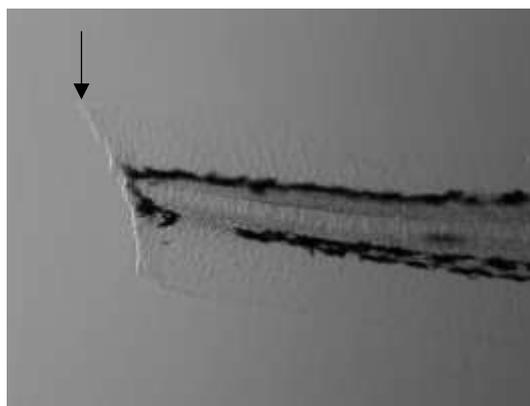
En este sentido, el pez cebra es una herramienta muy eficiente para el estudio de mecanismos relacionados a la inflamación así como también para el descubrimiento de

nuevos fármacos antiinflamatorios <sup>192</sup>. El sistema inmune del pez cebra es muy similar al de los humanos, apareciendo inicialmente el sistema innato, donde los macrófagos pueden ser visualizados 15 horas post-fertilización (hpf) y los neutrófilos entre 18-48 hpf. Sus neutrófilos se asemejan a los neutrófilos humanos ya que ambos poseen núcleos segmentados en varios lóbulos y gránulos citoplasmáticos con expresión de mieloperoxidasa (MPO), característica única de los neutrófilos <sup>192,198</sup>. Posteriormente, se desarrolla el sistema inmune adaptativo que también presenta características conservadas como el desarrollo del timo y de los linfocitos B y T. La maduración del sistema adaptativo se completa entre las 3-4 semanas después de la fertilización, lo cual permite estudiar el sistema inmune innato de manera independiente al adaptativo. Junto con esto, la respuesta inflamatoria también se encuentra conservada en el pez cebra validando su uso como un modelo eficaz para el estudio de nuevos fármacos antiinflamatorios <sup>192,199,200</sup>.

En esta tesis, utilizamos una línea de pez cebra transgénica, descrita por Renshaw y col. en el 2006, la cual expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de la mieloperoxidasa, proteína específica de neutrófilos <sup>201</sup>. Esta línea permite visualizar *in vivo* el comportamiento de los neutrófilos en las larvas transparentes mediante técnicas de fluorescencia. En este sentido, los mismos autores describieron un modelo de inducción de daño que permite hacer un seguimiento temporal de la resolución de la inflamación utilizando la línea transgénica Tg(mpx:GFP). En este modelo, se realiza un corte (con bisturí estéril) en la cola de larvas anestesiadas de 3 a 5 días post-fertilización (dpf) y se observa el reclutamiento de los neutrófilos al sitio de daño, lo cual es principalmente a través de la circulación <sup>201</sup>. Los autores observaron el reclutamiento de neutrófilos dentro de 6 a 12 h luego del daño, seguido de una fase de resolución de la inflamación completada dentro de las 24 h. La resolución es un proceso altamente regulado que permite mantener la homeostasis del tejido; de lo contrario la inflamación puede convertirse en una respuesta crónica persistente por un largo periodo de tiempo, lo cual se asocia con el desarrollo de diferentes patologías <sup>199</sup>. Uno de los mecanismos fundamentales de la resolución es la eliminación rápida de los neutrófilos en el tejido dañado, evitando mayor daño por la liberación de gránulos tóxicos de los neutrófilos persistentes. Esto se logra mediante la inducción de apoptosis o mediante la migración reversa de los neutrófilos <sup>200</sup>.

Para realizar estos experimentos, inicialmente se ajustó la dosis de los compuestos a utilizar de manera de no ocasionar toxicidad en las larvas. De esta manera, se determinó que dosis superiores a 1  $\mu$ M de **NATxO** presentaban toxicidad.

En nuestros experimentos, larvas Tg(mpx:GFP) de 3 dpf fueron pretratadas con vehículo, **NATxO**, Trolox o Ibuprofeno por 2 h. Posteriormente, las larvas se anestesiaron y se realizó un corte con bisturí en la aleta caudal, tal como se muestra en la Figura 7.40.

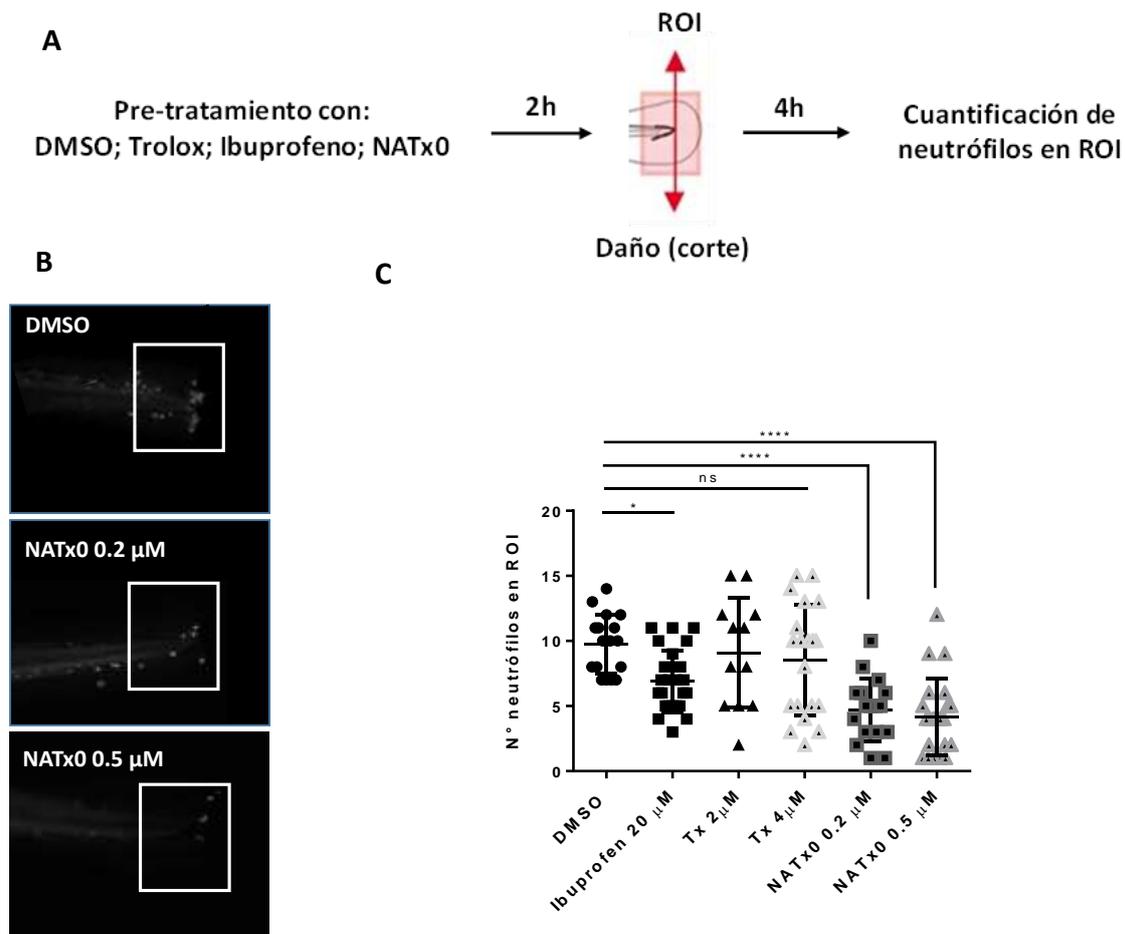


**Figura 7.40.** Imagen de contraste de fases de una larva de pez cebra luego del corte transversal (señalado por flecha) generado en la aleta caudal en nuestro laboratorio.

A continuación, las larvas fueron incubadas por 4 h con los compuestos (preparados frescos) y fijadas con paraformaldehído. Al día siguiente, se realizó una inmunohistoquímica de cuerpo entero utilizando un anticuerpo anti-GFP y un anticuerpo secundario Alexa-Flúor 488. Si bien esta línea fue construida para la expresión de GFP en los neutrófilos, en nuestros experimentos utilizamos un anticuerpo para GFP de manera de aumentar la señal. Luego las larvas se montaron, se adquirieron imágenes en microscopio de epifluorescencia y se cuantificaron los neutrófilos reclutados al sitio de daño en una región definida (ROI) utilizando el programa ImageJ (Figura 7.41A).

Cuando las larvas fueron tratadas con el vehículo (DMSO), se observó un reclutamiento de neutrófilos al sitio de daño, el cual fue modestamente inhibido por la presencia del antiinflamatorio no esteroideo convencional, Ibuprofeno (Figura 7.41 B y C). Este resultado coincide con los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo en experimentos realizados por otro investigador<sup>26</sup>. Notar que si bien la ventana de tiempo realizada en estos ensayos es menor al tiempo previamente descrito para el reclutamiento de neutrófilos (6-12 h), de todos modos detectamos una cantidad significativa de neutrófilos en el sitio de daño en un tiempo de experimentación total

más adecuado. Cuando las larvas fueron tratadas con el precursor de **NATx0**, Trolox, utilizando las dosis 2 y 4  $\mu\text{M}$  no se observaron diferencias significativas en la cantidad de neutrófilos reclutados al ROI, respecto al grupo que recibió el vehículo (Figura 7.41C). Por último, cuando las larvas fueron tratadas con **NATx0** 0.2 y 0.5  $\mu\text{M}$ , concentraciones ampliamente menores que Ibuprofeno o Trolox, se pudo constatar una disminución estadísticamente significativa para ambas dosis, respecto al control DMSO (Figura 7.41C).



**Figura 7.41.** Determinación del número de neutrófilos reclutados al sitio de lesión en larvas de zebrafish transgénicas que expresan GFP a nivel de los neutrófilos (mpx:GFP), pretratadas con DMSO o Ibuprofeno o Trolox o NATx0. **A:** diagrama del experimento; **B:** imágenes representativas obtenidas en microscopio de fluorescencia, correspondientes a las condiciones con DMSO, NATx0 0.2  $\mu\text{M}$  y NATx0 0.5  $\mu\text{M}$ ; **C:** cuantificación de los neutrófilos reclutados al sitio de lesión en el ROI definido. ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \* = 0.0487; DMSO vs Tx 2  $\mu\text{M}$  ns = 0.992; DMSO vs Tx 4  $\mu\text{M}$  ns = 0.844; \*\*\*\* < 0.0001; \*\*\*\* < 0.0001. El gráfico representa 3 réplicas independientes.

Por lo tanto, **NATx0** provoca una inhibición significativa del reclutamiento de neutrófilos al sitio de lesión, aunque dicha inhibición no es total. Esto podría representar una ventaja ya que inhibir completamente la respuesta inflamatoria frente a un daño o infección no es deseable sino controlar la respuesta cuando el organismo no logra mantener la homeostasis. En este sentido, sería también interesante estudiar el efecto de **NATx0** sobre la migración reversa de neutrófilos durante el periodo de resolución de la inflamación.

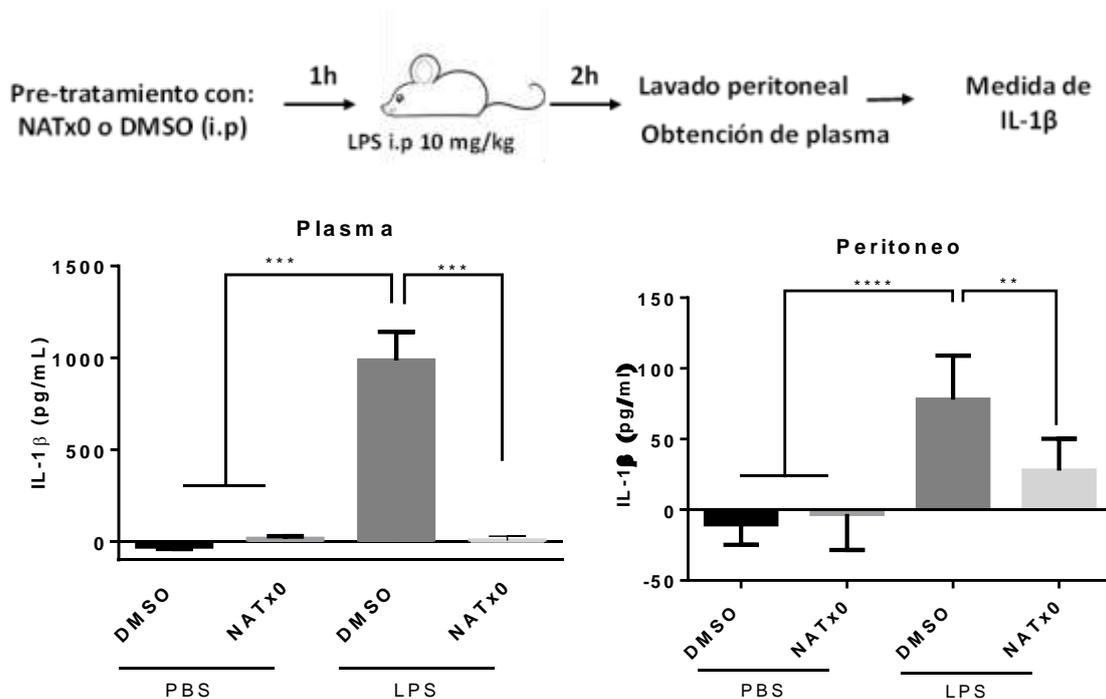
#### **7.4.2 Estudio de la capacidad antiinflamatoria de NATx0 en un modelo de inflamación aguda inducida por LPS en ratón.**

En los estudios *in vitro* pudimos determinar un efecto antiinflamatorio de **NATx0** en los ensayos de activación en macrófagos mediado, en parte, por la inhibición del inflamasoma NLRP3. En este sentido, nos propusimos evaluar la capacidad de **NATx0** de inhibir NLRP3 *in vivo* en un modelo previamente descrito de inflamación aguda inducida por LPS en ratón <sup>202</sup>. La inducción de IL-1 $\beta$  por la inyección de LPS intraperitoneal (i.p) se ha descrito como dependiente de NLRP3, ya que la producción de IL-1 $\beta$  es significativamente menor en ratones *Nlrp3*<sup>-/-</sup> que en ratones normales luego del estímulo de LPS <sup>203</sup>. A su vez, el estímulo de LPS es suficiente para la producción de IL-1 $\beta$  *in vivo*. De hecho, el modelo de dos señales de activación del inflamasoma descrito en macrófagos no ha sido observado en monocitos circulantes, los cuales requieren únicamente el estímulo TLR para la liberación de IL-1 $\beta$ . Esto puede ser explicado como una adaptación de cada tipo celular a su respectivo ambiente. En el caso de los monocitos circulantes en sangre, deben responder rápidamente a cualquier señal de daño, especialmente de origen microbiano, ya que se encuentran en un ambiente libre de patógenos. Sin embargo, los macrófagos están confinados en ambientes expuestos de manera constante a estímulos microbianos (espacio alveolar, superficie de las mucosas, etc), por lo que una segunda señal para producir IL-1 $\beta$  parece ser necesaria para controlar su respuesta. Esta segunda señal podría estar presente en los sitios de infección, de trauma o necrosis <sup>204</sup>. De esta manera, la liberación de IL-1 $\beta$  en respuesta al LPS por parte del sistema inmune innato puede estar mediada por las diferentes

células en la primera línea de defensa.

Ratones C57BL/6J fueron pre-tratados con **NATxO** o DMSO por 1h y luego con LPS durante 2h. Posteriormente, se midieron los niveles mediante ELISA de IL-1 $\beta$  producidos tanto en plasma como dentro de la cavidad peritoneal (Figura 7.42). La cavidad peritoneal contiene células del sistema inmune, incluyendo macrófagos y linfocitos B y T. De hecho, realizamos un protocolo que involucra un lavado peritoneal con PBS (bajo anestesia) que ha sido descrito para el aislamiento de células del sistema inmune, especialmente macrófagos, por lo tanto la medida de IL-1 $\beta$  podría reflejar de manera directa la respuesta de los macrófagos *in situ* así como también de macrófagos infiltrantes<sup>205,206</sup>.

Como se puede observar en la Figura 7.42, los niveles de IL-1 $\beta$  en plasma y peritoneo aumentaron significativamente con el estímulo de LPS respecto al control (DMSO+PBS vs DMSO+LPS).



**Figura 7.42.** Liberación de IL-1 $\beta$  en plasma y peritoneo de ratones inyectados vía i.p con LPS luego de un pre-tratamiento con NATxO o DMSO. Ratones C57BL/6 fueron pre-tratados con 20 mg/mL NATxO o DMSO 1h antes de la inyección de 10 mg/mL LPS (*E. coli*) o PBS. Luego de 2h, los ratones fueron sacrificados y se midieron los niveles de IL-1 $\beta$  en suero y en la cavidad peritoneal por ELISA. Se muestra un esquema que resume el ensayo. ANOVA de 1 vía con ajuste de Bonferroni (prueba de comparación múltiple): \*\*\* <0.0001; \*\*\*\* <0.0001; \*\* = 0.0004. Gráficos representan dos experimentos independientes, realizados con 2 o 3 animales por condición.

Cuando los ratones fueron pre-tratados con **NATx0** se observó una disminución importante en la cantidad de IL-1 $\beta$  detectada en ambos fluidos respecto al control (DMSO+LPS vs **NATx0**+LPS, Figura 7.42). Notar también que se incluyó un grupo de animales que fue administrado con **NATx0**+PBS de manera de determinar que el compuesto no genera una respuesta inflamatoria *per se*. Estos resultados nos indican que **NATx0** es activo *in vivo*, logrando reducir ampliamente la respuesta aguda generada por un estímulo de LPS tanto *in situ* (peritoneo) como a nivel sistémico.

#### **7.4.3 Evaluación de los efectos de NATx0 en un modelo de ratón con obesidad y resistencia a la insulina inducida por dietas ricas en grasas.**

La respuesta inflamatoria es crítica para la supervivencia de todas las especies durante cualquier infección o injuria. Sin embargo, hoy en día se sabe que existen factores de riesgo sociales y ambientales relacionados a estilos de vida poco saludables, que pueden promover una inflamación crónica sistémica desregulada, responsable del desarrollo de las principales enfermedades no transmisibles <sup>6</sup>. Durante la obesidad, uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares y definida recientemente como una enfermedad *per se*, existe una inflamación auto-dirigida perpetuada a nivel del tejido adiposo que genera la expresión crónica de factores proinflamatorios, directamente relacionados con la resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2. Aunque la obesidad puede ser prevenible a través de la promoción y adopción de estilos de vida más saludables, una vez que el fenotipo de obesidad se ha establecido, es altamente difícil de revertir modificando el estilo de vida. Esto afirma la necesidad de encontrar nuevas estrategias farmacológicas que permitan la prevención y el tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades.

En el año 1993, Spiegelman y colaboradores describieron por primera vez la relación directa que existe entre la inflamación, la obesidad y resistencia a la insulina, demostrando que en el tejido adiposo de animales obesos existe una mayor expresión de TNF- $\alpha$  <sup>207</sup>. Posteriormente, los mismos autores demostraron que la fosforilación de las serinas en IRS1 por parte de TNF- $\alpha$  promueve el desarrollo de resistencia a la insulina

83,208,209 . La misma relación fue encontrada en pacientes obesos donde la expresión de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo se encontró aumentada respecto a personas normopeso <sup>210</sup>. La activación de NF- $\kappa$ B se ha encontrado aumentada en diferentes tejidos durante la obesidad, especialmente en el tejido adiposo, y su activación es mediada a través de la presencia de citoquinas, ácidos grasos saturados, DAMPs y la proteína 1 del grupo alta movilidad (HMGB1) liberados de células dañadas. La expresión de NF- $\kappa$ B contribuye a la resistencia a la insulina a través de la fosforilación inhibitoria de IRS-1 o IR <sup>211</sup>. Otras vías de señalización intracelular se encuentran activadas durante la obesidad, entre ellas las vías de JNK, MAPK, PKC, STAT1 y STAT3, todas induciendo resistencia a la insulina a través de interacciones inhibitorias o de degradación de IRS o IR <sup>211,212</sup>. El reclutamiento de células del sistema inmune tanto innato como adaptativo es encontrado en etapas tempranas del desarrollo de la obesidad incluyendo macrófagos, neutrófilos, células T y B, las cuales contribuyen al estado inflamatorio crónico. Además, se ha demostrado un rol fundamental del inflamasoma NLRP3 en censar señales de daño asociadas a la obesidad, contribuyendo significativamente en el desarrollo de resistencia a la insulina <sup>119</sup>.

En este sentido, diferentes estrategias se han desarrollado para el tratamiento de enfermedades metabólicas a través de la modulación de la inflamación crónica en pacientes. Por ejemplo, se ha descrito el uso de anticuerpos inhibitorios contra TNF- $\alpha$  en pacientes que presentan dichas enfermedades, encontrándose resultados variables, algunos presentando leves mejoras en la sensibilidad a la insulina y glicemia, mientras que otros no presentaron ningún efecto <sup>213</sup>. En un estudio de meta-análisis se demostró que mediante el tratamiento con anticuerpos contra TNF- $\alpha$  se redujo el riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2, aunque es necesario realizar ensayos clínicos a mayor escala. Los resultados de estos ensayos podrían indicar que TNF- $\alpha$  es un factor más relevante en el desarrollo de resistencia a la insulina en ratones que en humanos y/o que los anticuerpos contra dicha citoquina no penetran lo suficiente en el tejido adiposo <sup>213</sup>. Resultados más prometedores se han encontrado mediante el uso de un anticuerpo que bloquea el receptor de IL-1 $\beta$  (Anakinra) o del anticuerpo Canakinumab, el cual bloquea IL-1 $\beta$ , los cuales han demostrado efectos leves pero consistentes en disminuir los niveles de glicemia y de hemoglobina glicosilada (HbA1c1) <sup>116,214</sup>. Sin embargo, los efectos

beneficiosos se han atribuido al aumento en la secreción de insulina y en la función de las células  $\beta$ , en lugar de mejorar la resistencia a la insulina. Estos resultados podrían significar que IL-1 $\beta$  presenta un rol en la deficiencia de las células  $\beta$  generada durante la diabetes de tipo 2, en lugar de estar implicada en el desarrollo de resistencia a la insulina. En otros estudios se han encontrado ciertos efectos secundarios indeseados asociados a infecciones, aunque se encontraron reducciones significativas en los eventos cardiovasculares en pacientes tratados con Canakinumab, demostrando el potencial uso de estrategias antiinflamatorias para la aterosclerosis <sup>215</sup>. También se ha descrito el uso de moléculas pequeñas sintéticas con propiedades antiinflamatorias <sup>202</sup>, de fármacos antiinflamatorios ancestrales, como el salicilato <sup>216,217</sup>, y también se ha estudiado el efecto antiinflamatorio de fármacos que se utilizan ampliamente para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Tal es el caso de la gliburida y la metformina utilizados desde la década de 1990 para el tratamiento de dicha patología. La gliburida, por ejemplo, ha demostrado que es capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 *in vivo*, mientras que la metformina reduce la polarización de macrófagos al fenotipo M1 en el tejido adiposo de ratones obesos y aumenta la polarización hacia el fenotipo M2 <sup>67,115,218</sup>.

Considerando los resultados previamente obtenidos en los diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* que demostraron la capacidad antiinflamatoria de **NATxO**, nos propusimos evaluar su efecto en un modelo murino que desarrolla obesidad y resistencia a la insulina en ratones C57BL/6J inducido por dietas ricas en grasas <sup>219–221</sup>.

Este modelo fue inicialmente descrito por Surwit y colaboradores en 1988 y presenta varias ventajas respecto a otros modelos <sup>222,223</sup>. Los animales ganan de peso y generan una hiperglicemia estable en el tiempo con incremento de manera progresiva de la insulina circulante, indicando un aumento progresivo de la resistencia a la insulina <sup>224</sup>. Esto no sucede con otras cepas de ratones que ganan peso pero no generan resistencia a la insulina <sup>223</sup>. A su vez, es un modelo que permite hacer una traslación directa con el humano ya que la patología se genera únicamente con la dieta, a diferencia de otros modelos que son basados en mutaciones monogénicas en la vía de señalización de la leptina (ratones *ob/ob* y *db/db*) o en la destrucción química de las células beta pancreáticas, los cuales presentan menor relevancia desde el punto de vista clínico <sup>224</sup>.

Los ratones de la cepa C57BL/6J están propensos a desarrollar obesidad cuando son alimentados con dietas ricas en grasas. Hemos observado en nuestro laboratorio que la ganancia de peso de ratones alimentados con dietas ricas en grasas aumenta de manera estadísticamente significativa en comparación a ratones alimentados con dietas normales, incluso desde los 3 días de iniciada la dieta<sup>206</sup>. Este rápido aumento en el peso de los ratones ha sido descrito también por otros autores y está acompañado de evidencias de inflamación en el tejido adiposo<sup>225-228</sup>. En nuestros ensayos, utilizamos una dieta que contiene 42% de grasas (con 0.25% colesterol), a diferencia de una dieta normal que presenta 10% de grasas (normal chow diet), y se asemeja en proporción lipídica a una dieta típica americana o europea donde las grasas corresponden al 36-40% de la energía consumida por la dieta<sup>229</sup>. La alta cantidad de ácidos grasos saturados presentes en la dieta, como el ácido palmítico, induce inflamación mediante la expresión de mediadores pro-inflamatorios en adipocitos y macrófagos, a través de la interacción con TLR4/2 activando NF- $\kappa$ B, JNK y NLRP3<sup>121,230,231</sup>.

***En este contexto, en el presente ensayo, nos propusimos evaluar la capacidad de NATx0 de reducir la resistencia a la insulina generada en los ratones alimentados con dietas ricas en grasas, inhibiendo/reduciendo la respuesta inflamatoria desarrollada durante el transcurso de la obesidad.***

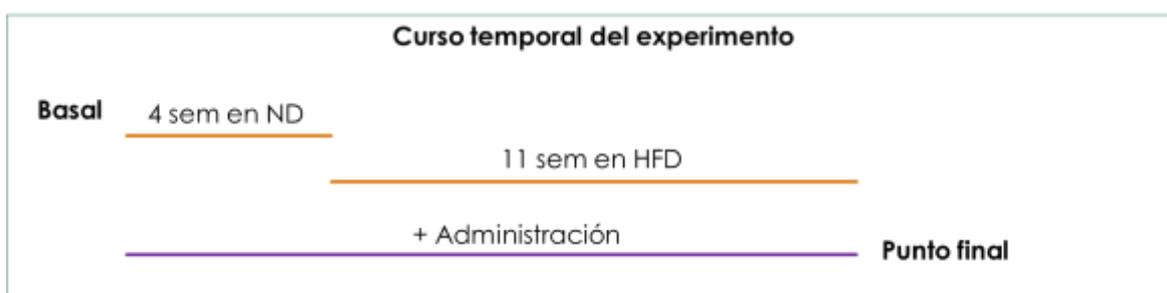
Para ello, se generaron al azar 2 grupos de ratones C57BL/6J (n=4/NATx0; n=5/vehículo; 6 meses de edad) los cuales fueron administrados con vehículo o NATx0, de la siguiente manera:

<i>Grupo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Dieta</i>	<i>Vía de adm.</i>
Control	Vehículo (CMC/Tween 1%)	ND+HFD	Sonda oro-gástrica
NATx0	150 mg/kg	ND+HFD	Sonda oro-gástrica

Ambos grupos fueron administrados por vía oral (lunes a viernes) utilizando sondas orogástricas de plástico, las cuales son mínimamente invasivas. La dosis del compuesto fue seleccionada en base a otros nitroalquenos previamente descritos y preparada de acuerdo a los pesos promedio semanales del grupo, utilizando un vehículo con carboximetilcelulosa (CMC) y Tween 80 al 1%<sup>27</sup>. Este vehículo fue seleccionado en base

a experiencia previa del laboratorio demostrando ser inocuo y que permite disolver una gran batería de compuestos.

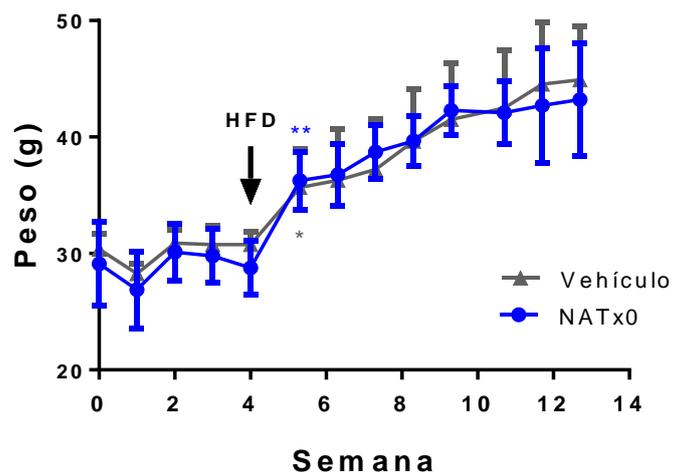
Al comienzo del ensayo los animales fueron alimentados con dieta normal (ND) por 4 semanas en conjunto con la administración del vehículo o **NATx0** (Esquema 7.1). El objetivo de esto fue, por un lado, descartar posibles efectos tóxicos de **NATx0**, y por otro lado, activar las posibles vías de señalización protectoras relacionadas a los nitroalquenos, antes de comenzar la dieta rica en grasas <sup>13,141</sup>. A continuación, los ratones fueron alimentados con dietas ricas en grasas (HFD) por 11 semanas más, en conjunto con la administración del compuesto o vehículo (Esquema 7.1).



**Esquema 7.1.** Diagrama del experimento ensayado para evaluar el efecto de NATx0 durante la obesidad y resistencia a la insulina inducida por dietas ricas en grasas en ratones.

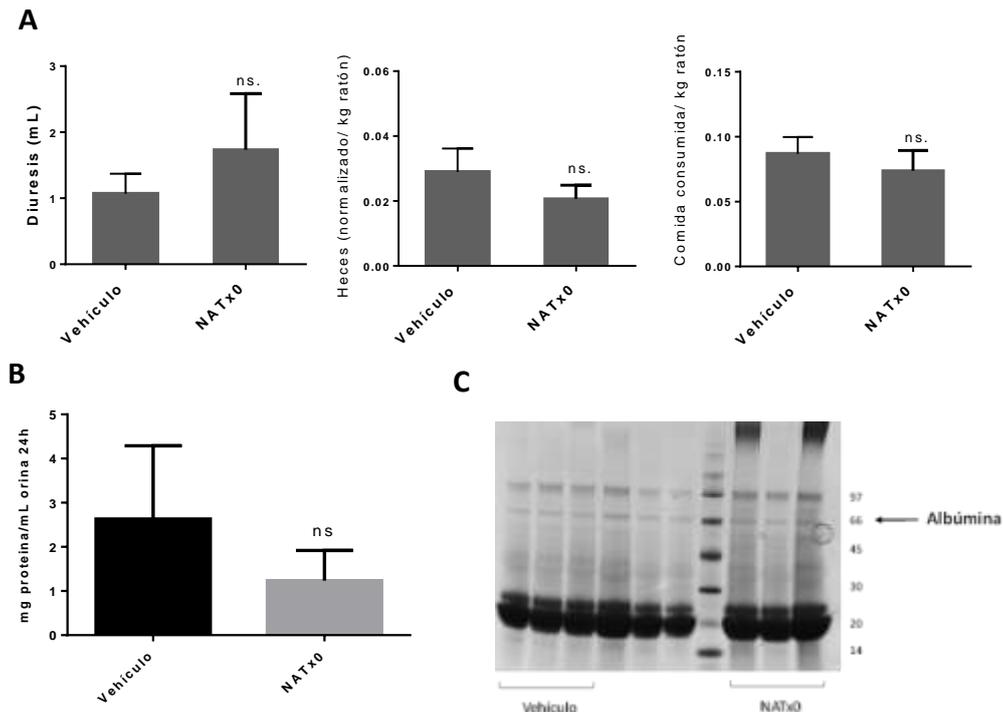
***Durante todo el ensayo, se evaluaron principalmente tres parámetros: control del peso de los animales, medición de las glicemias en ayuno y control de la tolerancia a la glucosa ensayada mediante el test de tolerancia a la glucosa (GTT).***

Durante el transcurso del experimento, no se observaron diferencias significativas en los pesos entre el grupo administrado con **NATx0** en comparación al grupo control. Como era esperado, luego de 1 semana de iniciada la dieta HFD, los ratones aumentaron de peso de manera significativa en cada grupo respecto a su peso previo, incrementando el peso de manera constante durante todo el experimento (Figura 7.43).



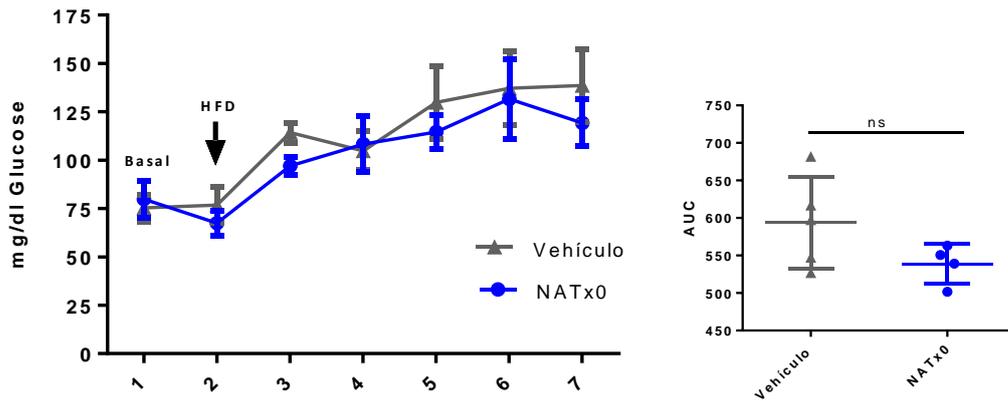
**Figura 7.43.** Evolución de los pesos de los ratones en el transcurso del ensayo. Test de student no pareado de dos colas: Sem. 4 vs sem. 5: NATx0 \*\*= 0.0047; Vehículo \*= 0.0130.

Con el objetivo de determinar posibles efectos tóxicos de **NATx0**, realizamos la medida de diferentes parámetros metabólicos utilizando cajas metabólicas. Esto se realizó luego de 3 semanas de administración mientras los animales se encontraban en dieta normal, encontrándose que no hay diferencias entre los grupos (Figura 7.44A). También se analizó la proteinuria (presencia de proteínas en la orina), la cual puede indicar lesión renal, tampoco encontrándose alterada en comparación al grupo control (Figura 7.44B). Por último, no se detectó presencia de albúmina en las orinas luego del análisis mediante electroforesis en gel de poliácridamida, en ningún caso (Figura 7.44C).



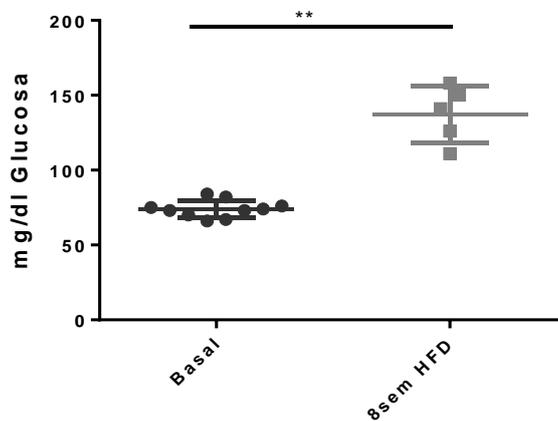
**Figura 7.44 A.** Registro de las cajas metabólicas luego de 3 semanas de administración del compuesto; **B.** Proteinuria en 24h; **C.** Gel de poliacrilamida para la detección de albúmina en las muestras de orina (Peso de la albúmina: 67 KDa).

Como se mencionaba previamente, se realizó el seguimiento de los niveles de glucosa sanguínea en ayuno durante el transcurso del experimento, de manera de determinar el desarrollo de la hiperglicemia en los ratones. Para ello, los ratones fueron puestos en ayuno toda la noche y al día siguiente se les midió la glicemia (con glucómetro) a partir de la extracción de una gota de sangre de la vena de cola. Las glicemias basales antes de comenzar la dieta medidas al comienzo del ensayo fueron aproximadamente 75 mg/dl para ambos grupos, lo cual es una medida normal luego de varias horas de ayuno (Figura 7.45). Luego de introducida la dieta HFD, las glicemias aumentaron en ambos grupos de manera progresiva en el tiempo, encontrándose una tendencia a la baja en los animales administrados con **NATx0** en comparación al grupo vehículo (Figura 7.45), la cual no demostró ser estadísticamente significativa, como se puede observar en el inserto del gráfico de la Figura 7.45. En dicho inserto, se grafican las áreas bajo la curva (AUC) obtenidas para las curvas correspondientes a la evolución de las glicemias en el tiempo para cada grupo, lo cual permite analizar e interpretar todos los puntos de la curva al mismo tiempo <sup>232</sup>.



**Figura 7.45.** Evolución de las glicemias en los grupos de ratones tratados con vehículo o NATx0 durante el transcurso del ensayo. Se grafican las áreas bajo la curva (AUC) de la evolución de las glicemias en el tiempo para cada grupo. Test de student no pareado de dos colas: ns= 0.139.

Sin embargo, se pudo constatar un aumento estadísticamente significativo de las glicemias en el grupo vehículo luego de 8 semanas de administración de la dieta HFD, en comparación a las glicemias basales medidas antes de comenzar la dieta, demostrando el desarrollo de hiperglicemia esperado en el modelo (Figura 7.46).



**Figura 7.46.** Medidas de glicemias en el grupo que fue administrado con vehículo durante el transcurso del ensayo. Test de student no pareado de dos colas: \*\*= 0.0013.

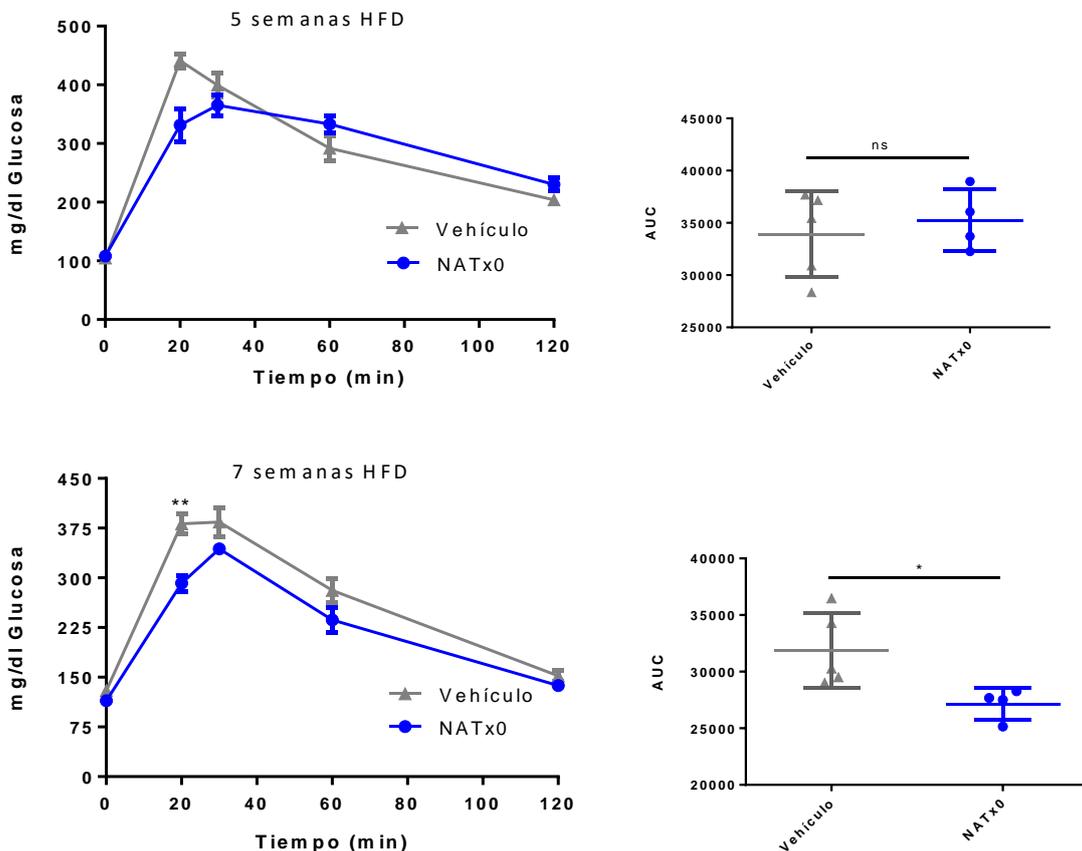
Si bien la medida de la glicemia en ayuno puede brindar información valiosa respecto a la homeostasis de la glucosa en los animales, la tolerancia a la glucosa se estudia comúnmente mediante un ensayo denominado GTT (“glucose tolerance test”). Este ensayo permite observar los cambios en la concentración de la glucosa sanguínea

durante un periodo de tiempo luego de la administración de un bolo de glucosa <sup>232</sup>. De este modo, la subida y bajada de la glucosa sanguínea luego de la administración de glucosa genera una “curva de tolerancia”, que es una medida de la eficiencia de los mecanismos que regulan la concentración de glucosa en la sangre. Esta respuesta puede estar directamente relacionada con la sensibilidad a la insulina en los órganos periféricos, principalmente en músculo, promoviendo la captación de glucosa en dichos órganos e inhibiendo su liberación en el hígado. La liberación de la insulina también puede estar alterada cuando existe disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas durante la diabetes de tipo 2. La glucosa a su vez tiene la habilidad *per se* de estimular su captación e inhibir su liberación bajo condiciones basales o constantes de insulina (mecanismo conocido como efectividad de la glucosa) <sup>232–234</sup>.

Los animales (en ayuno) son aclimatados al lugar donde se va a realizar el ensayo para reducir el estrés, el cual puede afectar los niveles de glucosa. Posteriormente, se mide la glucosa sanguínea basal de cada uno y se administra un bolo de glucosa, lo cual puede realizarse mediante diferentes vías (oral, i.p e i.v). En nuestros ensayos, se administraron vía i.p 1.5 g de glucosa por kg de ratón midiendo la glucosa sanguínea a los 20, 30, 60 y 120 min post-administración. Este ensayo se realizó luego de 2 semanas de iniciada la dieta HFD más el tratamiento y luego a diferentes semanas en el transcurso del ensayo. Durante las primeras semanas de HFD más la administración del compuesto, no pudimos constatar diferencias significativas en el manejo de la glucosa por parte de los ratones tratados con **NATx0**, respecto al grupo control (5 semanas HFD, Figura 7.47).

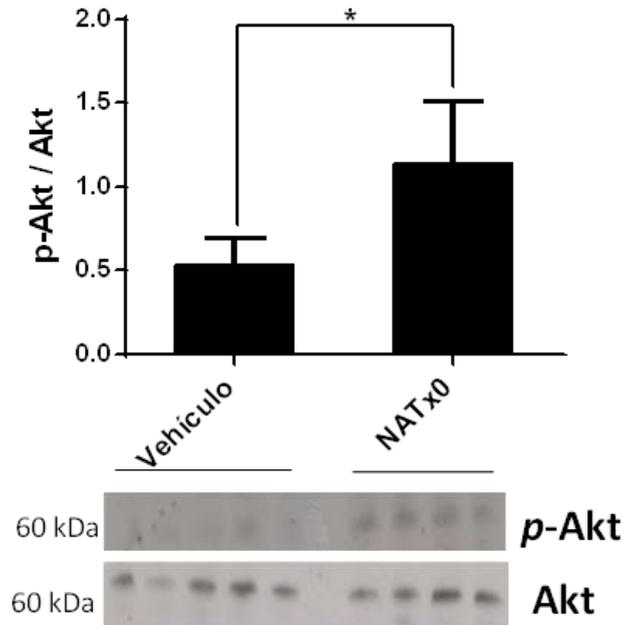
Sin embargo, luego de 7 semanas en HFD, los ratones tratados con **NATx0** presentaron una mejor tolerancia a la glucosa respecto al grupo control, evidenciada por una respuesta más rápida frente al bolo de glucosa (7 semanas HFD, Figura 7.47). Esta diferencia fue estadísticamente significativa cuando se calcularon las áreas bajo la curva correspondientes a las respuestas en el tiempo de cada grupo. También encontramos diferencias significativas en la glucosa sanguínea entre los grupos a los 20 minutos de la inyección de glucosa, indicando que los ratones tratados con **NATx0** responden más rápidamente a la glucosa administrada. Notar también que en los ensayos de GTT mencionados, las glicemias basales entre el grupo control y el grupo **NATx0** son similares, lo cual es esperable por la cantidad de horas de ayuno que estuvieron los animales (aproximadamente 18h durante la noche). Considerando que los ratones son animales

nocturnos y que por lo tanto consumen la mayor parte de sus calorías durante el ciclo oscuro, el ayuno durante la noche seguramente implica que no consuman comida por más de 24h. Esto produce que se movilicen los reservorios de glucosa y se eliminen los depósitos de glicógeno en el hígado, generando un bajo nivel de glucosa basal similar en ambos grupos <sup>234</sup>. Si bien con estos ensayos pudimos demostrar un efecto beneficioso de **NATx0** sobre el manejo de la glucosa en los ratones alimentados con dieta HFD, experimentos adicionales serían necesarios para determinar la resistencia a la insulina generada y los efectos de **NATx0** sobre la misma, como la medición de los niveles de insulina en plasma o el uso de clamps euglicémicos<sup>235</sup>.



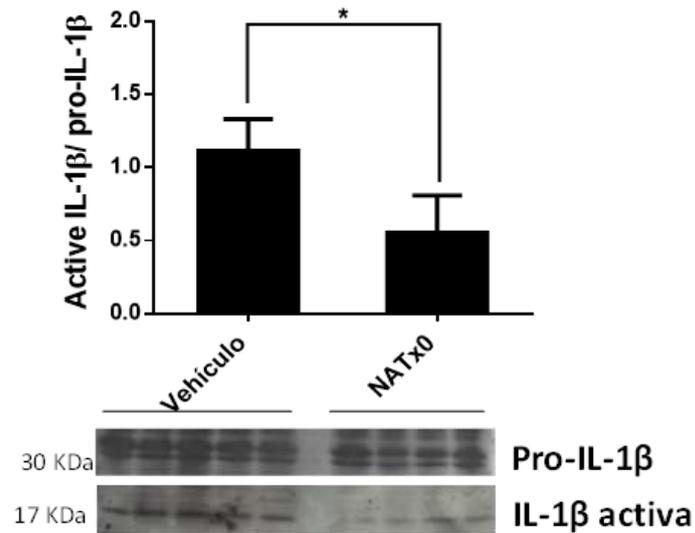
**Figura 7.47.** Test de tolerancia a la glucosa (GTT) luego de 5 semanas y 7 semanas de HFD en conjunto con la administración de NATx0 o vehículo. Test de student no pareado de dos colas: \*\* = 0.0031. Se grafican las áreas bajo la curva (AUC) de las respuestas de ambos grupos de ratones. Test de student no pareado de dos colas: \* = 0.0319.

Al final del experimento, los animales fueron inyectados con insulina y sacrificados para obtener los órganos metabólicamente relevantes para su posterior análisis. La administración de insulina se realizó con el objetivo de estudiar la respuesta de la misma en el músculo de ambos grupos de ratones. Luego de unirse a su receptor, la insulina activa su actividad intrínseca tirosina-quinasa provocando la fosforilación de las proteínas sustrato IRS en los residuos de tirosina. Esto desencadena la fosforilación y activación de Akt, permitiendo la captación de glucosa en el músculo. Sin la estimulación con insulina, es esperable que no haya fosforilación de Akt en la condición de ayuno <sup>219</sup>. De esta manera, con el objetivo de estudiar los efectos de **NATxO** durante el desarrollo de la resistencia a la insulina, estudiamos el nivel de fosforilación de Akt en músculo del grupo control y grupo tratado con **NATxO**, mediante western blot (Figura 7.48). Como se puede observar en la Figura 7.48, se encontró muy baja fosforilación de Akt en los ratones tratados con vehículo en relación a Akt total. Este resultado era esperado ya que los ratones presentaban intolerancia a la glucosa evidenciada en la GTT, sugiriendo que dicha intolerancia podría deberse principalmente a una menor sensibilidad por la insulina. Adicionalmente, se pudo observar un aumento estadísticamente significativo de Akt fosforilada en el músculo de los ratones tratados con **NATxO** en comparación al grupo control, evidenciando cierta protección por parte de **NATxO** al desarrollo de resistencia a la insulina (Figura 7.48). Estos resultados refuerzan los efectos positivos de **NATxO** observados en los estudios *in vivo* de GTT.



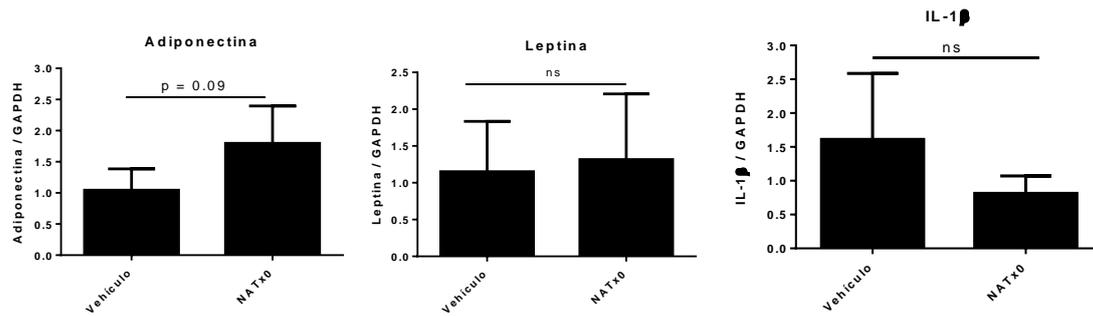
**Figura 7.48.** Análisis por western blot de la fosforilación de Akt (*p*-Akt) y Akt total en músculo de los ratones tratados con vehículo o NATx0 luego de la inyección de insulina. En el gráfico se muestra la cuantificación realizada para las bandas obtenidas en el western blot, calculando la relación de *p*-Akt/Akt. Test de student no pareado de dos colas: \* = 0.0147.

Aún más, encontramos una menor expresión de IL-1 $\beta$  activa en el músculo de los ratones tratados con **NATx0**, en comparación al control (Figura 7.49). Dicha disminución fue estadísticamente significativa cuando se analizó la relación de IL-1 $\beta$  activa respecto a la expresión de pro-IL-1 $\beta$  en cada condición. Este resultado refuerza nuestra hipótesis de que **NATx0** puede reducir la inflamación generada durante la obesidad y por lo tanto disminuir sus consecuencias metabólicas.



**Figura 7.49.** Análisis por western blot de pro-IL-1 $\beta$  e IL-1 $\beta$  en músculo de los ratones tratados con vehículo o NATx0 luego de la inyección de insulina. En el gráfico se muestra la cuantificación realizada para las bandas obtenidas en el western blot, calculando la relación IL-1 $\beta$  activa/pro-IL-1 $\beta$ . Test de student no pareado de dos colas: \* = 0.0131.

Los niveles de expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ , adiponectina y leptina también fueron analizados en el tejido adiposo visceral obtenido de los mismos ratones, mediante qPCR (Figura 7.50). Si bien no encontramos diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los mensajeros, se puede observar una tendencia a una mayor expresión de adiponectina y menor expresión de IL-1 $\beta$  en el grupo tratado con **NATx0**. Esto es esperable ya que un aumento de la adiponectina en tejido adiposo estaría asociada a una disminución de la inflamación a través de la inhibición de NF- $\kappa$ B por parte de esta hormona. Los niveles del mensajero de leptina no parecen estar alterados en el tejido adiposo así como tampoco se encontró alterada la leptina en sangre (no se muestra), lo cual podría ser esperable siendo que los ratones de ambos grupos aumentaron igual de peso.



**Figura 7.50.** Análisis por qPCR de los niveles de ARNm de adiponectina, leptina e IL-1 $\beta$  en tejido adiposo visceral de los ratones tratados con vehículo o NATx0 luego de la inyección de insulina. Test de student no pareado de dos colas: Adiponectina ns= 0.0866; Leptina ns= 0.793; IL-1 $\beta$  n= 0.424.

En suma, en nuestros experimentos *in vivo* pudimos demostrar que **NATx0** actúa como antiinflamatorio pudiendo mejorar las consecuencias metabólicas asociados a la obesidad en un modelo murino de obesidad inducida por dietas ricas en grasas. A su vez, estos resultados refuerzan el potencial uso de antiinflamatorios como estrategia para el tratamiento de estas enfermedades.

## Conclusiones y perspectivas

En este trabajo de tesis doctoral nos planteamos como principal objetivo el desarrollo y evaluación preclínica de nuevas estrategias farmacológicas para el tratamiento de enfermedades relacionadas a la inflamación. Nos enfocamos en el desarrollo de nitroalquenos derivados del  $\alpha$ -Tocoferol, y en particular evaluamos el derivado menos liposoluble obtenido (**NATx0**) como potencial fármaco para el tratamiento de enfermedades metabólicas crónicas, como la resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2, las cuales presentan una base inflamatoria.

La estrategia que utilizamos para el diseño de los compuestos desarrollados en esta tesis consistió en la adición de un grupo nitroalquenilo sobre el anillo cromanol del  $\alpha$ -Tocoferol, un sillar estructural de origen natural y que a su vez puede poseer propiedades beneficiosas *per se*. En particular, los compuestos obtenidos son derivados del análogo hidrosoluble de la Vitamina E, denominado Trolox™, ya que presentan modificaciones a nivel del grupo ácido carboxílico de dicha molécula. En este sentido, los compuestos generados contienen un grupo nitroalquenilo electrofílico introducido en la posición 2 del anillo cromano, con un sustituyente compuesto por una cadena hidrocarbonada de diferente largo (denominados **NATx3**, **NATx6** y **NATx11**) o con un sustituyente hidrógeno (denominado **NATx0**).

El primer hito alcanzado como resultado del trabajo de esta tesis fue la síntesis de **NATx0** en 7 pasos de reacción a partir del éster metílico de Trolox (obtenido en un paso de reacción a partir de reactivos comerciales), con un rendimiento global de 4%. A su vez, la síntesis optimizada permitió la obtención del compuesto a mayor escala para realizar los estudios con animales. La síntesis de los nitroalquenos con una cadena hidrocarbonada de largo variable, **NATx3**, **NATx6** y **NATx11**, se realizó en base a la experiencia previa adquirida de la síntesis de **NATx0**, con algunos cambios en las condiciones de reacción ensayadas. De este modo, **NATx3** se obtuvo con un rendimiento global de síntesis de 13%, **NATx6** de 8% y **NATx11** de 3%, luego de 6 pasos de reacción a partir del éster metílico de Trolox. La estrategia de obtención de estos nitroalquenos no fue ensayada para la obtención de **NATx0**, por lo que sería interesante a futuro ensayar dichas condiciones (mesilación del nitroaldol y eliminación en un solo paso) para mejorar

los rendimientos globales de obtención de **NATxO**. Destacamos también que los nitroalquenos aquí generados son altamente estables en heladera por un largo periodo de tiempo.

Siendo que los compuestos aquí generados presentan la estructura cromanol del  $\alpha$ -Tocoferol intacta, mediante esta estrategia podríamos conjugar en una misma molécula los efectos antioxidantes de dicha estructura junto con los efectos antiinflamatorios y citoprotectores de los nitroalquenos. Si bien en esta tesis no evaluamos las propiedades antioxidantes de los compuestos híbridos aquí generados, previamente pudimos determinar que, en el caso del NATOH, la capacidad antioxidante no es afectada por la sustitución del grupo nitroalquenilo respecto al  $\alpha$ -Tocoferol <sup>27</sup>. De todas maneras, no encontramos efectos beneficiosos con  $\alpha$ -Tocoferol en el modelo *in vivo* con ratones ApoE<sup>-/-</sup> a las dosis ensayadas, confirmando que es el grupo nitroalquenilo el responsable de reducir la aterosclerosis en dicho modelo. A su vez, en diferentes ensayos clínicos llevados a cabo a nivel mundial no se pudo demostrar un efecto sustancialmente beneficioso de la vitamina E en reducir el riesgo de padecer aterosclerosis <sup>236</sup>. Sin embargo, desde el punto de vista inflamatorio, se ha observado una reducción significativa en la inflamación subclínica en el suero de adultos tratados con un suplemento de  $\alpha$ -Tocoferol a dosis  $\geq 500$  mg/día (niveles disminuidos de CRP, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) <sup>237</sup>. En este sentido, sería interesante evaluar a futuro el impacto que posee el grupo cromanol de nuestras moléculas como scavenger de radicales libres durante el desarrollo de la inflamación crónica generada durante las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad.

En esta tesis evaluamos los efectos antiinflamatorios de **NATxO** relacionados a la activación de NF- $\kappa$ B, tanto *in vitro* como *in vivo*. En los ensayos *in vitro* pudimos demostrar que **NATxO** inhibe la expresión génica y la liberación de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B en macrófagos estimulados con LPS. En dichos experimentos, el Trolox no demostró poseer efectos antiinflamatorios a las mismas dosis o los efectos fueron significativamente menores, indicando que las propiedades antiinflamatorias de **NATxO** son fundamentalmente dependientes del grupo nitroalquenilo. Aún más, cuando visualizamos la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en macrófagos estimulados con LPS mediante microscopía de fluorescencia, se pudo observar una

inhibición de la translocación nuclear de dicha subunidad en presencia de **NATx0**. Estas observaciones nos indican que la inhibición de NF- $\kappa$ B por parte de **NATx0** podría estar mediada por la modificación postraduccional de la subunidad p65 a través de la alquilación de residuos de cisteína en su dominio de unión al ADN. En el mismo sentido, la inducción de enzimas detoxificantes dependientes de keap1, observada en macrófagos tratados con **NATx0**, podría estar mediada por reacciones de adición de Michael con residuos de cisteína en keap1 provocando la disociación con Nrf2 y por lo tanto su translocación al núcleo. Con el objetivo de ahondar más en el estudio de la capacidad antiinflamatoria de **NATx0**, evaluamos su efecto sobre la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos, el cual posee un rol fundamental en el desarrollo de la inflamación crónica. En dichos estudios, pudimos observar que existe una inhibición dosis-dependiente en la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  cuando los macrófagos fueron tratados con **NATx0**, tanto durante la inducción de NF- $\kappa$ B (primera señal) como durante la etapa del ensamblado del inflamasoma (segunda señal). En este sentido, pudimos comprobar que existe una inhibición parcial de la oligomerización de ASC cuando **NATx0** fue agregado durante la etapa del ensamblado del inflamasoma, lo cual nos podría indicar que **NATx0** interactúa con otras proteínas además de NF- $\kappa$ B, directamente con ASC y/o con otras proteínas relevantes del complejo, como NLRP3. De hecho, otros autores han comprobado previamente que un nitroalqueno derivado del  $\beta$ -nitroestireno (MNS) es capaz de unirse tanto al dominio NOD como al dominio LRR de NLRP3 provocando la inhibición en la oligomerización de NLRP3 y de su actividad ATPasa, a través de la alquilación de uno o más de sus residuos de cisteína<sup>180,238</sup>. Cabe destacar que otro potencial blanco de **NATx0** es caspasa-1, la cual contiene una cisteína reactiva en su centro catalítico y una histidina que modula dicha actividad<sup>239</sup>. Estudios *in vitro* preliminares realizados en nuestro laboratorio utilizando caspasa-1 recombinante, demostraron que **NATxMe** no es capaz de inhibir la actividad de caspasa-1, aunque sí se observó una inhibición con el nitroalqueno derivado del ácido oleico, OA-NO<sub>2</sub><sup>174</sup>. De esta manera, si bien en esta tesis no estudiamos la posible interacción directa de **NATx0** con caspasa-1, no podemos descartar que efectivamente exista dicha interacción, particularmente si ponemos en consideración que la capacidad de inhibición de IL-1 $\beta$  por parte de **NATx0** es mayor a la inhibición de la oligomerización de ASC (paso previo a la activación de caspasa-1). En este sentido, a futuro sería interesante evaluar si **NATx0**

inhibe caspasa-1 en nuestros experimentos así como también sería interesante estudiar si existe una interacción directa con NLRP3. También es de destacar que el grupo nitroalquenilo es fundamental para la inhibición de NLRP3 tanto en el caso de MNS<sup>180</sup>, como de **NATxMe**<sup>174</sup>, por lo que consideramos que los efectos sobre el inflamasoma observados con **NATxO** son también dependientes del nitroalqueno.

Los ensayos de inflamación aguda inducida por daño en larvas transgénicas de pez cebra nos permitieron acercarnos al estudio de la capacidad antiinflamatoria *in vivo* de **NATxO**. En dichos experimentos, **NATxO** inhibió el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de daño a concentraciones ampliamente menores que las concentraciones ensayadas de Trolox o del antiinflamatorio convencional ibuprofeno. Se ha descrito que la supresión de IL-1 $\beta$  en neutrófilos, utilizando inhibidores de caspasa-1, antagonistas de P2X7 o mediante el knockdown del gen para IL-1 $\beta$  en pez cebra, resulta en una atenuación en la migración de neutrófilos al sitio de daño<sup>240,241</sup>. A su vez, la activación de los neutrófilos y su supervivencia está altamente regulado por NF- $\kappa$ B<sup>242</sup>. Por lo tanto, **NATxO** podría estar modulando la respuesta inflamatoria en el pez cebra a través de dichas vías. Aún más, observamos una alta capacidad antiinflamatoria *in vivo* de **NATxO** en un modelo de inflamación aguda inducida por LPS en ratón, en el cual se genera IL-1 $\beta$  por la activación de NLRP3, *in situ* y a nivel sistémico.

Por último, evaluamos los efectos crónicos de **NATxO** en un modelo de ratón con obesidad y resistencia a la insulina inducida por dietas ricas en grasas, que se desarrolla acompañado de un estado de inflamación crónico. A diferencia de la inflamación aguda la cual desaparece una vez eliminado el agente causante de la misma, la inflamación crónica se presenta como un proceso gradual, acumulativo, de bajo nivel, que se torna perjudicial con el paso del tiempo. Crecientes evidencias demuestran que el desarrollo del síndrome metabólico en pacientes obesos está directamente relacionado con los procesos inflamatorios que subyacen durante la obesidad. En este sentido, la administración crónica de **NATxO** en ratones alimentados con dietas ricas en grasas demostró poseer un impacto favorable sobre el desarrollo de la intolerancia a la glucosa generada en el modelo. Esto pudo ser demostrado mediante los experimentos de tolerancia a la glucosa, donde los ratones tratados con **NATxO** en conjunto con la alimentación HFD, manejaron más favorablemente la glucosa administrada que los

ratones control alimentados con la misma dieta. Dicho efecto fue posteriormente demostrado analizando los niveles de fosforilación de Akt en músculo luego de una exposición a insulina, paso clave en la señalización de la insulina en las células. Encontramos que los ratones tratados con **NATxO** presentaban una mayor fosforilación de Akt en comparación a los ratones control, lo cual se acompañó de niveles inferiores de IL-1 $\beta$  activa en el mismo tejido. Este resultado demuestra que los efectos observados con **NATxO** *in vivo* son al menos parcialmente debidos a la inhibición del inflammasoma NLRP3.

Como perspectivas que nos surgen de estos ensayos creemos que sería interesante evaluar en mayor profundidad los efectos de **NATxO** sobre la resistencia a la insulina y los mecanismos por los cuales actúa, por ejemplo evaluando el impacto de esta molécula sobre PPAR- $\gamma$ , blanco de algunos fármacos antidiabéticos como las TZDs y de los ácidos grasos nitrados. A su vez, sería relevante estudiar la capacidad antiinflamatoria de los otros nitroalquenos aquí generados, los cuales podrían presentar una farmacocinética/farmacodinamia diferente en el modelo de obesidad utilizado e incluso también sería interesante evaluar sus propiedades en el modelo murino ApoE<sup>-/-</sup> como potenciales estrategias para el tratamiento de la aterosclerosis.

En suma, este trabajo describe una potencial nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades relacionadas a la inflamación y provee evidencias de las posibilidades de impacto de un antiinflamatorio no-convencional sobre enfermedades metabólicas de gran incidencia, como la diabetes de tipo 2. De hecho, este trabajo abrió camino hacia la búsqueda de nuevos sillares estructurales relevantes que transporten el grupo nitroalquenilo hacia diferentes tejidos/órganos, permitiendo potenciar los efectos beneficiosos encontrados en esta tesis e incluso ganando nuevos efectos de alto impacto para la salud humana.

# **ANEXO**

## Alcance de la tesis

### **Índice**

**Parte 1)** Trabajos publicados y patentes que surgen de este trabajo

**Parte 2)** Participación en otros artículos científicos durante la presente tesis

**1) Trabajos publicados y patentes que surgen de este trabajo.**

## 2) Participación en otros artículos científicos durante la presente tesis

### “A novel nitroalkene- $\alpha$ -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice”

#### Resumen del trabajo.

En este trabajo, se diseñaron compuestos híbridos del  $\alpha$ -tocoferol conteniendo un grupo nitroalqueno antiinflamatorio como nueva estrategia farmacológica para la prevención y/o tratamiento de la aterosclerosis. La lesión aterosclerótica está formada por un núcleo adiposo (colesterol, ésteres de colesterol, y sus productos de oxidación), infiltración de leucocitos (macrófagos, linfocitos T, entre otros) y una capa fibrosa formada por células musculares lisas vasculares, siendo la inflamación un evento clave para su desarrollo<sup>243,244</sup>. En el contexto de la enfermedad, se promueve la formación de modificaciones proaterogénicas en las partículas de LDL que provocan su acumulación en la pared arterial así como también la diferenciación de macrófagos, activación de otras células inmunes, disfunción endotelial y estrés oxidativo<sup>243</sup>. Considerando dichos efectos patogénicos, se diseñó una nueva estrategia farmacológica la cual conjuga la estructura del  $\alpha$ -tocoferol con un grupo nitroalqueno (**NATOH**). Esta estrategia permitiría cargar a las lipoproteínas con el farmacóforo nitroalqueno y que la LDL actúe como un transportador del compuesto bioactivo a la placa de ateroma.

Los estudios de incorporación *ex vivo* del **NATOH** en lipoproteínas LDL humanas demostraron que el **NATOH** mantiene sus propiedades electrofílicas luego de incorporado en las LDL así como también en liposomas. A su vez, se observó que la capacidad antioxidante del **NATOH** es similar a su precursor  $\alpha$ -Tocoferol demostrando que al añadir un grupo nitroalqueno se puede transformar a la vitamina E en una molécula electrofílica manteniendo su capacidad antioxidante. Debido a que la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B se encuentra activada durante la aterosclerosis, inicialmente se estudió la habilidad del **NATOH** de inhibir NF- $\kappa$ B. Se encontró que inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1) en macrófagos murinos y humanos, encontrando también una inhibición de la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo en presencia

de **NATOH**, pero no de  $\alpha$ -Tocoferol. En este sentido, el **NATOH** demostró poseer importantes propiedades antiinflamatorias ya que a su vez inhibe la secreción de IL-1 $\beta$  modulada por el inflamasoma NLRP3 sobre macrófagos humanos de manera dosis-dependiente. En estudios ex vivo de incorporación en lipoproteínas LDL de origen humano se encontró que el **NATOH** se incorpora de manera dosis-dependiente a las mismas, comportándose como un análogo del  $\alpha$ -Tocoferol. A su vez, se encontró su incorporación en las partículas lipoproteicas de VLDL/LDL, y no unido a albúmina, en el plasma de ratones knockout para ApoE, el cual corresponde a uno de los modelos murinos más utilizados para estudiar la enfermedad de aterosclerosis. En este modelo, la delección del gen apoE provoca un importante incremento de los niveles de LDL y VLDL, debido a la deficiencia en eliminar estas lipoproteínas del plasma, generando hipercolesterolemia y el desarrollo espontáneo de lesiones ateroscleróticas de manera similar al ser humano. De este modo, se estudió la capacidad de **NATOH** de actuar sobre las lesiones ateroscleróticas en dicho modelo, encontrándose inicialmente que el mismo se acumula en las placas de ateroma de los arcos aórticos, donde hay un alto contenido de placas, así como también en otras regiones de bajo contenido. Finalmente, la administración oral de **NATOH** en ratones ApoE<sup>-/-</sup> alimentados con dietas ricas en grasas produjo una disminución en la aparición de placas de ateroma, en comparación a su precursor  $\alpha$ -Tocoferol, demostrando que la presencia del grupo nitroalqueno mejora significativamente las propiedades antiaterogénicas naturales del  $\alpha$ -Tocoferol. Aún más, la administración de **NATOH** produjo la disminución de marcadores proinflamatorios dependientes de NF- $\kappa$ B en los sitios de lesión, incluyendo IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y de las moléculas de adhesión VCAM e ICAM, demostrando las propiedades antiinflamatorias in vivo del compuesto.

## **“A nitroalkene derivative of salicylate alleviates diet-induced obesity by activation of creatine-dependent thermogenesis”**

### **Resumen del trabajo.**

Este trabajo involucra el estudio de un nitroalqueno montado en un importante y conocido fármaco de uso ancestral en medicina: el ácido salicílico. Si bien sus principales propiedades antiinflamatorias fueron inicialmente atribuidas a la inhibición irreversible de la ciclooxigenasa 1 por parte del ácido acetilsalicílico, su forma acetilada, en las últimas décadas se ha demostrado que el salicílico inhibe NF- $\kappa$ B a dosis altas y activa de manera alostérica a AMPK. Esta quinasa es un importante regulador metabólico y sensor de la carga energética del organismo. Además, existen evidencias clínicas que su dímero (Salsalato) posee efectos beneficiosos frente a la obesidad, diabetes de tipo 2 y enfermedades cardiovasculares <sup>217,245,246</sup>. En base a esto, se generó un nitroalqueno derivado del salicilato, el cual se denominó **SANA**. Este compuesto demostró poseer propiedades antiinflamatorias similares a los nitroalquenos previamente obtenidos por el grupo, que incluyen la inhibición de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, disminución del reclutamiento de neutrófilos al sitio de daño en el modelo de inflamación aguda inducida por daño en pez cebra y disminución en la liberación de IL-1 $\beta$  en el modelo de inflamación aguda inducida por LPS en ratón, en todos los casos superando el efecto de su precursor salicilato. Sin embargo, el **SANA** demostró presentar otras propiedades beneficiosas, no observadas con el resto de los nitroalquenos: reduce la obesidad preexistente y previene el desarrollo de obesidad en el modelo de obesidad inducida por dietas en ratón. Este resultado no puede ser explicado por los mecanismos de acción ya conocidos de los nitroalquenos ni del salicilato, por lo tanto el grupo de trabajo ha dedicado muchos esfuerzos en conocer las vías de acción de este nuevo compuesto que redunden en dichas propiedades.

Inicialmente, se comprobó que estos efectos no son dependientes del consumo de comida, ya que los ratones tratados con **SANA** consumen la misma cantidad de comida que los ratones tratados con vehículo. Se evidenció una disminución en la acumulación de grasa en los tejidos adiposos analizados de los ratones tratados con **SANA**, en paralelo de un aumento en el porcentaje de masa magra, en comparación a los ratones tratados con vehículo. En conjunto con esto, se comprobó que **SANA** puede prevenir las

consecuencias metabólicas asociadas a la obesidad en el modelo, incluyendo la prevención al desarrollo de la esteatosis hepática y protección contra la hiperglicemia. A su vez, el **SANA** protege frente a la intolerancia a la glucosa, de modo que genera una respuesta en los ratones indistinguible del grupo control alimentado con ND y significativamente mejor que el grupo de ratones alimentados con HFD y tratados con el precursor salicilato. Aún más, en experimentos donde se estableció la obesidad en una primera instancia (5 semanas de HFD) y luego se comenzó la administración de los compuestos, los ratones tratados con **SANA** perdieron peso, presentaron niveles de glicemia significativamente más bajos y mejor tolerancia a la glucosa que el grupo tratado con vehículo.

Los efectos mediados por **SANA** en el modelo de obesidad en ratón están relacionados con la estimulación de la termogénesis no tiritante. El tejido adiposo pardo es un target atractivo a la hora de combatir la obesidad y de sus enfermedades asociadas, debido a su capacidad de liberar energía en forma de calor en lugar de almacenarla como grasa, mecanismo que forma parte de la termogénesis adaptativa <sup>247</sup>. Los adultos humanos presentan varias zonas del tejido metabólicamente activo y se sugiere que dicho tejido tiene un rol fundamental en el mantenimiento de un fenotipo metabólicamente sano. De hecho, el trasplante de tejido adiposo pardo en ratones disminuye significativamente el peso corporal y mejora la sensibilidad a la insulina <sup>248</sup>. Este tejido se caracteriza por poseer un alto contenido de mitocondrias (que producen el color marrón característico del tejido), las cuales mediante la proteína desacoplante-1 (UCP-1), utilizan la energía liberada por la oxidación de los ácidos grasos y que no está acoplada a la fosforilación oxidativa, para la generación de calor. A su vez, el tejido adiposo blanco puede transformarse hacia un fenotipo del “tipo pardo” (proceso que se conoce como amarronamiento o browning) mediante la exposición prolongada al frío o por la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo cual tiene consecuencias metabólicas beneficiosas <sup>249</sup>. A su vez, se ha demostrado una estimulación de la actividad termogénica en tejido adiposo en humanos, incluso luego de una breve exposición al frío <sup>250,251</sup>. En este sentido, se ha demostrado que el salicilato promueve la termogénesis en tejido adiposo pardo de manera dependiente e independiente de UCP-1 <sup>216,252-254</sup>.

Nuestros resultados demuestran que **SANA** estimula el desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y la termogénesis no tiritante en el tejido adiposo blanco,

siendo un posible mecanismo de protección frente a la obesidad en el ratón. Este efecto podría estar mediado a través de un mecanismo recientemente descrito que involucra el metabolismo de la creatina<sup>255,256</sup>. **SANA** activa genes reguladores de la termogénesis-dependiente de creatina, como las quinasas Ckb y Ckmt2, y de enzimas relacionadas a la síntesis de creatina en tejido adiposo blanco y marrón así como también genera un efecto de “*beiging*” en el tejido adiposo blanco.

## Bibliografía

1. Van Gaal, L. F., Mertens, I. L. & De Block, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* vol. 444 875–880 (2006).
2. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-. )*. **259**, 87–91 (1993).
3. Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Cell Metabolism Review NF- $\kappa$ B, Inflammation, and Metabolic Disease. (2011)  
doi:10.1016/j.cmet.2010.12.008.
4. Choi, A. J. S. & Ryter, S. W. Inflammasomes: Molecular regulation and implications for metabolic and cognitive diseases. *Molecules and Cells* vol. 37 441–448 (2014).
5. Robbins, G. R., Wen, H. & Ting, J. P. Y. Inflammasomes and metabolic disorders: Old genes in modern diseases. *Molecular Cell* vol. 54 297–308 (2014).
6. Furman, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* doi:10.1038/s41591-019-0675-0.
7. Villacorta, L. *et al.* In situ generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation. *Redox Biol.* **15**, 522–531 (2018).
8. Rudolph, V. *et al.* Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **85**, 155–166 (2010).
9. Freeman, B. A. *et al.* Nitro-fatty acid formation and signaling. *Journal of Biological Chemistry* vol. 283 15515–15519 (2008).
10. Batthyany, C. *et al.* Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**, 20450–20463 (2006).
11. Schopfer, F. J. *et al.* Nitrated Fatty Acids: Endogenous Anti-inflammatory Signaling Mediators \* □ S Taixing Cui †1. (2006)  
doi:10.1074/jbc.M603357200.
12. Kansanen, E. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids activate Nrf2 by a Keap1 cysteine 151-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 14019–14027 (2011).
13. Kansanen, E. *et al.* Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-

- fatty acids in human endothelial cells: Identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J. Biol. Chem.* **284**, 33233–33241 (2009).
14. AL, H. *et al.* Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E7768–E7775 (2018).
  15. Mollenhauer, M. *et al.* Nitro-fatty acids suppress ischemic ventricular arrhythmias by preserving calcium homeostasis. *Sci. Reports 2020 101* **10**, 1–11 (2020).
  16. FIRSTx - A Study of Oral CXA-10 in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03422510?term=nitro+fatty+acid&rank=3>.
  17. Open-Label Safety, Tolerability, PK Study of IV CXA-10 Emulsion in Subjects in Chronic Kidney Injury - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02248051>.
  18. Rudolph, T. K. *et al.* Nitrated fatty acids suppress angiotensin II-mediated fibrotic remodelling and atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **109**, 174–184 (2016).
  19. Klinke, A. *et al.* Protective effects of 10-nitro-oleic acid in a hypoxia-induced murine model of pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **51**, 155–162 (2014).
  20. Zhang, J. *et al.* Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* **107**, 540–548 (2010).
  21. Liu, H. *et al.* Nitro-oleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **295**, F942 (2008).
  22. Wang, H. *et al.* Nitro-oleic acid protects against endotoxin-induced endotoxemia and multiorgan injury in mice. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **298**, (2010).
  23. Rudolph, T. K. *et al.* Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 938–945 (2010).
  24. Kelley, E. E. *et al.* Fatty acid nitroalkenes ameliorate glucose intolerance and pulmonary hypertension in high-fat diet-induced obesity. *Cardiovasc. Res.* **101**, 352–363 (2014).
  25. Rudolph, V. *et al.* Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation,  $\beta$ -oxidation, and protein adduction. *J. Biol. Chem.* **284**, 1461–1473 (2009).

26. Rodriguez-Duarte, J. *et al.* Electrophilic nitroalkene-tocopherol derivatives: synthesis, physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory signaling responses. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
27. Rodriguez-Duarte, J. *et al.* A novel nitroalkene- $\alpha$ -tocopherol analogue inhibits inflammation and ameliorates atherosclerosis in Apo E knockout mice. *Br. J. Pharmacol.* (2019) doi:10.1111/bph.14561.
28. Dapuelto, R. *et al.* A novel nitroalkene vitamin E analogue inhibits the NLRP3 inflammasome and protects against inflammation and glucose intolerance triggered by obesity. *Redox Biol.* **39**, 101833 (2021).
29. Cardiovascular diseases. *World Health Organization*. [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1) (2017).
30. Uruguay. Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular.
31. Uruguay. Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular - Informes. *Informe mortalidad 2015* (2015).
32. Grundy, S. M., Pasternak, R., Greenland, P., Smith, S. & Fuster, V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**, 1348–1359 (1999).
33. Han, T. S. & Lean, M. E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc. Dis.* **5**, 204800401663337 (2016).
34. Obesity and overweight. *World Health Organization*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2020).
35. Ledford, H. More people obese than underweight. *Nature* (2016) doi:10.1038/nature.2016.19682.
36. Risk Factor Collaboration, N. *Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)\**. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) (2016) doi:10.1016/S0140-6736(16)30054-X.
37. Fildes, A. *et al.* Probability of an obese person attaining normal body weight: Cohort study using electronic health records. *Am. J. Public Health* **105**, e54–e59 (2015).
38. Berry, R., Jeffery, E. & Rodeheffer, M. S. Weighing in on adipocyte

precursors. *Cell Metabolism* vol. 19 8–20 (2014).

39. Saklayen, M. G. HYPERTENSION AND OBESITY (E REISIN, SECTION EDITOR) The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. (1906)  
doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
40. About Metabolic Syndrome | American Heart Association. *American Heart Association* <https://www.heart.org/en/health-topics/metabolic-syndrome/about-metabolic-syndrome> (2016).
41. Reaven, G. M. The insulin resistance syndrome: Definition and dietary approaches to treatment. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 391–406 (2005).
42. Czech, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes.  
doi:10.1038/nm.4350.
43. Ré Mie Boucher, J., Kleinridders, A. & Kahn, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States.  
doi:10.1101/cshperspect.a009191.
44. Gross, D. N., Heuvel, A. P. J. van den & Birnbaum, M. J. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene 2008 2716* **27**, 2320–2336 (2008).
45. SB, B. *et al.* Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab.* **7**, 125–134 (2008).
46. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 367–377 (2008).
47. Hammarstedt, A., Gogg, S., Hedjazifar, S., Nerstedt, A. & Smith, U. Impaired Adipo-genesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev* **98**, (1911).
48. Kimmel, A. R. & Sztalryd, C. The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* **36**, 471–509 (2016).
49. Puri, V. *et al.* Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. (2008).
50. RH, U. Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* **53**, 319–336 (2002).
51. Lotta, L. A. *et al.* Integrative genomic analysis implicates limited peripheral adipose storage capacity in the pathogenesis of human insulin resistance. *Nat. Genet.* **49**, 17–26 (2017).
52. RH, U. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* **44**, 863–870 (1995).

53. Boden, G. Free fatty acids - The link between obesity and insulin resistance. *Endocr. Pract.* **7**, 44–51 (2001).
54. Boden, G. Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **111**, 241–248 (1999).
55. PG, L. *et al.* Lipoatrophic diabetes in *Irs1(-/-)/Irs3(-/-)* double knockout mice. *Genes Dev.* **16**, 3213–3222 (2002).
56. O, S., H, V., O, T. & O, P. Studies of insulin resistance in congenital generalized lipodystrophy. *Acta Paediatr. Suppl.* **413**, 29–38 (1996).
57. Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y. & Barbarash, O. Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* vol. 12 191–198 (2019).
58. Nigro, E. *et al.* New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed Research International* vol. 2014 (2014).
59. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 2 1–9 (2017).
60. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 367–377 (2008).
61. Wu, H. & Ballantyne, C. M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ. Res.* **126**, 1549–1564 (2020).
62. Soedono, S. & Cho, K. W. Molecular Sciences Adipose Tissue Dendritic Cells: Critical Regulators of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance. (2021) doi:10.3390/ijms22168666.
63. Winer, S. *et al.* Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2629–2635 (2009).
64. Fabbrini, E. *et al.* Association between specific adipose tissue CD4+ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* **145**, (2013).
65. Reynolds, C. M. *et al.* Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 1212–1222 (2012).
66. Feuerer, M. *et al.* Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems. *Nat. Med.* **15**, 930 (2009).
67. Rodriguez, A. Estudio de la proteína TMEM176B como reguladora del inflammasoma en un contexto de obesidad y síndrome metabólico.

(Maestría en Ciencias Médicas-PROINBIO- Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay, 2019).

68. Nishimura, S. *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* **15**, 914–920 (2009).
69. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 11 85–97 (2011).
70. Mancuso, P. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and Therapy* vol. 5 47–56 (2016).
71. Chen, L., Chen, R., Wang, H. & Liang, F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. (2015) doi:10.1155/2015/508409.
72. Landecho, M. F. *et al.* Relevance of leptin and other adipokines in obesity-associated cardiovascular risk. *Nutrients* vol. 11 (2019).
73. Guilherme, A., Virbasius, J. V, Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 367–377 (2008).
74. Bigornia, S. J. *et al.* Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. *Nutr. Diabetes* **2**, (2012).
75. Chylikova, J., Dvorackova, J., Tauber, Z. & Kamarad, V. M1/M2 macrophage polarization in human obese adipose tissue. *Biomed. Pap.* **162**, 79–82 (2018).
76. Morris, D. L., Singer, K. & Lumeng, C. N. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. doi:10.1097/MCO.0b013e328347970b.
77. Kratz, M. *et al.* Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab.* **20**, 614–625 (2014).
78. Donath, M. Y. & Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 11 98–107 (2011).
79. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* vol. 444 860–867 (2006).
80. DeFronzo, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, (2015).
81. White, M. F. invited review IRS proteins and the common path to diabetes. (2002) doi:10.1152/ajpendo.

82. Paz, K. *et al.* A Molecular Basis for Insulin Resistance ELEVATED SERINE/THREONINE PHOSPHORYLATION OF IRS-1 AND IRS-2 INHIBITS THEIR BINDING TO THE JUXTAMEMBRANE REGION OF THE INSULIN RECEPTOR AND IMPAIRS THEIR ABILITY TO UNDERGO INSULIN-INDUCED TYROSINE PHOSPHORYLATION\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* vol. 272 (1997).
83. Hotamisligil, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science (80- )*. **271**, 665–668 (1996).
84. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. & White, M. F. The c-Jun NH 2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser 307 \*. *Journal of Biological Chemistry* vol. 275 (2000).
85. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* vol. 140 821–832 (2010).
86. Man, S. M. & Kanneganti, T.-D. Regulation of inflammasome activation. doi:10.1111/imr.12296.
87. Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annual Review of Immunology* vol. 27 229–265 (2009).
88. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. Inflammasomes in health and disease. *Nat. 2012 4817381* **481**, 278–286 (2012).
89. Franchi, L., Muñoz-Planillo, R. & Núñez, G. Sensing and Reacting to Microbes via the Inflammasomes. doi:10.1038/ni.2231.
90. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P. Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine* vol. 21 677–687 (2015).
91. Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Leading Edge Review Mechanisms and Functions of Inflammasomes. (2014) doi:10.1016/j.cell.2014.04.007.
92. Yin, Y. *et al.* Inflammasomes: Sensors of metabolic stresses for vascular inflammation. *Frontiers in Bioscience* vol. 18 638–649 (2013).
93. Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. & He, Y. Molecular Sciences The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. (2019) doi:10.3390/ijms20133328.
94. Bauernfeind, F. G. *et al.* Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791 (2009).

95. Kim, S. J. *et al.* Corosolic acid ameliorates acute inflammation through inhibition of IRAK-1 phosphorylation in macrophages. *BMB Rep.* **49**, 276–281 (2016).
96. Juliana, C. *et al.* Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* **287**, 36617–36622 (2012).
97. Song, N. *et al.* NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol. Cell* **68**, 185–197.e6 (2017).
98. Zhong, Z. *et al.* New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **560**, 198–203 (2018).
99. Grant, R. W. & Dixit, V. D. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front. Immunol.* **4**, 50 (2013).
100. Jin, C. & Flavell, R. A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Journal of Clinical Immunology* vol. 30 628–631 (2010).
101. Pétrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* **14**, 1583–1589 (2007).
102. Abais, J. M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K. M. & Li, P.-L. Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector? *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 1111 (2015).
103. Zheng, D., Liwinski, T. & Elinav, E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* **2020 61 6**, 1–22 (2020).
104. K, T. & H, H. The inflammasome and its regulation. *Crit. Rev. Immunol.* **34**, 41–80 (2014).
105. CA, D. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519–550 (2009).
106. K, P., LC, B. & MCH, C. Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
107. Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S. & Kanneganti, T.-D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Gasdermin-Induced Pyroptosis. *Annu. Rev. Immunol.* **38**, 567 (2020).
108. Dixit, V. D. Nlrp3 Inflammasome Activation in Type 2 Diabetes: Is It Clinically Relevant? doi:10.2337/db12-1115.
109. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. Thioredoxin-

- interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* **11**, 136–140 (2010).
110. Maedler, K. *et al.* Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* **110**, 851–860 (2002).
  111. Parikh, H. *et al.* TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PLoS Med.* **4**, 0868–0879 (2007).
  112. Shelev, A. Lack of TXNIP protects  $\beta$ -cells against glucotoxicity. in *Biochemical Society Transactions* vol. 36 963–965 (Portland Press, 2008).
  113. Hui, S. T. Y. *et al.* Txnip balances metabolic and growth signaling via PTEN disulfide reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3921–3926 (2008).
  114. Oka, S. *et al.* Thioredoxin Binding Protein-2/Thioredoxin-Interacting Protein Is a Critical Regulator of Insulin Secretion and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Function. *Endocrinology* **150**, 1225–1234 (2009).
  115. Lee, H. M. *et al.* Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **62**, 194–204 (2013).
  116. Larsen, C. M. *et al.* Interleukin-1–Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1517–1526 (2007).
  117. Lukens, J. R., Dixit, V. D. & Kanneganti, T. D. Inflammasome activation in obesity-related inflammatory diseases and autoimmunity. *Discovery medicine* vol. 12 65–74 (2011).
  118. Stienstra, R. *et al.* The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* **12**, 593–605 (2010).
  119. Vandanmagsar, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* **17**, 179–189 (2011).
  120. Stienstra, R. *et al.* Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15324–15329 (2011).
  121. Wen, H. *et al.* Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* **12**, 408–415 (2011).
  122. Yin, Z. *et al.* Transcriptome analysis of human adipocytes implicates the NOD-like receptor pathway in obesity-induced adipose inflammation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **394**, 80–87 (2014).

123. Schopfer, F. J., Cipollina, C. & Freeman, B. A. Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chemical Reviews* vol. 111 5997–6021 (2011).
124. Delmastro-Greenwood, M., Freeman, B. A. & Wendell, S. G. Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids. *Annual Review of Physiology* vol. 76 79–105 (2014).
125. Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3533–3539 (1963).
126. Piesche, M. *et al.* The Emerging Therapeutic Potential of Nitro Fatty Acids and Other Michael Acceptor-Containing Drugs for the Treatment of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Pharmacology* vol. 11 (2020).
127. Gilroy, D. W. *et al.* Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* **5**, 698–701 (1999).
128. Baker, P. R. S., Schopfer, F. J., Sweeney, S. & Freeman, B. A. Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: Synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11577–11582 (2004).
129. Lima, É. S., Di Mascio, P., Rubbo, H. & Abdalla, D. S. P. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry* **41**, 10717–10722 (2002).
130. Fazzari, M. *et al.* Olives and Olive Oil Are Sources of Electrophilic Fatty Acid Nitroalkenes. *PLoS One* **9**, e84884 (2014).
131. Weitzberg, E. & Lundberg, J. O. Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu. Rev. Nutr.* **33**, 129–159 (2013).
132. Napolitano, A. *et al.* Acid-induced structural modifications of unsaturated fatty acids and phenolic olive oil constituents by nitrite ions: A chemical assessment. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1329–1337 (2004).
133. Delmastro-Greenwood, M. *et al.* Nitrite and nitrate-dependent generation of anti-inflammatory fatty acid nitroalkenes. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 333–341 (2015).
134. Salvatore, S. R. *et al.* Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J. Lipid Res.* **54**, 1998–2009 (2013).
135. Bonacci, G. *et al.* Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J. Biol. Chem.* **287**, 44071–44082 (2012).
136. Nadtochiy, S. M., Baker, P. R. S., Freeman, B. A. & Brookes, P. S. Mitochondrial nitroalkene formation and mild uncoupling in ischaemic

- preconditioning: Implications for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **82**, 333–340 (2009).
137. Schopfer, F. J. *et al.* Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1250–1259 (2009).
  138. Oh, J. Y., Giles, N., Landar, A. & Darley-Usmar, V. Accumulation of 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J 2 adduct formation with Keap1 over time: Effects on potency for intracellular antioxidant defence induction. *Biochem. J.* **411**, 297–306 (2008).
  139. Lehmann, J. M. *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J. Biol. Chem.* **270**, 12953–12956 (1995).
  140. Schopfer, F. J. *et al.* Covalent Peroxisome Proliferator-activated Receptor Adduction by Nitro-fatty Acids SELECTIVE LIGAND ACTIVITY AND ANTI-DIABETIC SIGNALING ACTIONS \*. *J. Biol. Chem.* **285**, 12321–12333 (2010).
  141. Schopfer, F. J. *et al.* Nitrolinoleic acid: An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2340–2345 (2005).
  142. Kansanen, E., Kivelä, A. M. & Levenon, A. L. Regulation of Nrf2-dependent gene expression by 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2. *Free Radical Biology and Medicine* vol. 47 1310–1317 (2009).
  143. Wright, M. M. *et al.* Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4299–4304 (2006).
  144. Cole, M. P. *et al.* Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ. Res.* **105**, 965–972 (2009).
  145. Mitsuishi, Y., Motohashi, H. & Yamamoto, M. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front. Oncol.* **0**, 200 (2012).
  146. Westerheide, S. D. & Morimoto, R. I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *Journal of Biological Chemistry* vol. 280 33097–33100 (2005).
  147. Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 1 (2009).
  148. Newton, K. & Dixit, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).

149. Sutterwala, F. S., Haasken, S. & Cassel, S. L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1319**, 82–95 (2014).
150. Karin, M. & Delhase, M. The I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B: Key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 85–98 (2000).
151. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling. *Cell* vol. 132 344–362 (2008).
152. Hoesel, B. & Schmid, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 2013 121 **12**, 1–15 (2013).
153. Villacorta, L. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc. Res.* **98**, 116–124 (2013).
154. Rossi, A. *et al.* Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. *Nature* **403**, 103–108 (2000).
155. Rovin, B. H., Lu, L. & Cosio, A. *Cyclopentenone Prostaglandins Inhibit Cytokine-Induced NF-B Activation and Chemokine Production by Human Mesangial Cells.* (2001).
156. Lin, Y. C., Huang, G. Da, Hsieh, C. W. & Wung, B. S. The glutathionylation of p65 modulates NF- $\kappa$ B activity in 15-deoxy- $\Delta$  12,14-prostaglandin J 2-treated endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1844–1853 (2012).
157. Castrillo, A., Díaz-Guerra, M. J. M., Hortelano, S., Martín-Sanz, P. & Boscá, L. Inhibition of I $\kappa$ B Kinase and I $\kappa$ B Phosphorylation by 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 in Activated Murine Macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1692–1698 (2000).
158. BATTHYANY DIGHIRO, C. I. & LOPEZ GONZALEZ, G. V. NITROALKENE TOCOPHEROLS AND ANALOGS THEREOF FOR USE IN THE TREATMENT AND PREVENTION OF INFLAMMATION RELATED CONDITIONS. (2015).
159. Ingold, M., López, G. V. & Porcal, W. Green conditions for passerini three-component synthesis of tocopherol analogues. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 1093–1097 (2014).
160. Riener, C. K., Kada, G. & Gruber, H. J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *undefined* **373**, 266–276 (2002).
161. Vanna, R. S., Dahiya, R. & Kumar, S. Microwave-assisted Henry reaction: Solventless synthesis of conjugated nitroalkenes. *Tetrahedron Lett.* **38**, 5131–5134 (1997).
162. McNulty, J., Steere, J. A. & Wolf, S. The ultrasound promoted Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **39**, 8013–8016

(1998).

163. Phukan, M. *et al.* Henry reaction in environmentally benign methods using imidazole as catalyst OH NO 2 Im Im =. (2009) doi:10.1080/17518250903410074.
164. Vijendra Kumar, N., Srinivas, P. & Bettadaiah, B. K. New scalable and eco-friendly synthesis of gingerols. *undefined* **53**, 2993–2995 (2012).
165. Baker, L. M. S. *et al.* Nitro-fatty Acid Reaction with Glutathione and Cysteine KINETIC ANALYSIS OF THIOL ALKYLATION BY A MICHAEL ADDITION REACTION \*. (2007) doi:10.1074/jbc.M704085200.
166. Vitturi, D. A. *et al.* The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid \* □ S Lucía Turell ‡ §1. (2016) doi:10.1074/jbc.M116.756288.
167. BA, F., VB, O. & FJ, S. The discovery of nitro-fatty acids as products of metabolic and inflammatory reactions and mediators of adaptive cell signaling. *Nitric oxide Biol. Chem.* **77**, 106–111 (2018).
168. Schopfer, F. J. *et al.* Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 1250–1259 (2009).
169. Turell, L., Steglich, M. & Alvarez, B. The chemical foundations of nitroalkene fatty acid signaling through addition reactions with thiols. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **78**, 161–169 (2018).
170. Seidler, N. W. GAPDH: Biological Properties and Diversity. **985**, (2013).
171. Tedesco, S. *et al.* Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front. Pharmacol.* **0**, 71 (2018).
172. T, B., SL, F. & BT, C. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 99–109 (2009).
173. X, L. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
174. Galliussi, G., Batthyány, C. & Botti, H. MECANISMOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS NITROALQUENOS: Regulación del Inflammasoma NLRP3.
175. Ferrari, D. *et al.* The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* **176**, 3877–3883 (2006).
176. Idzko, M., Ferrari, D. & Eltzschig, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. (2014) doi:10.1038/nature13085.

177. WY, W., YC, W. & CC, W. Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa activation by 3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1380–1389 (2006).
178. S, K. *et al.* Structure activity analysis of the pro-apoptotic, antitumor effect of nitrostyrene adducts and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 603–610 (2003).
179. Kim, J. H., Kim, J. H., Lee, G. E., Lee, J. E. & Chung, I. K. Potent Inhibition of Human Telomerase by Nitrostyrene Derivatives. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1117–1124 (2003).
180. He, Y. *et al.* 3,4-Methylenedioxy-nitrostyrene Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Blocking Assembly of the Inflammasome \* □ S. (2014) doi:10.1074/jbc.M113.515080.
181. Gross, O. *et al.* Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* **459**, (2009).
182. Paik, S., Kim, J. K., Silwal, P., Sasakawa, C. & Jo, E.-K. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 1141–1160 (2021).
183. MS, D., L, S., S, R., S, H. & P, B. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
184. Fernandes-Alnemri, T. *et al.* The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. doi:10.1038/sj.cdd.4402194.
185. Lugrin, J. & Martinon, F. Detection of ASC Oligomerization by Western Blotting. *Bio-protocol* **7**, (2017).
186. Kim, T. H. & Dekker, J. Formaldehyde Cross-Linking. (2018) doi:10.1101/pdb.prot082594.
187. Hoffman, E. A., Frey, B. L., Smith, L. M. & Auble, D. T. Formaldehyde Crosslinking: A Tool for the Study of Chromatin Complexes \*. *J. Biol. Chem.* **290**, 26404–26411 (2015).
188. Franklin, B. S. *et al.* The adaptor ASC has extracellular and ‘prionoid’ activities that propagate inflammation. *Nat. Immunol.* **15**, 727–737 (2014).
189. F, H., JF, R.-A. & E, L. Assembly and regulation of ASC specks. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 1211–1229 (2017).
190. Rayamajhi, M., Zhang, Y. & Miao, E. Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.* **1040**, 85 (2013).

191. CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300>.
192. Xie, Y., Meijer, A. H. & Schaaf, M. J. M. Modeling Inflammation in Zebrafish for the Development of Anti-inflammatory Drugs. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 620984 (2020).
193. Choi, T.-Y., Choi, T.-I., Lee, Y.-R., Choe, S.-K. & Kim, C.-H. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Exp. Mol. Med.* **2021 533** **53**, 310–317 (2021).
194. Patton, E. E. & Tobin, D. M. Spotlight on zebrafish: the next wave of translational research. *Dis. Model. Mech.* **12**, (2019).
195. Tavares, B. & Lopes, S. S. The Importance of Zebrafish in Biomedical Research. *Acta Med. Port.* **26**, 583–592 (2013).
196. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test\\_9789264203709-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en).
197. Scholpp, S. Introduction: in vivo cell biology in zebrafish. *Histochem. Cell Biol.* **2020 1545** **154**, 457–461 (2020).
198. Bennett, C. M. *et al.* Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* **98**, 643–651 (2001).
199. Campos-Sánchez, J. C. & Esteban, M. Á. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. *J. Fish Dis.* **44**, 123–139 (2021).
200. Robertson, A. L. *et al.* A Zebrafish Compound Screen Reveals Modulation of Neutrophil Reverse Migration as an Anti-Inflammatory Mechanism. *Sci. Transl. Med.* **6**, 225ra29 (2014).
201. SA, R. *et al.* A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* **108**, 3976–3978 (2006).
202. Coll, R. C. *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. (2015) doi:10.1038/nm.3806.
203. Y, H., L, F. & G, N. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1 $\beta$  production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J. Immunol.* **190**, 334–339 (2013).
204. Netea, M. G. *et al.* IL-1 $\beta$  Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes The Role of IL-1 $\beta$  and IL-18 in Host Defense PLoS Pathogens | www. **6**, 1000661 (2010).
205. Ray, A. & Dittel, B. N. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *J. Vis. Exp.* 1488 (2010) doi:10.3791/1488.

206. Jorge, M. B. K. C. V. P.-T. L. C. J. R.-D. C. V. L. S. M. P. G. S. & Escande, R. R. D. P. C. A. C. C. SIRT6 stabilization and cytoplasmic localization in macrophages regulates acute and chronic inflammation in mice. *J. Biol. Chem.*
207. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-. ).* **259**, 87–91 (1993).
208. GS, H., A, B., D, M. & BM, S. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Invest.* **94**, 1543–1549 (1994).
209. Hotamisligil, G. S. & Spiegelman, B. M. Perspectives in Diabetes Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ : A Key Component of the Obesity-Diabetes Link. *Diabetes* **43**, 1271–1278 (1994).
210. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**, 2409–2415 (1995).
211. Wu, H. & Ballantyne, C. M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ. Res.* 1549–1564 (2020)  
doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315896.
212. Han, M. S. *et al.* JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance and Inflammation. *Science (80-. ).* **339**, 218–222 (2013).
213. Lee, Y. S. & Olefsky, J. Chronic tissue inflammation and metabolic disease. *Genes Dev.* **35**, 307–328 (2021).
214. Everett, B. M. *et al.* Anti-Inflammatory Therapy With Canakinumab for the Prevention and Management of Diabetes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 2392–2401 (2018).
215. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
216. Nie, L. *et al.* Salsalate Activates Skeletal Muscle Thermogenesis and Protects Mice from High-Fat Diet Induced Metabolic Dysfunction. *EBioMedicine* **23**, 136–145 (2017).
217. Goldfine, A. B. *et al.* The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **152**, 346–357 (2010).
218. Lamkanfi, M. *et al.* Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J. Cell Biol.* **187**, 61–70 (2009).

219. C, E. *et al.* Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes* **64**, 12–22 (2015).
220. C, E. *et al.* Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD<sup>+</sup> ase CD38: implications for cellular NAD<sup>+</sup> metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes* **62**, 1084–1093 (2013).
221. C, E. *et al.* Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558 (2010).
222. Kleinert, M. *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018 143 **14**, 140–162 (2018).
223. Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A. & Feinglos, M. N. Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes* **37**, 1163–1167 (1988).
224. Sö Rhede Winzell, M. & Ahré, B. The High-Fat Diet-Fed Mouse A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. (2004).
225. S, T. *et al.* Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* **18**, 1407–1412 (2012).
226. DK, B., EO, S., H, M., CW, S. & RL, R. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, (2006).
227. Elgazar-Carmon, V., Rudich, A., Hadad, N. & Levy, R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* **49**, 1894–1903 (2008).
228. A, C. *et al.* Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes. Res.* **13**, 1311–1320 (2005).
229. Speakman, J. R. Animal models Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *Int. J. Obes.* **43**, 1491–1492 (2019).
230. P, J. *et al.* Obesity-related upregulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes: involvement of nuclear factor-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Diabetes* **58**, 104–115 (2009).
231. Nguyen, M. T. A. *et al.* A Subpopulation of Macrophages Infiltrates Hypertrophic Adipose Tissue and Is Activated by Free Fatty Acids via Toll-like Receptors 2 and 4 and JNK-dependent Pathways. *J. Biol. Chem.* **282**, 35279–35292 (2007).
232. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex

- answers. *Nat. Metab.* 2021 37 **3**, 883–886 (2021).
233. Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C. & Proietto, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90617.2008> **295**, 1323–1332 (2008).
  234. Benedé-Ubieto, R., Estévez-Vázquez, O., Ramadori, P., Cubero, F. J. & Nevzorova, Y. A. Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. (2020) doi:10.2147/DMSO.S234665.
  235. Bonner, J. S. *et al.* Relaxin treatment reverses insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* **62**, 3251–3260 (2013).
  236. Robinson, I., De Serna, D. G., Gutierrez, A. & Schade, D. S. Vitamin E in humans: An explanation of clinical trial failure. *Endocr. Pract.* **12**, 576–582 (2006).
  237. Asbaghi, O. *et al.* The effect of vitamin E supplementation on selected inflammatory biomarkers in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Sci. Reports 2020 101* **10**, 1–17 (2020).
  238. Bae, J. Y. & Park, H. H. Crystal Structure of NALP3 Protein Pyrin Domain (PYD) and Its Implications in Inflammasome Assembly. *J. Biol. Chem.* **286**, 39528 (2011).
  239. Thornberry, N. A. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* **356**, 768–774 (1992).
  240. NV, O. *et al.* Zebrafish tissue injury causes upregulation of interleukin-1 and caspase-dependent amplification of the inflammatory response. *Dis. Model. Mech.* **7**, 259–264 (2014).
  241. Yan, B. *et al.* Il-1 $\beta$  and Reactive Oxygen Species Differentially Regulate Neutrophil Directional Migration and Basal Random Motility in a Zebrafish Injury-Induced Inflammation Model. *J. Immunol.* **192**, 5998–6008 (2014).
  242. Mussbacher, M. *et al.* Cell Type-Specific Roles of NF- $\kappa$ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front. Immunol.* **10**, 85 (2019).
  243. Gisterå, A. & Hansson, G. K. The immunology of atherosclerosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **13**, 368–380 (2017).
  244. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317–325 (2011).
  245. Goldfine, A. B. *et al.* Salicylate (Salsalate) in patients with type 2 diabetes: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **159**, 1–12 (2013).
  246. Salastekar, N. *et al.* Salsalate Improves Glycemia in Overweight Persons

With Diabetes Risk Factors of Stable Statin-Treated Cardiovascular Disease: a 30-month Randomized Placebo-Controlled Trial. *Diabetes. Obes. Metab.* **19**, 1458 (2017).

247. Lapa, C. *et al.* Whitening and Impaired Glucose Utilization of Brown Adipose Tissue in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Sci. Reports* **2017 71 7**, 1–6 (2017).
248. Stanford, K. I. *et al.* Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **123**, 215–223 (2013).
249. Fisher, F. F. *et al.* FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**, 271–281 (2012).
250. Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517 (2009).
251. Hanssen, M. J. W. *et al.* Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in Obese Humans. *Diabetes* **65**, 1179–1189 (2016).
252. Meex, R. C. R., Phielix, E., Moonen-Kornips, E., Schrauwen, P. & Hesselink, M. K. C. Stimulation of human whole-body energy expenditure by salsalate is fueled by higher lipid oxidation under fasting conditions and by higher oxidative glucose disposal under insulin-stimulated conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1415–1423 (2011).
253. Smith, B. K. *et al.* Salsalate (Salicylate) Uncouples Mitochondria, Improves Glucose Homeostasis, and Reduces Liver Lipids Independent of AMPK- $\beta$ 1. *Diabetes* **65**, 3352–3361 (2016).
254. Van Dam, A. D. *et al.* Salsalate Activates Brown Adipose Tissue in Mice. (2015) doi:10.2337/db14-1125.
255. Roesler, A. & Kazak, L. UCP1-independent thermogenesis. *Biochem. J.* **477**, 709–725 (2020).
256. Kazak, L. & Spiegelman, B. M. Mechanism of futile creatine cycling in thermogenesis. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00444.2020> **319**, E947–E949 (2020).

