

Modulación de la Diferenciación de Macrófagos y Células Dendríticas por Nitroalquenos

Lucía Minarrieta
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA

Orientadora: Dra. Ana Ferreira
Co-orientador: Dr. Homero Rubbo

Cátedra de Inmunología
Facultad de Química/Ciencias
Universidad de la República
Agosto 2014



Agradecimientos

Habiendo llegado finalmente a terminar esta tesis, quiero agradecer a todos los que me acompañaron durante este tiempo y me ayudaron a que esto sucediera. Especialmente porque dentro de poco me voy del paisito por un largo tiempo y siento que ustedes tuvieron mucho que ver en que esto fuera posible.

En primer lugar, no quiero olvidarme de dar gracias a las agencias que financiaron mi estudios de Maestría y las pasantías que realicé en la Universidad de Pittsburgh, ANII, PEDECIBA y CSIC.

Gracias también a los miembros del tribunal, Marcelo Hill, Alfonso Cayota y José Souza por brindarme parte de su tiempo para leer esta tesis y venir a la defensa, especialmente porque no les dimos mucho tiempo para leerla!

Por supuesto quiero darle infinitas gracias a mi supervisora, Ana, que me recibió en el lab en 2009 cuando todavía era estudiante de grado...No puedo creer que ya hayan pasado 5 años! Gracias por creer en mí, por exigirme y por darme oportunidades de crecer como científica y como persona. Imposible no acordarse de esos fines de semana que nos pasamos día y noche corrigiendo proyectos y tesis, siempre trabajando hasta el último minuto! Vivimos tantas cosas juntas, buenas y malas, que es raro pensar que ya no vamos a trabajar más juntas. Igual no sé qué decir, salvo que me considero una persona muy afortunada por haber tenido la oportunidad de trabajar contigo y ser tu estudiante. Muchas gracias también a mi co-supervisor, Homero, por todas las instancias de devolución y discusión que le aportaron otra visión a mi trabajo, y por el apoyo durante estos años.

Estoy sumamente agradecida también con toda la Cátedra de Inmuno por recibirme e integrarme, me llevo un montón de cosas muy valiosas de este tiempo vivido juntos, incluyendo muchos amigos que espero mantener aunque no trabaje más acá. Inolvidables las jornadas de la SUB que compartimos juntos, no puedo creer que no voy a estar para compartir la próxima con ustedes. En especial quiero agradecer a toda la casita del medio, los que están y los que ya no. Me encantó compartir estos años con ustedes, todos los lab meetings con el infaltable chocolate, el día a día en la mesada (que a veces involucraba algún que otro reto por parte de los jefes por el relajo armado), las salidas, los festejos... De todos me llevo un recuerdo especial y los voy a extrañar un montón! Espero que algún día me puedan ir a visitar a mi nueva casa!

Por supuesto, no puedo dejar de agradecer a la gente de Pittsburgh que me recibió durante mis dos pasantías. A pesar de que no me conocían, Bruce y Francisco me aceptaron en su lab con gusto, no una, sino 2 veces!!!, y pusieron a disposición todos sus recursos. Quiero aprovechar esta instancia para recalcar la generosidad de Francisco y su esposa Ale, que me abrieron las puertas de su casa con la mejor onda. Ni hablar del apoyo incondicional que me brindó y me sigue brindando a la hora de pedirle consejos acerca de ciencia o de decisiones más personales. A pesar de que formalmente no sea así, siempre lo consideraré uno de mis tutores y un modelo a seguir, como persona y como científico. Las dos pasantías que realicé en esta ciudad a la que le terminé agarrando cariño, me dejaron una gran cantidad de vivencias y enseñanzas. Dejé allí amigos súper especiales, que me hicieron sentir como si nunca me hubiera ido de Uruguay. Espero poder volver a visitarlos algún día!

Finalmente, quiero agradecer de manera muy especial a toda mi familia y a esos amigos de toda la vida, que a pesar de que no están metidos en el mundo de la ciencia me han bancado todos estos años de trabajar noches y fines de semana y han estado dispuestos a escucharme cuando he necesitado hacer catarsis. Principalmente a mis padres, que al principio no estaban muy convencidos de que estudiara Bioquímica, pero que luego de darse cuenta de lo mucho que me gustaba, me han apoyado incondicionalmente y me han impulsado a seguir mis ambiciones.

No creo que en estas líneas logre expresar lo agradecida que estoy con todos ustedes pero espero que lo tengan presente! Gracias!!!!

Resumen

Los macrófagos y células dendríticas (DC) son células de la inmunidad innata residentes en los tejidos, especializadas en reconocer señales de peligro provenientes de patógenos, de forma de desencadenar rápidamente una respuesta inflamatoria que limite la diseminación del patógeno y el daño tisular que éste genera. Son células con papeles diferentes en la inmunidad, ya que los macrófagos cumplen su función principalmente a nivel local, contribuyendo a la fase propiamente efectora, mientras que las DC actúan como un enlace entre la inmunidad innata y adaptativa, a través de su capacidad de estimular a los linfocitos T. Recientemente se demostró que macrófagos y DC activadas pueden generar nitroalquenos (NO₂-FA), productos de la nitración de ácidos grasos insaturados, que son capaces de ejercer una variedad de efectos moduladores sobre distintos tipos celulares mediante su habilidad de interactuar con varios factores asociados a vías de señalización intracelular, incluyendo NF-κB, Nrf2 y PPARγ. Dadas las diferentes funciones de los macrófagos y DC en la inmunidad, nos planteamos establecer los eventuales efectos de los NO₂-FA sobre ambos tipos celulares, ya que su acción influiría sobre la respuesta local, y a través de ella, sobre la intensidad y calidad de la respuesta adaptativa.

En el caso de los macrófagos, existían evidencias sobre la capacidad de los NO₂-FA de inhibir la diferenciación al fenotipo clásico, inducido por agonistas de TLR e IFNγ, y de gran potencial inflamatorio. En contraste, no existía información acerca del efecto de estos mediadores sobre la activación alternativa de macrófagos, inducida por IL-4 y/o IL-13, y caracterizada por la expresión de la enzima Arginasa 1 (Arg-1). En mi trabajo final de Licenciatura observamos que el OANO₂, derivado nitrado del ácido oleico, potenció la expresión de Arg-1 inducida por IL-4 en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM), por un mecanismo dependiente de PPARγ. En esta tesis profundizamos este estudio evaluando la capacidad del OANO₂ de promover la diferenciación al fenotipo alternativo, mediante el análisis del efecto sobre Arg-1 y otros genes asociados a este fenotipo, incluyendo el receptor de manosa (MR), Ym1 y RELMα. Utilizando como modelo BMDM, observamos que el OANO₂, pero no el ácido oleico, potenció la transcripción de Arg-1 inducida por IL-4. En estas condiciones experimentales no fue posible determinar eventuales efectos sobre MR, Ym1 y RELMα. En contraste, la administración a ratones, por vía intraperitoneal, de OANO₂ junto con IL-4 causó una potenciación de la expresión de todos los genes previamente mencionados, exceptuando RELMα, en las células recuperadas del sitio de inoculación, donde predominan monocitos y macrófagos. Estos resultados

sugieren que los NO₂-FA son mediadores capaces de potenciar la activación alternativa de los macrófagos inducida por IL-4, favoreciendo la generación de células efectoras con propiedades antiinflamatorias y reparadoras del tejido.

En relación con las DC, no existía información sobre el efecto de los NO₂-FA sobre sus propiedades, por lo cual para abordar esta pregunta utilizamos como modelo DC diferenciadas a partir de precursores de médula ósea (BMDC). El efecto más robusto sobre estas células lo observamos condicionándolas desde su diferenciación con NO₂CLA (derivado nitrado del ácido linoleico conjugado). Esto provocó un descenso significativo en la expresión inducida por LPS de varias moléculas asociadas a su capacidad presentadora de antígenos y estimuladora de los linfocitos T incluyendo MHC II, CD86, CD40, CD80. Este descenso correlacionó con una capacidad inmunoestimuladora disminuida, medida en términos de la inducción, antígeno específica, de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes. Con el objetivo de discernir cuáles vías de señalización están involucradas en estos efectos se utilizaron BMDC provenientes de ratones deficientes en Nrf2. Observamos que la ausencia de este factor no bloqueó la capacidad del NO₂CLA de inhibir la activación de las BMDC, salvo para el caso de la molécula coestimuladora CD40. En contraste, obtuvimos evidencias de la participación de PPAR γ ya que BMDC condicionadas con rosiglitazona (RGZ), un agonista de PPAR γ , mostraron un fenotipo muy similar a las BMDC condicionadas con NO₂CLA, en términos de expresión de marcadores de activación y de su capacidad inmunoestimuladora de linfocitos T CD4⁺. Además, la presencia de GW9662, un inhibidor de PPAR γ durante el condicionamiento de las células, revirtió en gran medida los efectos observados previamente.

En conclusión, este trabajo describe dos nuevos mecanismos de acción mediante los cuales los NO₂-FA modularían el desarrollo de la respuesta inmune: promoviendo la activación alternativa de macrófagos e inhibiendo la activación de las DC hacia fenotipos inmunogénicos. Estos avances aportan conocimiento sobre el posible papel de los NO₂-FA en el transcurso de una respuesta inmune, y le dan atractivo a estas moléculas como potenciales drogas inmunomoduladoras.

Tabla de contenidos

1	Introducción	13
1.1	Fenotipos de macrófagos y células dendríticas	13
1.1.1	<i>El receptor PPARγ en la diferenciación y activación de células mieloides</i>	21
1.1.2	<i>Señalización por Nrf2 en células mieloides</i>	24
1.2	Nitroalquenos: productos de nitración de ácidos grasos insaturados con propiedades anti-inflamatorias	27
1.2.1	<i>Propiedades biológicas de los NO₂-FA</i>	29
1.2.1.1	Activación del receptor PPAR γ	30
1.2.1.2	Activación de Keap1/Nrf2	31
1.2.1.3	Inducción de la vía de <i>shock</i> térmico	31
1.3	Hipótesis	33
1.4	Objetivos	34
2	Materiales y métodos	35
2.1	Reactivos generales	35
2.2	Animales de experimentación	36
2.3	Métodos de cultivo celular	36
2.3.1	<i>Línea celular de fibroblastos L929</i>	36
2.3.2	<i>Preparación de macrófagos de ratón derivados de médula ósea (BMDM)</i>	37
2.3.3	<i>Preparación de células dendríticas de ratón derivadas de médula ósea (BMDC)</i>	37
2.4	Métodos aplicados al estudio de la respuesta celular	38
2.4.1	<i>Ensayo para la determinación de la actividad arginasa</i>	38
2.4.2	<i>Análisis de la presencia de Arg-1 por Inmunoblot</i>	39
2.4.2.1	SDS-PAGE	39
2.4.2.2	Transferencia a membranas de Inmunoblotting	39
2.4.2.3	Inmunoblotting	39
2.4.3	<i>Análisis de la expresión de marcadores fenotípicos por PCR en tiempo real</i>	40
2.4.3.1	Extracción de ARN	40
2.4.3.2	Obtención de ADN copia	40
2.4.3.3	RT-PCR cuantitativa en tiempo real	41
2.4.4	<i>Determinación de la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo</i>	42
2.4.5	<i>Cuantificación de citoquinas por ELISA</i>	43

2.4.6	<i>Determinación de nitrito por el método de Griess</i>	43
2.4.7	<i>Métodos para la determinación de la viabilidad celular</i>	44
2.5	<i>Ensayos in vitro</i>	44
2.5.1	<i>Estudios para evaluar el efecto de los NO₂-FA sobre la activación alternativa de macrófagos</i>	44
2.5.2	<i>Estudios para evaluar el efecto de los NO₂-FA sobre el fenotipo de DC</i>	45
2.5.2.1	Estudios del efecto de la administración de NO ₂ -FA en forma concomitante a la inducción de la maduración de las BMDC.....	45
2.5.2.2	Estudios del efecto de la administración de NO ₂ -FA durante la diferenciación de las BMDC	45
2.5.3	<i>Estudio de la capacidad de las BMDC condicionadas con NO₂-FA de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes</i>	46
2.5.3.1	Purificación de linfocitos T CD4 ⁺ a partir de ratones OTII	46
2.5.3.2	Co-cultivo de BMDC con linfocitos OTII	47
2.5.4	<i>Estudio de la contribución de los receptores Nrf2 y PPARγ al fenotipo observado</i>	47
2.5.4.1	Nrf2.....	47
2.5.4.2	PPAR γ	48
2.6	<i>Ensayos in vivo</i>	48
2.6.1	<i>Estudios para evaluar el efecto de los NO₂-FA sobre la activación alternativa de macrófagos</i>	48
2.7	<i>Análisis de datos</i>	49
3	Resultados	50
3.1.	Estudio de la capacidad de los NO ₂ -FA de modular la activación alternativa de macrófagos	50
3.2	Estudio de la capacidad de los NO ₂ -FA de modular la activación de las BMDC .54	
3.2.1	<i>Comparación de la administración del NO₂-FA durante la diferenciación versus durante la activación por estímulos pro-inflamatorios en BMDC</i>	54
3.2.2	<i>Caracterización del fenotipo inducido por el condicionamiento de BMDC con NO₂CLA</i>	56
3.2.3	<i>Estudio de la capacidad de las BMDC condicionadas con NO₂CLA de promover la activación de linfocitos T</i>	64
3.3	Estudio de la contribución de los receptores PPAR γ y Nrf2 al fenotipo de las BMDC tratadas con NO ₂ -FA.....	65
3.3.1	<i>Nrf2</i>	65
3.3.2	<i>PPARγ</i>	69
3.3.2.1	Estudio del efecto de un agonista de PPAR γ sobre el fenotipo de las BMDC.....	69
3.3.2.2	Análisis de la inhibición de PPAR γ sobre el efecto mediado por NO ₂ CLA sobre el fenotipo de las BMDC	72

4	Discusión.....	75
4.1	Estudio de la capacidad de los NO ₂ -FA de modular la activación alternativa de macrófagos	75
4.2	Estudio de la capacidad de los NO ₂ -FA de modular la activación de las BMDC .	79
4.2.1	<i>Comparación de la administración del NO₂-FA durante la diferenciación versus durante la activación por estímulos pro-inflamatorios en BMDC</i>	<i>79</i>
4.2.2	<i>Caracterización del fenotipo inducido por el condicionamiento de BMDC con NO₂CLA.....</i>	<i>82</i>
4.2.3	<i>Análisis de la participación de distintas vías de señalización en el condicionamiento de BMDC por NO₂-FA</i>	<i>83</i>
4.2.3.1	NF-κB.....	83
4.2.3.2	Nrf2.....	86
4.2.3.3	PPARγ.....	87
4.2.3.4	SWAP70.....	89
4.3	Comentario final	91
5	Bibliografía.....	92

Abreviaturas

Arg-1	Arginasa 1
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ATF	del inglés, Activating transcription factor
Bcl3	del inglés, B-cell lymphoma 3-encoded protein
BMDC	del inglés, Bone Marrow-Derived Dendritic Cells
BMDM	del inglés, Bone Marrow-Derived Macrophages
BSA	Albúmina sérica bovina
CBP	del inglés, CREB-binding protein
CLA	Ácido linoleico conjugado
cDC	Célula(s) dendrítica(s) convencional(es)
CREB	del inglés, cAMP response element-binding protein
DAMPs	del inglés, Danger-associated molecular patterns
DC	Célula(s) dendrítica(s)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	del inglés, Extracellular-signal-regulated kinase
FABP4	del inglés, Fatty acid binding protein 4
GCLM	del inglés, Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit
GM-CSF	del inglés, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HO-1	Hemoxigenasa 1
HUVECs	del inglés, Human umbilical vein endothelial cells
HSF	del inglés, Heat Shock Transcription Factor
I κ B	del inglés, Inhibitor of kappa B
IL-1	Interleuquina 1
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IL-13	Interleuquina 13
IFN γ	Interferón gamma
Keap1	del inglés, Kelch-like ECH-associated protein 1
LPS	Lipopolisacárido

MAPK	del inglés, Mitogen-activated protein kinases
MCP-1	del inglés, Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	del inglés, Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MyD88	del inglés, Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	del inglés, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	del inglés, Natural killer
NO ₂ -FA	del inglés, Nitro Fatty Acids
NO ₂ CLA	Ácido nitrolinoleico conjugado
NOS2	Sintasa de óxido nítrico 2
NOX2	NADPH oxidasa 2
NQO1	del inglés, NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
Nrf2	del inglés, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OA	Ácido oleico
OANO ₂	Ácido nitro-oleico
PAMPs	del inglés, Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate buffered saline</i>)
PD-L1/2	del inglés, Programmed Death Ligand 1/2
pDC	Célula(s) dendrítica(s) plasmacitoide(s)
PI	Ioduro de propidio
Poly(I:C)	Ácido poliinosínico policitídico
PPAR	del inglés, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE	del inglés, PPAR response element
Relm α	del inglés, Resistin-like molecule alpha
RGZ	Rosiglitazona
RXR	del inglés, Retinoid X Receptor
SBF	Suero bovino fetal
STAT6	del inglés, Signal transducer and activator of transcription 6
TLR	Receptores de tipo Toll (del inglés, <i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRIF	del inglés, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

1 Introducción

1.1 Fenotipos de macrófagos y células dendríticas

Los macrófagos y las células dendríticas (DC) residentes en los tejidos periféricos son células de la inmunidad innata, originadas a partir de un precursor mieloide de médula ósea, que están especializadas en censar las señales de peligro y desencadenar la respuesta inflamatoria. A pesar de estas similitudes, estas células juegan papeles diferentes en el desarrollo de la inmunidad. Los macrófagos son células efectoras que participan en la respuesta a nivel local eliminando agentes patógenos o componentes particulados y contribuyendo a restaurar el tejido dañado. Las DC poseen un rol de nexo entre la respuesta innata y la adaptativa, siendo capaces de sesgar esta última en determinada dirección (Th1, Th2 o Th17), así como también de inducir la generación de fenotipos de células T reguladoras, involucradas en el apagado de la respuesta inmune. A continuación se sintetizan las principales características morfológicas y funcionales de estos tipos celulares.

Los **macrófagos** fueron descritos como parte del sistema fagocítico mononuclear^{1,2}, el cual comprendía además otros tipos celulares, incluyendo los monocitos circulantes en la sangre, que anteriormente eran los propuestos precursores de los macrófagos residentes en tejidos. Sin embargo, aunque es cierto que los monocitos pueden dar lugar a macrófagos bajo ciertas condiciones y durante determinados tipos de respuestas inflamatorias, datos recientes han demostrado que esto no es así en la mayor parte de los casos^{3,4} y que de hecho, la mayoría de las poblaciones de macrófagos residentes son originadas a partir de precursores embrionarios que pueblan los tejidos antes del nacimiento, y son capaces de autorrenovarse (revisado por ⁵). Algunas características morfológicas de los macrófagos se asocian a su fuerte actividad de fagocitosis y pinocitosis: el citoesqueleto desarrollado, con microfilamentos de actina ubicados por debajo de la membrana plasmática que facilitan el despliegue

de pseudópodos y la locomoción, y la presencia de gránulos y vacuolas citoplasmáticas (revisado por ⁶). Pero la fagocitosis, si bien constituye una importante actividad efectora de los macrófagos, no es la única propiedad que distingue a este tipo celular. Los macrófagos constituyen una población heterogénea ontogénicamente y funcionalmente, capaz de participar no sólo en la fase propiamente efectora de una respuesta, eliminando patógenos y partículas, sino también en el proceso asociado a la reparación tisular (revisado por ^{7,8}). Esta habilidad es consecuencia de que estas células son capaces de censar, a través de una variedad de receptores, citoquinas y señales de peligro en los tejidos, entendiendo por tales motivos moleculares derivados tanto de patógenos que ingresen al organismo (PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular patterns*), como de células propias que sufrieron necrosis (DAMPs, del inglés *danger associated molecular patterns*). Así, dependiendo del conjunto de ligandos detectados, se desencadenarán cascadas de señalización que determinarán las propiedades funcionales del macrófago.

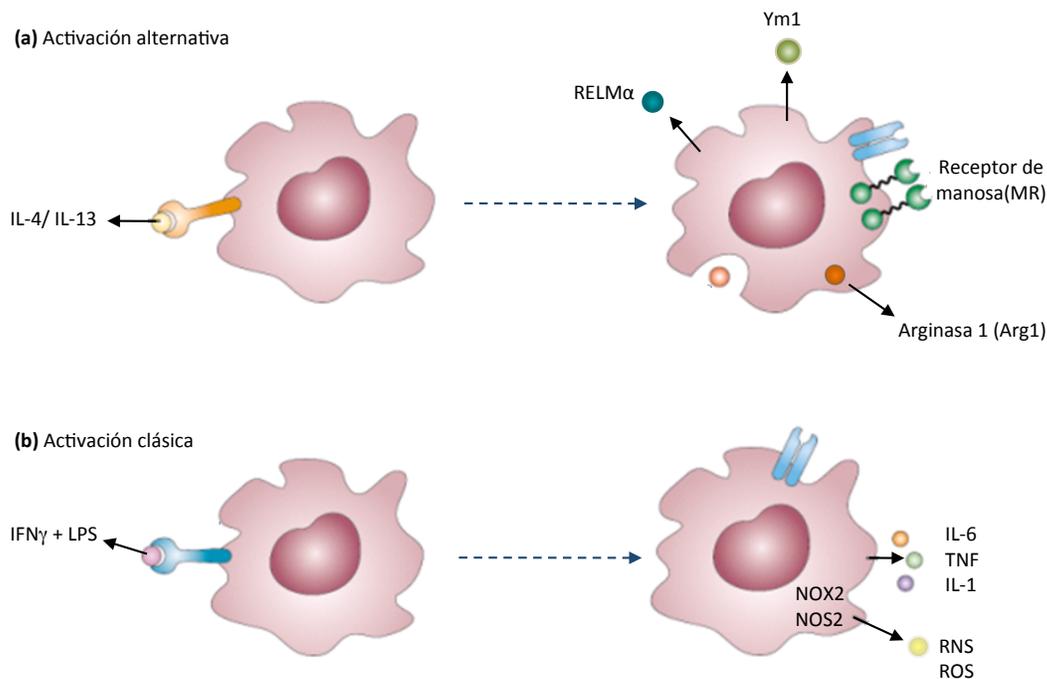


Figura 1.1.1. Activación clásica versus activación alternativa de macrófagos. **(a)** La activación alternativa es mediada por IL-4 e IL-13, y se caracteriza por la expresión de la enzima Arg-1, el receptor de manosa y las proteínas RELM α y Ym1. **(b)** La activación clásica es mediada por IFN γ , junto a un estímulo microbiano reconocido por un PRR (i.e. LPS), y se caracteriza por la producción de citoquinas proinflamatorias y la producción de especies reactivas del nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS). Adaptado de ¹¹⁴.

En el marco de esta heterogeneidad se describieron dos fenotipos principales de macrófagos, que si bien no son más que una simplificación de la situación real *in vivo*, donde el ambiente de citoquinas y factores que va a desencadenar la diferenciación es mucho más complejo, constituyen una clasificación ampliamente utilizada y que a menudo facilita la descripción. Estos fenotipos se denominan clásico y alternativo y presentan características funcionales muy diferentes entre sí (ver figura 1.1.1). El fenotipo clásico se genera en respuesta a la estimulación con agonistas de receptores tipo Toll (TLR) más interferón gamma (IFN γ), y podría surgir tanto en la fase innata como en la adaptativa de una respuesta inmune, ya que el IFN γ necesario para su desarrollo puede ser producido no sólo por linfocitos Th1 CD4⁺ o T CD8⁺ activados, sino también por células NK (del inglés, *Natural Killer*). Este fenotipo se encuentra asociado a una potente actividad microbicida y es particularmente importante en la defensa contra bacterias intracelulares. Esta actividad microbicida es producto de su alta capacidad fagocítica, explicable por el alto nivel de expresión en superficie de receptores Fc y receptores de complemento, y de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) generadas gracias a la activación de la enzima NADPH oxidasa (NOX2) y a la expresión de la sintasa de óxido nítrico (NOS2), respectivamente. Por otro lado, mediante la producción de citoquinas como las interleuquinas IL-1 β , IL-6, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), sostienen una fuerte respuesta inflamatoria que recluta y activa células efectoras, incluyendo neutrófilos y monocitos. La estimulación con agonistas de TLR en ausencia de IFN γ puede desencadenar la diferenciación hacia un fenotipo muy similar al clásico, pero con menor potencial microbicida, denominado innato ⁹.

El fenotipo denominado alternativo¹⁰ es producto de la diferenciación inducida por otro tipo de señales, no esclarecidas completamente pero que incluyen a las citoquinas asociadas a las respuestas de tipo 2 IL-4 y/o IL-13, y en contraste con lo descrito para el fenotipo clásico, juega un papel de carácter anti-inflamatorio (revisado por ^{11,12}). Este fenotipo está especializado en controlar la diseminación de patógenos no fagocitables y persistentes¹³, así como también de limitar el desarrollo de respuestas exacerbadas asociadas a este tipo de agentes que tienen como consecuencia el daño tisular. Así, estos macrófagos son capaces de sintetizar citoquinas anti-inflamatorias (IL-10), moléculas involucradas en la reparación del tejido (proteínas de la familia de las quitinasas y las resistinas denominadas RELM α , Ym1, Ym2 y AMCasa) y la enzima Arginasa-1 (Arg-1). Esta enzima comparte con la NOS2 su sustrato L-arginina, a partir del cual cataliza la formación de ornitina y urea, y de esta manera es capaz de limitar la síntesis de *NO y los efectos tóxicos del mismo (ver figura 1.1.2)¹⁴. Además, el gran consumo de L-arginina por esta enzima es capaz de causar

una depleción de la misma en el medio, inhibiendo así la proliferación de linfocitos T¹⁵. Por otro lado, la ornitina producida es metabolizada por la enzima ornitina descarboxilasa, catalizando su conversión en poliaminas, que estimulan la proliferación celular. La ornitina también es sustrato de la ornitina aminotransferasa, la primera enzima de la vía de síntesis de la prolina, un aminoácido esencial en la síntesis de colágeno¹⁶. Estos efectos, junto con evidencias provenientes de modelos *in vivo*^{17,18}, definen a la Arg-1 como una enzima con función anti-inflamatoria y promotora de la reparación de tejidos.

En conclusión, de acuerdo con la descripción anterior de los fenotipos principales que adquieren los macrófagos, se evidencia que cumplen un papel importante a nivel local, aunque esto no descarta que la calidad de la respuesta inflamatoria que generan pueda indirectamente influenciar qué clase de respuesta T adaptativa se establecerá, ya que las citoquinas que ellos generan pueden afectar el fenotipo celular adquirido por las DC locales.

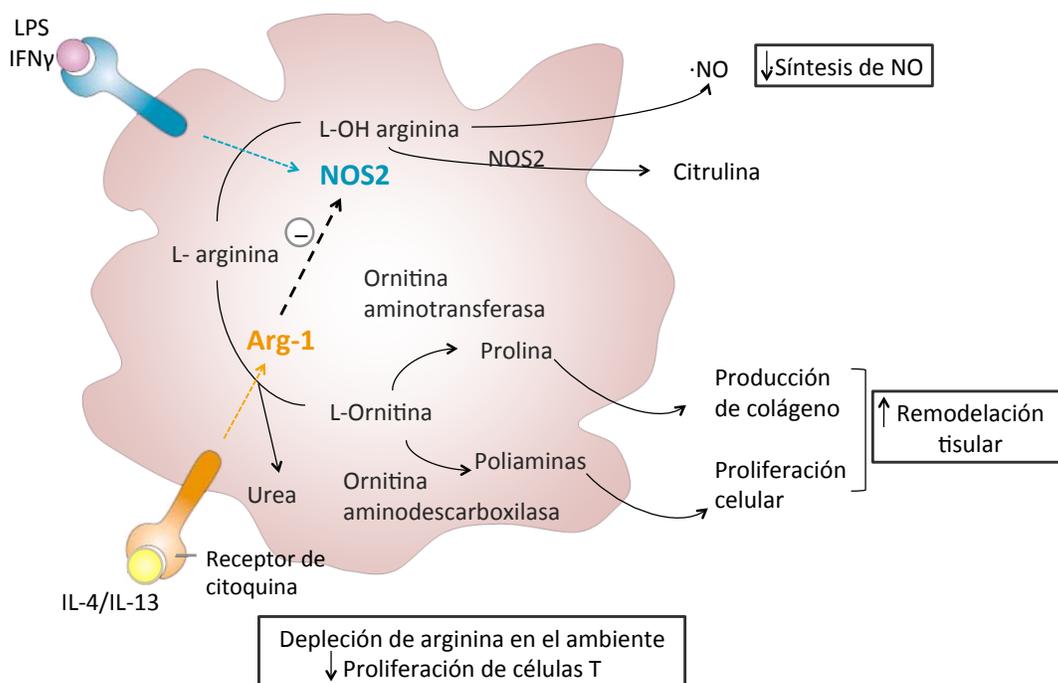


Figura 1.1.2. Diferentes vías de utilización de la L-arginina por los macrófagos activados. En el macrófago clásico, la L-arginina es utilizada para la producción de \cdot NO, por la NOS2, mientras que en el macrófago alternativo ésta es metabolizada por la Arg-1, dando lugar a urea y ornitina, la cual es convertida en prolina y poliaminas, que estimulan la producción de colágeno y la proliferación celular¹⁴.

Las DC constituyen una población celular heterogénea que puede ser clasificada en primera instancia en dos grandes grupos, los cuales comparten un precursor común pero una vez diferenciadas cumplen funciones distintas: DC plasmacitoides (pDC) y DC convencionales (cDC) (ver figura 1.1.3). Las pDC, como su nombre lo indica, presentan una morfología similar a la de los plasmocitos y se encuentran principalmente en la sangre y los tejidos linfoides, ingresando a los ganglios a través del torrente sanguíneo. Esta subpoblación expresa bajos niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) y moléculas coestimuladoras, así como de la integrina CD11c bajo condiciones de reposo. Además, su expresión de receptores de reconocimiento de patrones es bastante restringida, y se caracteriza por incluir a los receptores TLR7 y TLR9, que reconocen ARN de simple hebra y secuencias CpG de ADN no metilado, respectivamente. Frente al reconocimiento de ácidos nucleicos, las pDC son capaces de producir grandes cantidades de IFN de tipo I, necesarios para combatir infecciones virales. Otras consecuencias de la activación mediada por TLR son la secreción de citoquinas como TNF α e IL-12 y la inducción de la capacidad presentadora de antígeno. De esta manera, las pDC contribuyen además al reclutamiento y activación de células efectoras como las NK y plasmocitos.

Por otro lado, la clasificación de cDC engloba a todas aquellas DC que no son pDC. Estas células pueblan casi todos los tejidos linfoides y no linfoides, y están especializadas en captar y procesar antígeno para luego presentarlo a los linfocitos T (revisado por ^{19,20}). Dado que en este trabajo nos centraremos en esta subpoblación, de ahora en más utilizaremos la abreviatura DC como sinónimo de cDC. Esta subpoblación de DC presenta la morfología que le proporcionó el nombre a este tipo celular, caracterizado por proyecciones citoplásmicas prominentes similares a dendritas, y expresan altos niveles de la integrina CD11c y MHC II aún en condiciones basales. Las cDC pueden ser divididas según su localización y capacidad migratoria en dos grandes grupos: DC residentes de tejido linfoide y DC migratorias, presentes en el tejido no linfoide (revisado por ²¹). Las DC residentes permanecen en los órganos linfoides durante todo su ciclo de vida, y comprenden 2 subpoblaciones principales que pueden diferenciarse por su expresión de CD8 (CD8 α^+ y CD8 α^-). Las DC migratorias pueblan tejidos periféricos y órganos no linfoides e incluyen a las poblaciones CD103⁺ y CD11b⁻. Su localización estratégica en tejidos no linfoides les permite muestrear constantemente antígenos provenientes del tejido. Durante esta etapa de muestreo, las DC presentan un fenotipo inmaduro, caracterizado por la alta expresión de una amplia variedad de receptores fagocíticos. Sumado a esto, poseen una alta actividad de macropinocitosis, lo que en conjunto constituye una maquinaria altamente optimizada para

el procesamiento y presentación de antígeno. Dentro de este grupo también se encuentran las células de Langerhans de la epidermis, aunque se diferencian del resto debido a que no comparten el progenitor con las otras cDC y presentan menor expresión de MHC II. Además se caracterizan por expresar en grandes cantidades la lectina de tipo C Langerina (CD207).

Luego de permanecer unos días en continuo muestreo, los estímulos que reciben en el tejido conducen a la maduración de las DC, lo cual involucra la inducción del receptor quimiotáctico CCR7, responsable de dirigir su migración a los ganglios linfáticos drenantes. Esto es producto de la atracción por las quimioquinas CCL19 y CCL21, que actúan como ligandos de CCR7 y están presentes en las zonas T de los ganglios²². Este proceso de maduración de las DC es constitutivo e independiente de la detección de señales de peligro, pero también ocurre cuando las DC en el tejido se activan tras reconocer PAMPs o DAMPs. En este caso las DC adquieren un fenotipo maduro y activado, que tiene además otras particularidades como la alta expresión de moléculas de MHC, y moléculas coestimuladoras (CD86, CD80, CD40), y la concomitante disminución en la actividad de fagocitosis y macropinocitosis, causada en parte por un descenso en la expresión de receptores fagocíticos y de la inmunidad innata^{23,24}.

Aquellas DC que maduraron en ausencia de infección o señales de peligro provenientes de un trauma estéril presentan en sus MHC péptidos propios que pueden ser reconocidos por células T, pero no tienen niveles suficientes de moléculas coestimuladoras, por lo que esta interacción tiene como resultado la inducción de anergia T y/o la generación de células T reguladoras, jugando de esta manera un importante rol en el mantenimiento de la tolerancia periférica (revisado por ²⁵). En el caso de encontrarse con un estímulo inflamatorio, las señales censadas a través de receptores de la inmunidad innata como los TLR, entre otros, disparan una cascada de señalización que conlleva a la maduración y activación de las DC. Estas DC maduras activadas son capaces de inmunoestimular células T vírgenes, por lo cual se les conoce como DC inmunogénicas. Esto es porque presentan, además de altos niveles de moléculas de MHC, una gran expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 esenciales para disparar en el linfocito T las vías de señalización que conducen a la activación celular²⁴. Además, las DC inmunogénicas también son responsables de secretar una variedad de citoquinas pro-inflamatorias e inmunomoduladoras que determinan en qué clase de célula T colaboradora se diferenciará el linfocito T. De esta manera, el carácter de la respuesta inmune adaptativa que se genera está estrechamente relacionado a los estímulos inflamatorios que recibió la DC en primera instancia, por lo cual, la DC moldea la respuesta inmune adaptativa desencadenada con el fin de optimizarla.

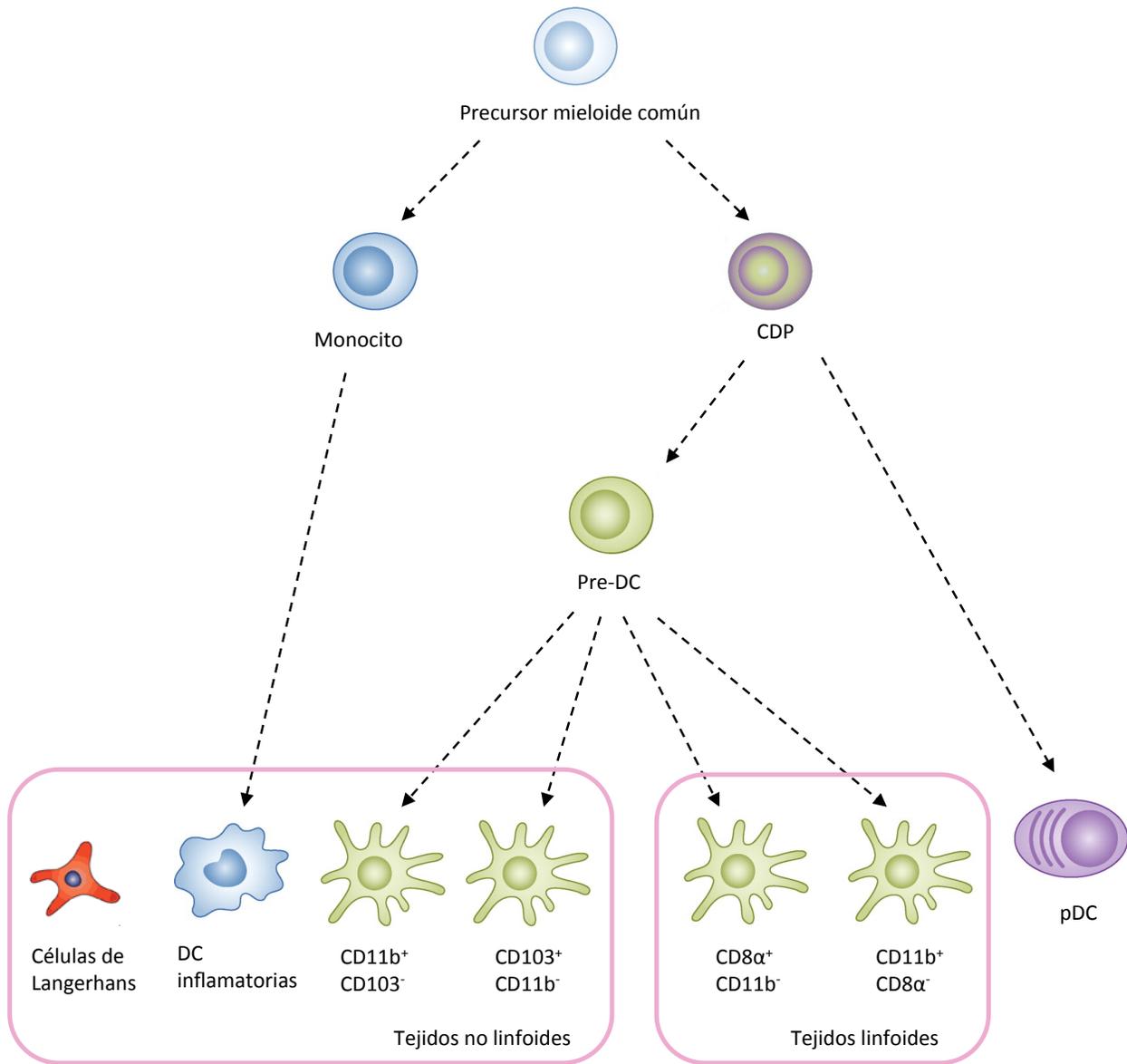


Figura 1.1.3. Esquema de las subpoblaciones de células dendríticas y sus progenitores en ratón. Todas las subpoblaciones de DC, salvo las células de Langerhans y las DC inflamatorias se originan a partir de un progenitor común (CDP), el cual da lugar a las pDC y al precursor común de las cDC (Pre-DC). Estas cDC se dividen según su localización y capacidad migratoria en DC residentes de tejidos linfoides y DC migratorias. Dentro de estos grupos existen varias subpoblaciones que se diferencian por su expresión de diferentes marcadores, tal como se muestra en la figura. Las DC inflamatorias se generan en determinados contextos inflamatorios a partir de monocitos que provienen del torrente sanguíneo. Las células de Langerhans pertenecen al grupo de las cDC migratorias de tejidos no linfoides pero no comparten el precursor con el resto de las DC, sino que se originarían a partir de precursores que migrarían a la epidermis durante la etapa embrionaria.

Además de estar involucradas en el disparo de la respuesta adaptativa, las DC participan en mecanismos asociados a su control. En contraposición al fenotipo inmunogénico, se encuentra la DC tolerogénica, que se caracteriza por su función inmunosupresora (revisado por ²⁶). Gran parte de la información sobre este tipo de DC proviene de estudios realizados en enfermedades que presentan un gran componente de evasión de la respuesta inmune. Por ejemplo en el caso del cáncer, se han detectado poblaciones de DC tolerogénicas asociadas a los tumores, con la capacidad de suprimir respuestas de células T citotóxicas o incluso de promover la proliferación de células T reguladoras. Este fenotipo de DC tolerogénica ha sido reproducido *in vitro* utilizando una gran variedad de agentes inmunomoduladores, entre los que se encuentran la dexametasona²⁷, la 1-,25-dihidroxitamina D3²⁸, salicilatos²⁹ y la citoquina IL-10³⁰. Estas DC presentan un fenotipo semi-maduro³¹ o inmaduro³² e inducen respuestas de células T reguladoras o la anergia T. El fenotipo de DC tolerogénica generalmente se asocia con una baja o moderada expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 y/o con la inducción de moléculas inhibitorias como PD-L1 y PD-L2 (del inglés, *programmed death ligand 1* y 2, respectivamente). Además estas DC generalmente producen menores cantidades de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-1, IL-6 y TNF- α , y suelen presentar un aumento en la síntesis de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Todo esto se traduce en una incapacidad de inmunoestimular los linfocitos T antígeno específicos, dando lugar a una respuesta de células T reguladoras o la anergia y/o apoptosis de estos linfocitos. Evidencias recientes indican que la inducción de DC tolerogénicas podría ser útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias crónicas; en varios modelos animales de estas enfermedades la inyección de DC previamente tolerizadas frenó o retrasó el progreso de la enfermedad³³⁻³⁵. Aunque la información al respecto es limitada, es interesante considerar que el desarrollo de DC tolerogénicas podría ocurrir en el transcurso de una respuesta inflamatoria, particularmente durante su fase resolutive en la cual habría presentes señales reguladoras como la IL-10 que favorecerían su diferenciación. Esto contribuiría a prevenir el desencadenamiento de respuestas exacerbadas y autorreactivas, dado que la pérdida de control de la inflamación favorecería la exposición de antígenos propios resultantes del daño tisular sobre DC activadas.

En cuanto al progenitor que da lugar a las DC, contrario a lo que se sostenía anteriormente, ahora se conoce que los monocitos no son responsables de dar lugar a las distintas subpoblaciones de DC mencionadas arriba; existe un precursor CD11c⁺ MHC II⁻ (pre-cDC) capaz de proliferar, que se origina en la médula ósea y migra a través de la sangre hacia tejidos linfoides y no linfoides, donde se diferencia en DC^{36,37}. Sin embargo, se ha reportado en varios modelos *in vivo* de infecciones parasitarias³⁸, fúngicas³⁹,

bacterianas⁴⁰ y virales⁴¹ que los monocitos son capaces de migrar a los tejidos inflamados y diferenciarse en una población de DC que se conoce como DC inflamatorias. Estas células expresan los marcadores MHC II, CD11c, CD11b, F4/80 y Ly6C³⁸, y el receptor CCR7^{38,42}, lo cual las hace capaces de migrar hacia los ganglios, donde pueden activar linfocitos T y contribuir así al disparo de la respuesta inmune adaptativa^{38,39}. Con respecto a la señal necesaria para su diferenciación a DC, se plantea que sería el factor GM-CSF (del inglés, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) ya que las DC generadas *in vitro* a partir de precursores de médula ósea con esta citoquina, denominadas BMDC (del inglés, *Bone Marrow Derived Dendritic Cells*) presentan un fenotipo muy similar a las DC inflamatorias⁴³. Sin embargo, esto no está completamente esclarecido ya que existen reportes contradictorios acerca de la situación *in vivo*. Si bien un estudio realizado con quimeras de médula ósea deficientes en el receptor para GM-CSF mostró que este factor era dispensable para la diferenciación a DC inflamatoria en modelos de inflamación pulmonar inducida por patógenos o de inflamación sistémica⁴⁴, existen otros reportes de DC inflamatorias en varios modelos dependientes de GM-CSF^{37,45}. De todas maneras, es importante tener en cuenta la similitud entre las DC inflamatorias y las BMDC ya que estas últimas constituyen una herramienta *in vitro* ampliamente utilizada para el estudio fenotípico y funcional de las DC, y fue el modelo que se utilizó en esta tesis.

1.1.1 El receptor PPAR γ en la diferenciación y activación de células mieloides

Los receptores PPAR (del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor*) pertenecen a una familia de receptores nucleares llamados “*orphan-adopted*”. Se conocen tres tipos de receptores PPAR, llamados alfa (PPAR α), gamma (PPAR γ) y delta (PPAR δ), que poseen diferencias en su perfil de distribución en el organismo. Estos receptores están involucrados en la regulación del metabolismo de los lípidos y de la glucosa en el hígado, adipocitos, músculo esquelético y macrófagos, y sus ligandos endógenos incluyen una variedad de lípidos dietarios así como también metabolitos derivados de éstos (ver figura 1.1.4) (revisado en ⁴⁶⁻⁴⁸).

Los receptores PPAR se enlazan a su secuencia blanco en el ADN, conocida como elemento de respuesta a PPAR (PPRE), formando heterodímeros con el receptor RXR (del inglés, *retinoid X receptor*). En ausencia de ligando el heterodímero se encuentra unido a un correpresor que inhibe la unión de PPAR a PPRE. Al unirse el ligando, el receptor sufre cambios conformacionales que permiten la unión de

coactivadores y la disociación de los correpresores, lo cual conduce a la unión del heterodímero al PPRE en el promotor, dando lugar al comienzo de la transcripción de los genes blanco⁴⁹.

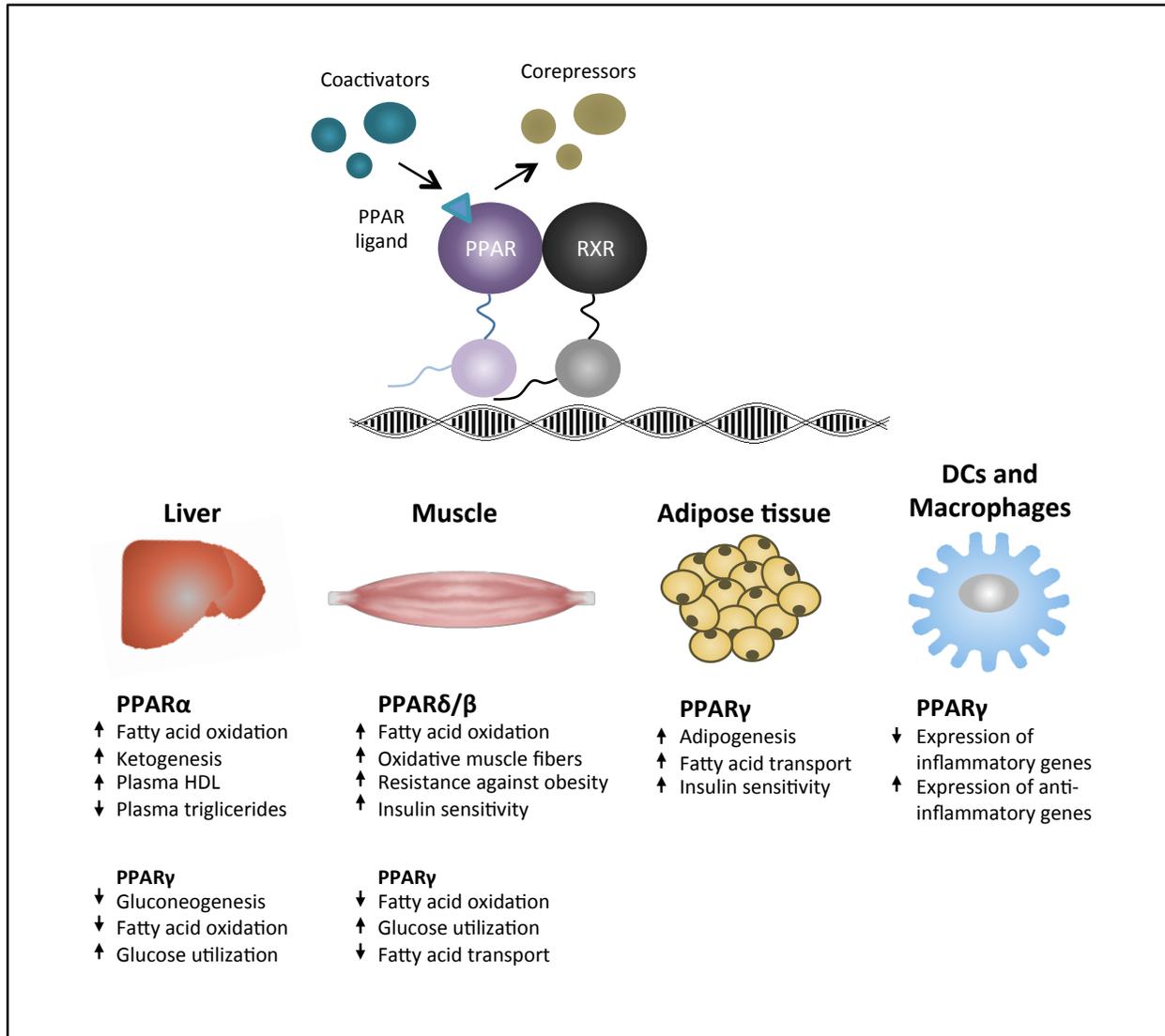


Figura 1.1.4. Propiedades estructurales y funcionales de los receptores PPAR. Esquema ilustrando los principales mecanismos metabólicos regulados por los PPAR en hígado, músculo y tejido adiposo así como en células mieloides incluyendo macrófagos y DC. La unión de PPAR a su ligando promueve la disociación de correpresores y la unión de coactivadores, conduciendo a la transcripción de genes reporteros de PPAR. Algunas moléculas lipídicas como ácidos grasos poliinsaturados, prostaglandina 15d-PGJ2, y NO₂-FA tienen la capacidad de unirse y activar los receptores PPAR. Tomado de ¹⁴³.

Existen varios trabajos *in vivo* e *in vitro* que postulan la participación del receptor PPAR γ en el programa de diferenciación y maduración de macrófagos, y particularmente en el establecimiento y mantenimiento del fenotipo alternativo⁵⁰. Dado que la estimulación con IL-4 se asocia a una fuerte inducción de PPAR γ y a la producción de sus ligandos endógenos 15-HETE y 13-HODE, este receptor podría contribuir a la diferenciación al fenotipo alternativo⁵¹. Por otro lado, la IL-4 es capaz de activar la transcripción de genes reporteros de PPAR γ , como el receptor barrendero CD36⁵¹. La conexión de PPAR γ con el establecimiento del fenotipo alternativo resulta más notoria al analizar las propiedades de macrófagos deficientes en este receptor⁵⁰. Estos macrófagos presentan una marcada disminución en los niveles de expresión de varios genes reporteros de PPAR γ pero además tienen muy disminuida la expresión del gen de la Arg-1 en respuesta a la IL-4, siendo la Arg-1 uno de los principales marcadores del fenotipo alternativo. Más aún, la ausencia de PPAR γ en estos macrófagos inhibió el efecto potenciador de ligandos sintéticos de PPAR γ , como la rosiglitazona (RGZ) sobre la respuesta de Arg-1 inducida por IL-4. Además, estas observaciones realizadas *in vitro* tienen un correlato *in vivo* ya que la administración de RGZ en ratones causó no sólo un incremento en la expresión de varios genes reporteros de PPAR γ en los macrófagos, sino un incremento en la expresión de Arg-1, evidenciando la polarización en la diferenciación de estas células hacia el fenotipo alternativo⁵². Posteriormente, este efecto potenciador se explicó por la presencia de un sitio de unión a PPAR γ en el potenciador del gen de la Arg-1. Finalmente, se acepta que parte de la respuesta anti-inflamatoria de los macrófagos alternativos está regulada por PPAR γ , ya que en ensayos en macrófagos *knockout* (del inglés, deficientes) en este receptor la IL-4 fue incapaz de suprimir la producción de IL-6 por estas células⁵⁰. Es posible que este efecto anti-inflamatorio de PPAR γ se vincule a su capacidad de interferir con la transcripción mediada por NF- κ B, en base a una interacción con complejos correpresores ubicados en los promotores de los genes blanco de este factor⁵³.

Estudios realizados más recientemente con el objetivo de profundizar sobre la conexión que existe entre las vías de señalización estimuladas por la IL-4 y PPAR γ mostraron la existencia de una interacción entre este receptor y el factor de transcripción STAT6. Al parecer, este factor estabilizaría la unión de PPAR γ al ADN, causando un aumento en el número de genes regulados por PPAR γ y aumentando la magnitud de las respuestas producidas⁵⁴. En conclusión, los trabajos realizados hasta el momento sugieren que tanto STAT6 como PPAR γ cumplirían un papel importante en el establecimiento del fenotipo alternativo en macrófagos, y que podría darse una cooperación entre estos dos factores en el promotor de los genes característicos de la activación alternativa, que conduciría a una potenciación de su expresión.

En las DC se ha observado que PPAR γ sería fuertemente inducido durante el desarrollo de estas células, sugiriendo su participación durante el proceso de diferenciación de las DC. Interesantemente, el tratamiento con ligandos de PPAR γ durante el período de diferenciación induce un fenotipo esencialmente tolerogénico en las DC⁵⁵⁻⁵⁸. Incluso luego de ser estimuladas con LPS, estas DC se caracterizan por una baja expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 y una baja síntesis de IL-12 en comparación con las DC control. Además, estas células demostraron ser pobres activadoras de células T CD4⁺ y CD8⁺, induciendo un menor índice de proliferación y una menor síntesis de citoquinas, incluyendo IFN γ e IL-2. Para el caso de las células T CD8⁺ también se observó una disminución en la citotoxicidad. Estos efectos demostraron ser dependientes de PPAR γ gracias a experimentos realizados en DC deficientes en este receptor en los cuales se observó una reversión del fenotipo en las células *knockout*.

En cuanto a las vías de señalización interferidas por PPAR γ en la activación de las DC, se postula que al menos involucraría la inhibición de la unión de NF- κ B al ADN^{59,60}. Otra vía de señalización sobre la que PPAR γ podría actuar sería la de las MAPK (del inglés, *Mitogen Activated Protein Kinases*); trabajos realizados en DC deficientes para el gen de PPAR γ muestran que el descenso en la fosforilación de ERK1 observado en las DC *wild type* (del inglés, salvajes) tratadas con el ligando de PPAR γ se pierde al no estar funcional el receptor^{59,60}.

Por otro lado, otros trabajos evidencian que la activación de PPAR γ conduce a la inducción de las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido retinoico, otra molécula que ha sido asociada al fenotipo tolerogénico. En estas DC tratadas con un ligando sintético de PPAR γ , se ha reportado un aumento en los niveles de la forma *all-trans* de este compuesto⁶¹. El papel del ácido retinoico en la modulación de la respuesta se vincula con la capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T reguladores⁶². Más aún, estudios de otro grupo demostraron que las DC tratadas con un agonista de PPAR γ son capaces de inducir mayores niveles de linfocitos T reguladores, tanto *in vivo* como *in vitro*⁶³.

1.1.2 Señalización por Nrf2 en células mieloides

Nrf2 (del inglés, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), es un factor de transcripción que controla la expresión de un grupo de enzimas y proteínas con función antioxidante y desintoxicante⁶⁴. La actividad de este factor se encuentra fuertemente regulada por Keap1 (del inglés, *Kelch-like ECH-associating protein*), una molécula anclada a los filamentos de actina del citoesqueleto. En condiciones de

homeostasis, Keap1 promueve la ubiquitinación de Nrf2 y su consecuente degradación por el proteasoma, manteniendo de esta manera una baja expresión basal de los genes regulados por Nrf2. Bajo determinadas condiciones de estrés, la aducción de los tioles reactivos de Keap1 con una molécula electrófila le impiden interactuar con Nrf2, el cual escapa de la degradación por el proteasoma y se acumula en el núcleo, induciendo la expresión de los genes regulados por el elemento ARE (elemento de respuesta antioxidante)(ver figura 1.1.5)⁶⁵. De esta manera, Nrf2 contribuye a mantener la homeostasis redox. De hecho, la deficiencia de este factor en ratones los vuelve más susceptibles a tóxicos presentes en el ambiente y aumenta de manera significativa su predisposición a varios desórdenes oxidativos e inflamatorios que incluyen enfisema⁶⁶, asma⁶⁷, fibrosis⁶⁸ y colitis⁶⁹.

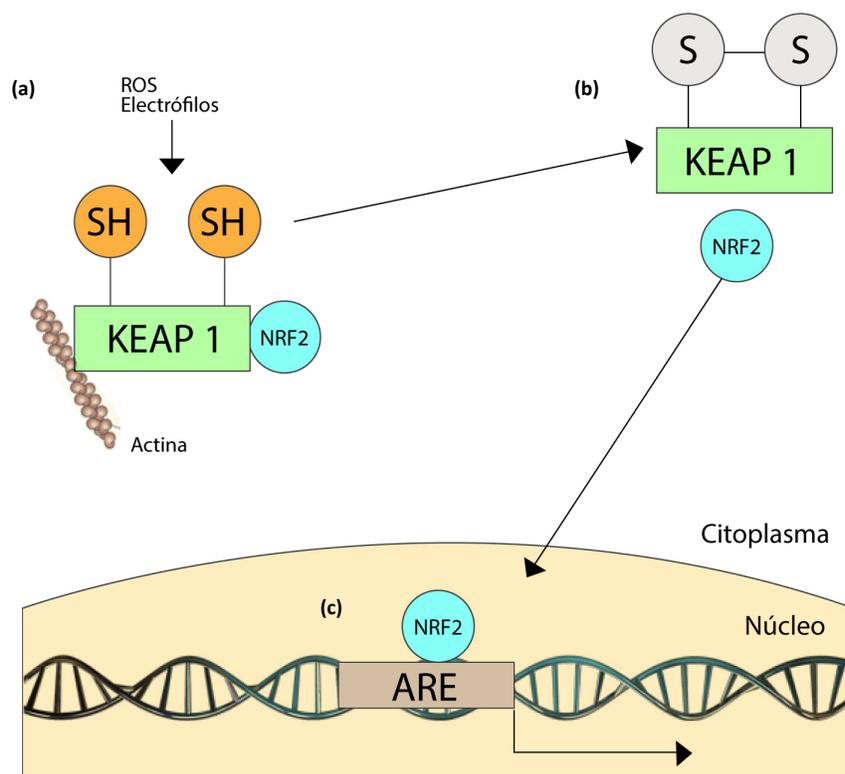


Figura 1.1.5. Esquema de la regulación de la vía de Nrf2. **(a)** Bajo condiciones normales, Keap1 mantiene a Nrf2 anclado a filamentos de actina del citoesqueleto en el citoplasma, promoviendo su degradación por el proteasoma. **(b)** La reacción de especies oxidantes con los tioles reactivos de Keap1 desestabiliza la unión de este factor con Nrf2 y promueve la ubiquitinación de Keap1. Moléculas electrófilas también pueden reaccionar con los tioles reactivos de Keap1, formando aductos vía reacción de Michael (ver figura 1.2.3). **(c)** Nrf2 es liberado e ingresa al núcleo, donde promueve la transcripción de los genes de fase II, regulados por el elemento ARE.

Estudios recientes han revelado que Nrf2 también participa en la respuesta inmune; la deficiencia de este factor en células mieloides causa una acumulación de ROS, lo cual afectaría la regulación de la respuesta inflamatoria a través de la activación de varias vías de señalización con acción pro-inflamatoria, como la vía de NF- κ B. Macrófagos provenientes de ratones deficientes en este factor (Nrf2^{-/-}) mostraron niveles elevados de activación a través de sus TLRs, así como de su señalización por NF- κ B, lo cual se evidenció en un fuerte aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias⁷⁰. Por otro lado, la delección de este factor en DCs conduce a mayores niveles basales de expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias, mayor capacidad inmunoestimuladora de linfocitos T, y niveles elevados de ROS^{71,72}. Estos resultados indican que Nrf2 estaría involucrado en los mecanismos de activación de estas células. Sin embargo, la alta producción de ROS no parecería ser la causa de la disregulación observada, ya que la incubación de DC Nrf2^{-/-} con las vitaminas C y E, que poseen acción antioxidante, es capaz de disminuir la producción de ROS pero no los efectos observados a nivel del estado de activación de la célula⁷³. Se ha postulado que el mecanismo mediante el cual Nrf2 regula la inmunogenicidad de las DC involucraría a la vía de las MAPK, más específicamente a p38, ya que su inhibición condujo a un descenso significativo en la expresión de moléculas coestimuladoras en las DC Nrf2^{-/-} así como en su capacidad de inducir la proliferación específica de antígeno de linfocitos T CD8⁺. El estudio de los blancos de fosforilación de esta quinasa CREB y ATF1 mostró que estos factores se encontraban hiperfosforilados en condiciones basales en las DC Nrf2^{-/-}, y esta fosforilación se vio significativamente reducida tras el tratamiento con un inhibidor de p38⁷³.

Entre los genes que son regulados por Nrf2 se encuentra la Hemoxigenasa 1 (HO-1)⁷⁴. La HO-1 juega un papel central en la homeostasis del compartimiento vascular, por lo cual alteraciones en su función afectan el desarrollo de determinadas enfermedades inflamatorias; esto se apoya en observaciones derivadas de su deficiencia en humanos^{75,76} y en estudios realizados en ratones deficientes en esta enzima (revisado por ⁷⁷). Su acción antioxidante proviene de su capacidad de degradar el grupo hemo de proteínas desestabilizadas y de sus productos de degradación, la bilirrubina y la biliverdina. Además el CO tiene acción anti-apoptótica y vasodilatadora, que se suman a los efectos anti-inflamatorios ya mencionados, basados en su capacidad de inhibir la translocación de NF- κ B. Asimismo, la expresión de esta enzima en DC se ha postulado como un mecanismo de tolerogénesis, actuando principalmente sobre los linfocitos T CD4⁺, inhibiendo la proliferación de poblaciones efectoras e induciendo su diferenciación a linfocitos T reguladores⁷⁸. Por otro lado, un estudio reciente vincula a la vía de p38 CREB/ATF1 con la HO-1; la utilización de un inhibidor de esta enzima causó un marcado aumento en la

expresión de moléculas coestimuladoras en DC, lo cual se vio reflejado en la capacidad inmunoestimuladora de estas células, ya que las DC tratadas con el inhibidor inducían mayores niveles de proliferación de linfocitos T CD8⁺ que las DC control. Este aumento en el nivel de activación de las DC fue acompañado de una mayor fosforilación de p38 y de sus blancos CREB y ATF1. Los autores de este trabajo proponen que este mecanismo podría ser explicado por la acumulación del sustrato de la HO-1, el hemo, que sucede a la inhibición de esta enzima. La incubación de DC con hemo causó la maduración de estas células, apoyando esta hipótesis⁷⁹.

1.2 Nitroalquenos: productos de nitración de ácidos grasos insaturados con propiedades anti-inflamatorias

La formación de productos electrofílicos derivados de ácidos grasos insaturados reviste interés ya que debido a sus propiedades químicas, estos ácidos grasos son altamente susceptibles a sufrir diversas reacciones de oxidación y adición de radicales, ya sea durante el metabolismo basal como durante las respuestas inflamatorias⁸⁰. Además, se ha postulado que varios productos electrofílicos derivados de este tipo de ácidos grasos son capaces de actuar como mediadores que acentúan o regulan el proceso inflamatorio. Nuestro grupo está particularmente interesado en un grupo de estas moléculas, que se caracteriza por presentar un sustituyente nitroalqueno que le confiere la electrofilia. En la última década han surgido múltiples evidencias que apoyan la formación *in vivo* de productos de nitración de ácidos grasos (NO₂-FA, del inglés, *nitro fatty acids*) (ver figura 1.2.1) y su relevancia en la modulación de la respuesta de varios tipos celulares^{81,82}. El mecanismo involucrado en la nitración de ácidos grasos insaturados *in vivo* no se ha elucidado, pero se postula que es llevado a cabo por especies derivadas del óxido nítrico (*NO) a través de múltiples mecanismos que convergen en la adición homolítica al doble enlace del radical dióxido de nitrógeno (*NO₂), dando lugar a una variedad de regio y estereoisómeros (revisado por ⁸³). La formación del *NO₂ es el paso limitante en la reacción de nitración y los posibles mecanismos para su generación han sido revisados por ⁸³ e incluyen los siguientes: oxidación del *NO por el oxígeno (O₂), descomposición de peroxinitrito formado a partir de *NO y superóxido, oxidación de NO₂⁻ a *NO₂ promovida por peroxidasas y hemoproteínas, y protonación de NO₂⁻ en medio ácido (ver figura 1.2.2).

El análisis de varios derivados nitroalquenos de los ácidos oleico, linoleico y araquidónico revelan que estas especies presentan reactividades químicas únicas, responsables de una gran variedad de efectos

sobre diferentes vías de señalización celular⁸⁴⁻⁸⁶. Muchos de los mismos se deben a la capacidad que tienen estas moléculas de actuar como electrófilos. El grupo nitro es altamente electronegativo, lo cual le confiere al carbono beta adyacente al enlace carbono-nitrógeno una gran electrofilia, favoreciendo su reacción vía adición de Michael con nucleófilos^{87,88} (ver figura 1.2.3). Los NO₂-FA reaccionan formando aductos tanto *in vitro* como *in vivo* con el glutatión y los residuos de Cys e His de proteínas. En el caso de las proteínas, la nitroalquilación constituye una modificación postraduccional que puede producir cambios en la estructura y la función como en la distribución subcelular de la proteína modificada, debiéndose esto último al fuerte carácter hidrofóbico que le confiere la aducción del NO₂-FA. Esto facilitaría el transporte de la proteína blanco a las membranas⁸⁸. Se ha reportado que los NO₂-FA son capaces de formar aductos con varias proteínas, entre ellas la GADPH⁸⁸, Keap1⁸⁹ y el factor de transcripción NF-κB⁹⁰; esta propiedad podría estar vinculada a varios efectos biológicos asignados a estas moléculas, esta idea se desarrollará más adelante.

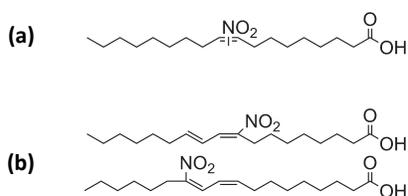


Figura 1.2.1. Esquema de las estructuras de los NO₂-FA derivados del (a) ácido oleico (ANO₂) y (b) linoleico conjugado (NO₂CLA)

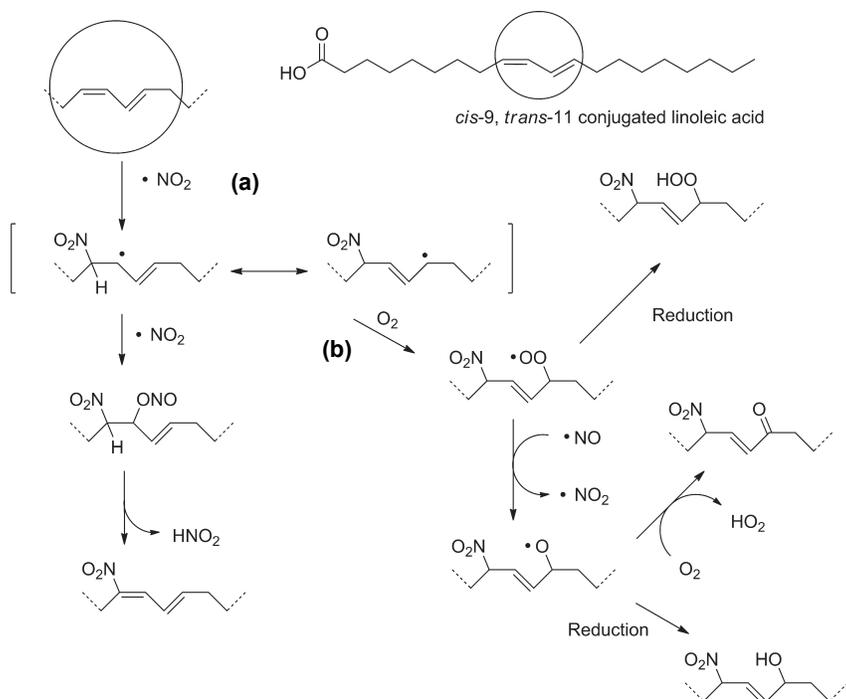


Figura 1.2.2. Esquema del mecanismo propuesto para la nitración del ácido linoleico conjugado. La nitración del ácido linoleico conjugado se da a través de la adición inicial de dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) al doble enlace, formando un radical estabilizado por resonancia. En condiciones de baja tensión de oxígeno (a), una segunda molécula de $\cdot\text{NO}_2$ reacciona con el radical, formando un intermediario nitrito inestable que se descompone para formar ácido nitro linoleico conjugado y ácido nitroso. En presencia de oxígeno (b), el radical peroxilo es inicialmente formado, para luego reducirse formando un derivado nitro-peroxi. El radical peroxilo puede ser reducido a un radical hidroxilo, seguido de la reducción a un derivado nitro-hidroxi, o de la oxidación a un nitro-ceto derivado. Aunque tanto la presencia o ausencia de oxígeno conducen a la formación de electrófilos, los grupos formados son distintos, siendo un nitroalqueno en condiciones de ausencia de oxígeno y una cetona α,β -insaturada cuando hay alta tensión de oxígeno. Tomado de ⁸⁰.

Otra característica única de la aducción de los NO₂-FA con nucleófilos es que a diferencia de lo que sucede con otros electrófilos, ésta es reversible⁹¹. Gracias a esta propiedad son capaces de mediar eventos de señalización, ya que su efecto sobre la proteína blanco es transitorio. Además, existe la posibilidad de que sean transferidos de un nucleófilo a otro, en función de lo observado *in vitro* por Schopfer y colaboradores ⁹².

Reportes recientes indican que el ácido linoleico conjugado (CLA) sería un sustrato preferencial de nitración frente a otros ácidos grasos e incluso a la tirosina tanto *in vitro* como *in vivo*; derivados nitroalquenos del CLA (NO₂CLA) han sido detectados en el plasma de individuos sanos y se encuentran aumentados en tejidos sometidos a isquemia-reperfusión. También se ha demostrado su formación a partir de macrófagos activados ⁸¹. En conclusión, la información disponible indica que el NO₂CLA sería el NO₂-FA presente en mayor concentración *in vivo*, y por lo tanto su estudio presenta gran relevancia biológica.

1.2.1 Propiedades biológicas de los NO₂-FA

Los NO₂-FA han demostrado ejercer efectos anti-inflamatorios sobre una variedad de tipos celulares. En macrófagos, se ha observado que son capaces de inhibir la diferenciación hacia el fenotipo clásico, mencionado anteriormente. Más concretamente, presentan la propiedad de inhibir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- α y MCP-1, así como la expresión de la enzima NOS2^{90,93}. El principal mecanismo atribuido a este efecto es la inhibición de la translocación de NF- κ B al núcleo, impidiendo así la transcripción de los genes inflamatorios regulados por este factor. Se postula que esta propiedad podría deberse a la capacidad de los NO₂-FA de actuar como electrófilos y formar aductos con proteínas, ya que se han detectado aductos de NO₂-FA con las subunidades p50 y p65 de NF- κ B en células tratadas con los mismos, así como un descenso en la actividad de este factor luego del tratamiento^{90,93}.

Por otro lado, la administración de NO₂-FA ha tenido resultados beneficiosos en varios modelos de enfermedades inflamatorias, como la aterosclerosis⁹⁴, la enfermedad inflamatoria intestinal⁹⁵, la isquemia-reperfusión cardíaca⁹⁶ y renal⁹⁷ y la diabetes⁹⁸. Varios de los efectos observados se han atribuido a su capacidad de interactuar con factores de transcripción, entre los que se encuentran PPAR γ y Nrf2.

1.2.1.1 Activación del receptor PPAR γ

Los NO₂-FA pueden actuar como ligandos del receptor PPAR γ . Según estudios realizados con construcciones conteniendo el gen de la luciferasa bajo el control de sitios de unión a PPAR γ , los NO₂-FA poseen la capacidad de activar en forma robusta este receptor. El derivado de la nitración del ácido oleico, el ácido nitro oleico (OANO₂) fue el que activó de forma más potente PPAR γ , detectándose una activación significativa a concentraciones ~100nM^{85,99}. Estos resultados fueron confirmados por estudios de diferenciación de preadipocitos en los cuales se observó que el OANO₂ indujo su diferenciación y la expresión de marcadores específicos de células adiposas (PPAR γ 2 y Fabp4), así como un aumento en la incorporación de glucosa en los adipocitos diferenciados. Todos estos efectos fueron parcialmente inhibidos en la presencia del antagonista irreversible de PPAR γ GW9662⁸⁵. En macrófagos, también se observó la activación de este receptor a través de la inducción del receptor barrendero CD36, el cual es un gen reportero de PPAR γ ⁹⁹. Por otro lado, los efectos anti-inflamatorios observados en varios modelos *in vivo* han sido atribuidos, al menos en parte a la activación de este receptor^{95,98}. Además, estas moléculas, debido a su electrofilia, formarían un aducto covalente con el receptor⁹⁸.

Por otro lado, resultados provenientes de mi trabajo final de Licenciatura sugieren que los NO₂-FA son capaces de promover la activación alternativa de macrófagos en presencia de IL-4 a través de un mecanismo que involucra a PPAR γ . En estos ensayos se observó un aumento de la expresión del marcador de activación alternativa Arg-1 en macrófagos tratados con OANO₂ en presencia de IL-4 con respecto a los macrófagos tratados únicamente con IL-4, y este efecto fue revertido al incubar las células con el inhibidor GW9662¹⁰⁰.

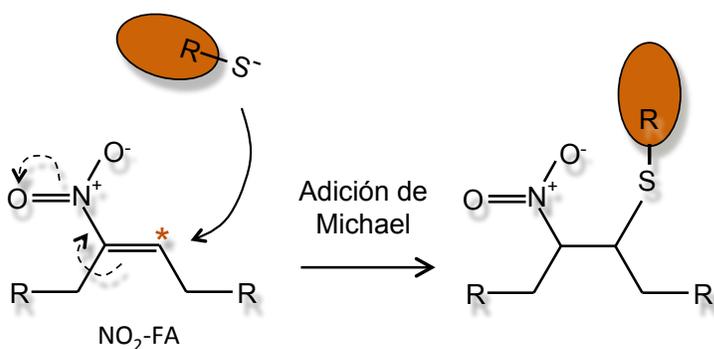


Figura 1.2.3. Esquema del mecanismo de nitro-alquilación de los NO₂-FA a través de la reacción de adición de Michael. En los NO₂-FA, El carbono β adyacente al grupo nitro es altamente electrófilo y susceptible de reaccionar con nucleófilos, como los tioles presentes en proteínas. De esta manera reacciona con las mismas formando aductos, constituyendo una modificación postraduccional

1.2.1.2 Activación de Keap1/Nrf2

Existen varios reportes de que los NO₂-FA tienen la capacidad de activar el factor nuclear Nrf2, lo cual está ligado a su condición de moléculas electrófilas. Se ha demostrado que inducen de forma dependiente de la dosis la expresión de HO-1 a concentraciones dentro del rango μ M, tanto en cultivos celulares como en modelos animales^{81,89,101-104}. También se ha reportado la inducción de otros genes regulados por ARE además del de la HO-1, como GCLM y NQO1, que codifican la subunidad modificadora de la ligasa de glutamato-cisteína, y la oxidorreductasa de NADPH:quinona 1, respectivamente¹⁰².

1.2.1.3 Inducción de la vía de *shock* térmico

Un estudio del perfil transcripcional de células HUVEC (del inglés, *Human Umbilical Vein Embryonic Cells*) tratadas con OANO₂ develó una vía de señalización inducida por NO₂-FA no reportada hasta el momento: la vía de *shock* térmico¹⁰². Esta respuesta es disparada por diversos factores ambientales y fisiológicos causantes de estrés, y resulta en la rápida inducción de genes que codifican chaperonas, proteasas, y otras proteínas que contribuyen a proteger y recuperar a la célula del daño celular asociado a la producción de proteínas mal plegadas. Esta respuesta es regulada por una familia de factores de transcripción de *shock* térmico (HSF, del inglés *Heat Shock Transcription Factor*). En condiciones de reposo, los HSF se encuentran bajo la forma de monómeros inertes estabilizados por chaperonas, tanto en el citosol como en el núcleo. Cuando la célula es expuesta a una variedad de agentes estresantes, la acumulación de proteínas mal plegadas lleva a la liberación de los HSF por las chaperonas, permitiendo su trimerización y formándose así el factor activo, capaz de unirse al ADN y promover la transcripción de los genes regulados por esta vía^{105,106}. El tratamiento con OANO₂ indujo la expresión de varios genes altamente caracterizados y relacionados a la respuesta de *shock* térmico, como son HSPA6 (del inglés, *heat shock 70-kDa protein 6*), HSPA1A (del inglés, *heat shock 70-kDa protein 1A*), y DNJA4 (del inglés, *DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4*)¹⁰². Si bien no existe mucha información sobre el papel que esta vía podría tener durante la respuesta inflamatoria, hay evidencia de que su inducción podría ser beneficiosa para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y asociadas a defectos en el plegamiento de proteínas. Por otro lado, podría promover la supervivencia de la célula frente a un estímulo estresante capaz de desencadenar la respuesta de muerte.

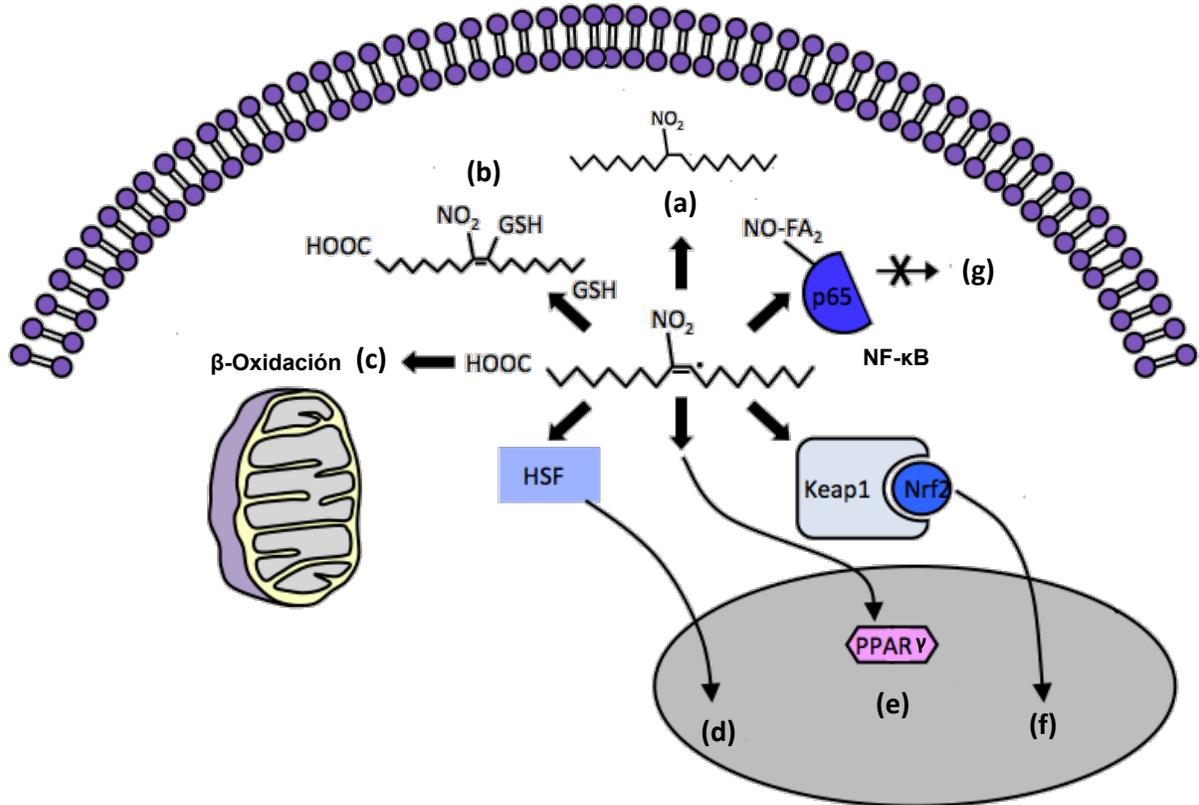


Figura 1.3. Destinos conocidos de los NO₂-FA dentro de la célula. Una vez que ingresan a la célula, los NO₂-FA pueden (a) sufrir la reducción de su doble enlace, perdiendo la electrofilia, (b) Formar aductos con glutatión, (c) Sufrir β –oxidación, (d) Activar la vía de shock térmico, (e) activar PPAR γ , (f) activar la vía de Nrf2 o (g) inhibir la vía de NF- κ B.

1.3 Hipótesis

Teniendo en cuenta la información previamente expuesta, resulta evidente que los NO₂-FA pueden ser formados durante la respuesta inflamatoria, siendo capaces de actuar sobre varias vías de señalización involucradas en este proceso, para modularla (ver figura 1.3). Más en particular, son capaces de afectar la activación de los macrófagos. Existe evidencia de que estos mediadores inhibirían la activación clásica de macrófagos, que se traduce en un descenso en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y de la NOS2. Por otro lado, antecedentes provenientes de mi trabajo de Tesina de Licenciatura apuntan a una posible potenciación por NO₂-FA de la activación alternativa de macrófagos inducida por IL-4, sugiriendo que estos mediadores no sólo limitarían la diferenciación hacia fenotipos más inflamatorios, sino que también favorecerían la polarización hacia poblaciones con función anti-inflamatoria. Hasta el momento, hemos observado un efecto sobre la inducción de Arg-1, uno de los principales marcadores del fenotipo alternativo; sin embargo, para poder afirmar contundentemente un papel de los NO₂-FA como potenciadores del fenotipo alternativo, es necesario estudiar la expresión de otros genes asociados a este fenotipo.

En cuanto al efecto de los NO₂-FA sobre las DC, no existen reportes hasta el momento, pero considerando la información disponible en cuanto a la capacidad de los NO₂-FA de activar las vías de señalización mediadas por PPARγ y Nrf2, y al rol de estas vías en el potencial inmunogénico de las DC, resulta pertinente plantear la hipótesis de que estos mediadores podrían afectar la capacidad de activación de las DC y eventualmente su función como célula presentadora de antígeno. A través de esta modulación los NO₂-FA podrían contribuir no sólo a la regulación de la respuesta inflamatoria local, sino también eventualmente a modular la respuesta adaptativa generada en el ganglio, como consecuencia de la migración de DC activadas desde el foco de inflamación.

1.4 Objetivos

Teniendo en cuenta la hipótesis previamente planteada, esta tesis tiene como objetivo general el estudio de la capacidad de los NO₂-FA de modular la diferenciación de macrófagos y DC. En este marco se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la capacidad de los NO₂-FA de modular globalmente la activación alternativa de macrófagos a través del estudio de la expresión de los genes *Arg1* (Arg-1), *Mrc1* (MR), *Retnla* (RELM α) y *Chi3l3* (Ym1), en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y en un modelo *in vivo*.
- Estudiar el efecto de los NO₂-FA sobre la activación de las DC a través del análisis de varios marcadores del estado de maduración, tanto en condiciones basales como luego de un estímulo pro-inflamatorio.
- Estudiar la capacidad de las DC condicionadas con NO₂-FA de promover la activación de linfocitos T
- Explorar la contribución de los receptores PPAR γ y Nrf2 al fenotipo observado

2 Materiales y métodos

2.1 Reactivos generales

Las sales inorgánicas utilizadas para preparar las soluciones tampón y los reactivos que se listan a continuación fueron obtenidos de Sigma: solución antibiótica/antimicótica conteniendo penicilina, estreptomina y anfotericina B, bicarbonato de sodio testeado para cultivo celular, dimetil sulfóxido (DMSO) testeado para cultivo celular, EDTA, cóctel de inhibidores de proteasas, α -isonitrosopropiofenona (ISPF), HEPES, lauril sulfato de sodio (SDS), L-glutamina, L-arginina, marcadores de peso molecular preteñidos, medios de cultivo DMEM y RPMI, N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED), persulfato de amonio, seroalbúmina bovina (BSA), sulfanilamida, N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato (NED), tampón de lisis de glóbulos rojos y urea. La acrilamida fue obtenida de Amresco. El ditioneitol (DTT) y el monolaurato de polioxietilen-sorbitan (Tween 20) fueron adquiridos de Applichem. El isopropanol, metanol, etanol, cloroformo, ácido sulfúrico y ácido fosfórico fueron obtenidos de Merck. El ácido oleico (OA), y el ácido linoleico conjugado (CLA) se adquirieron de Nu-Check Prep. La RGZ y el antagonista del receptor PPAR γ GW9662 fueron obtenidos de Cayman Chemical. La IL-4 se adquirió de Becton Dickinson y se conservó a -80 °C en una solución stock 50 μ g/ml conteniendo 0.5 mg/ml de BSA libre de endotoxinas como proteína *carrier*.

El ácido nitro-oleico (OANO₂), una mezcla de los isómeros ácido 9- y 10-nitro-9-cis-octadecanoico, y el ácido nitro-linoleico conjugado (NO₂CLA), una mezcla de los isómeros ácido octadeca-(9Z,11E)-dienoico and octadeca-(10E,12Z)-dienoico, fueron generosamente donados por el Dr. Bruce Freeman y el Dr. Francisco Schopfer (Departamento de Farmacología, Universidad de Pittsburgh, USA). Las soluciones stock se conservaron a -80 °C y su concentración se verificó antes por medida de la absorbancia a 270

nm en tampón KHPO_4 100 mM pH 7.4 para el caso del OANO_2 ($\epsilon=8.22 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ⁸⁵) y a 312nm en metanol ($\epsilon=11.2 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$), para el caso del NO_2CLA .

2.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de 8 a 12 semanas de edad de las cepas endogámicas Balb/c y C57BL/6, criados en el Laboratorio de Recursos Biológicos del Instituto Miguel Rubino (Dirección de Laboratorios Veterinarios, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca) y mantenidos en el bioterio del Instituto de Higiene, donde se alimentaron con ración y agua autoclavadas *ad libitum*. Los ratones transgénicos OTII, que expresan un TCR específico para el péptido de la OVA 323-339, fueron mantenidos en el bioterio del Institut Pasteur de Montevideo. Todos los protocolos utilizados en el trabajo con estos ratones fueron aceptados por la CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal, UdelAR).

2.3 Métodos de cultivo celular

2.3.1 Línea celular de fibroblastos L929

La línea celular de fibroblastos de ratón (L929, ATCC), fue generosamente donada por la Dra. Corraliza (Universidad de Cáceres, España); esta línea produce el factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos (M-CSF). Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 a confluencia en frascos de 25 cm^2 (Orange Scientific) en medio DMEM conteniendo L-glutamina 2mM, bicarbonato de sodio 1.5 g/L, HEPES 10 mM, penicilina 100 unidades/mL, estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, anfotericina B 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DMEM suplementado), al que se le agregó suero bovino fetal (SBF, certificado, Gibco, previamente descomplementado por calor) 10% (v/v). Para amplificar el cultivo, una vez que las células estuvieron cerca de confluencia se desprendieron del plástico mecánicamente mediante la ayuda de un raspador estéril (Greiner) y se subcultivaron en el mismo medio en frascos de 75 cm^2 (Orange Scientific) diluyendo la suspensión celular 1:6 como máximo. Para la producción del sobrenadante de cultivo a ser utilizado como fuente de M-CSF, se utilizaron frascos de 175 cm^2 (Nunc). Cuando las células llegaron a confluencia en los frascos de 75 cm^2 , fueron desprendidas con un raspador estéril y transferidas a los frascos de mayor tamaño. El cultivo se mantuvo durante 10 días y luego se recogió el sobrenadante, el cual se pasó por filtros estériles de 0,2 μm (Corning) y se conservó alicuotado a -80°C.

2.3.2 Preparación de macrófagos de ratón derivados de médula ósea (BMDM)

Para la preparación de BMDM (del inglés, *bone marrow derived macrophages*) se siguió el protocolo descrito a continuación. Ratones Balb/c (hembras de 10 a 12 semanas) fueron sacrificados por dislocación cervical, se hizo un corte en la piel a lo largo de las patas traseras y se extrajeron las tibias y los peronés. Los huesos fueron limpiados con etanol 70 % (v/v) y colocados en una placa de Petri con medio DMEM suplementado bajo cámara de flujo laminar. Luego, para extraer la médula ósea se cortaron las epífisis de los huesos y se perfundió el canal medular con medio DMEM suplementado utilizando una jeringa estéril con aguja 25G. La suspensión de células obtenida se centrifugó por 15 minutos a 1300 g, luego se descartó el sobrenadante y las células fueron incubadas durante 5 minutos en tampón de lisis de eritrocitos siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células restantes se lavaron con DMEM suplementado, centrifugando por 15 minutos a 1300 g, y luego se contaron en cámara de Neubauer para a continuación cultivarlas en placas de Petri (Greiner) a una concentración de 5×10^5 células/ml de medio DMEM suplementado conteniendo 25% (v/v) de SBF y 25% (v/v) de sobrenadante de cultivo de L929 como fuente de M-CSF. Como máximo se sembraron en cada placa 7.5×10^6 células. Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera conteniendo 5% de CO₂, y al quinto día se les repuso el medio de cultivo. A los 7 días, se descartó el sobrenadante y los macrófagos fueron desprendidos mecánicamente de las placas con un raspador estéril y contabilizados en cámara de Neubauer. Para los ensayos se pasaron a placas de 24 pozos (Nunc), en donde se sembraron 0.5×10^6 células por pozo, utilizando un volumen final de 1 ml de DMEM suplementado conteniendo SBF 1% (v/v).

2.3.3 Preparación de células dendríticas de ratón derivadas de médula ósea (BMDC)

Para la obtención de estos cultivos primarios se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 8-12 semanas y se siguió el protocolo descrito por Lutz et al ¹⁰⁷, con pequeñas modificaciones. El sacrificio de los animales y la recuperación de fémures y tibias se realizaron de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.2.

En la cámara de flujo laminar, sobre una placa de Petri, se cortaron las epífisis de los huesos con una tijera y se perfundió el canal medular con PBS (tampón fosfato salino, del inglés, *phosphate buffered saline*) apirógeno utilizando una jeringa de 3 ml con aguja 24G para extraer la médula ósea. La misma se disgregó pasando la suspensión 3 veces por la jeringa y se procedió a contar las células utilizando una

cámara de Neubauer, prestando especial atención a no contar los eritrocitos. Finalmente, la suspensión celular se dispensó en placas de Petri de 10 cm de diámetro conteniendo 10 ml de medio RPMI suplementado con 10% SBF, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 0.25 µg/ml anfotericina B y con 20 ng/ml del factor de diferenciación recombinante GM-CSF (Peprotech). Esto fue realizado de manera que en cada placa se cultivaran 3×10^6 células (excluyendo eritrocitos). Tres días más tarde se agregaron 10 ml de RPMI suplementado a cada placa, y en el sexto y octavo día de cultivo se recambiaron 10 ml, teniendo precaución de no tomar las células no adherentes. La cosecha del cultivo se realizó al décimo día; se recolectaron las células no adherentes, las cuales fueron contadas en la cámara de Neubauer y se cultivaron en medio RPMI suplementado conteniendo 5 ng/ml de GM-CSF en placas de 48 pozos, a una densidad de 1×10^6 células/pozo. Para tener en cuenta en el conteo únicamente las células viables, se utilizó el colorante vital Azul de Tripán.

2.4 Métodos aplicados al estudio de la respuesta celular

2.4.1 Ensayo para la determinación de la actividad arginasa

La medida de la actividad arginasa fue realizada según el método descrito por Corraliza et al ¹⁰⁸ que se basa en la determinación colorimétrica de la urea formada a partir del sustrato L-arginina. Brevemente, a los lisados celulares se les agregó un volumen equivalente de tampón Tris 50 mM, pH 7.5 conteniendo MnCl₂ 5 mM; se tomaron 50 µl de esta solución y se incubaron por 15 minutos a 55°C para activar la enzima. A continuación se le adicionaron 50 µl de L-arginina 0.5 M pH 9.7 y esta mezcla fue mantenida a 37°C durante una hora. La reacción fue detenida mediante el agregado de 400 µl de una mezcla de ácidos (H₂SO₄:H₃PO₄:H₂O en relación 1:3:7 (v/v/v)). Por último a cada muestra se le agregó 28 µl de ISPF 9% en etanol absoluto y se calentó a 85°C por 45 minutos, y luego a 100°C durante 15 minutos. En este paso en paralelo se incubaron 100 µL de concentraciones conocidas de urea en el rango de 0.4 a 0.00625 mg/ml a las cuales también se les agregó la mezcla de ácidos y el ISPF. Se midió la absorbancia a 560 nm y se construyó una curva de calibración absorbancia versus concentración de urea, la cual mostró linealidad en el rango de 0.05 a 0.2 mg/ml de urea. A partir de la curva se estimaron las concentraciones de urea presentes en las muestras y se calcularon las unidades de actividad. Las unidades de actividad enzimática (U) se definieron como los µmoles de producto formados por minuto. La actividad se normalizó por la concentración de proteína, la cual fue determinada por el método de Bradford ¹⁰⁹.

2.4.2 Análisis de la presencia de Arg-1 por Inmunoblot

2.4.2.1 SDS-PAGE

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida al 10% se realizó bajo condiciones reductoras (6 mg/ml DTT), según la técnica descrita por Laemmli et al ¹¹⁰ utilizando el sistema Mini Protean 3 (Bio Rad). A partir de la medida de la concentración proteica como referencia, se sembraron en geles de 1.5 cm de espesor 40 µg en proteína de los lisados celulares previamente diluidos y calentados por 3 minutos en tampón de siembra 2X (Tris-HCl 0.2M, urea 8M, SDS 0.2% (m/v), pH 8, conteniendo azul de bromofenol). En paralelo se sembró un marcador de peso molecular preteñido de rango entre 27 y 180 kDa. Se utilizó Tris-HCl 1 M pH 6.8 como tampón del gel de concentración y Tris-HCl 0.75 M pH 8.8 como tampón del gel de separación. La electroforesis se realizó a 80 V en el gel concentrador y a 120 V en el gel separador, utilizando el tampón Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, 0.1% SDS (p/v) pH 8.3.

2.4.2.2 Transferencia a membranas de Inmunoblotting

Luego de finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore), previamente activada con metanol, utilizando un equipo de transferencia húmeda (Bio-Rad); se utilizó la solución tampón Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%(v/v) y la transferencia se realizó a 300 mA y 4°C por 2 horas.

2.4.2.3 Inmunoblotting

Para la detección de la Arg-1 en las muestras obtenidas en los experimentos *in vitro* e *in vivo* descritos en las secciones 2.5.1 y 2.6.1, en primer lugar se bloqueó la membrana por incubación con PBS conteniendo Tween 20 0.1% (v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la misma fue incubada toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Arg-1 de ratón, purificado por afinidad (Sigma, diluido 1:1000 en PBS-Tween 20 0.05% (v/v)), seguido de 3 lavados de 15 minutos cada uno con PBS-Tween 20 0.05% (v/v) a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizaron inmunoglobulinas de cabra purificadas por afinidad anti-inmunoglobulinas G de conejo conjugadas a peroxidasa (Calbiochem, diluido 1:5000 en PBS-Tween 20 0.05% (v/v)), con el cual se incubó la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se realizaron 5 lavados de 5 minutos con

PBS-Tween 20 0.05% (v/v) a temperatura ambiente y se llevó a cabo el revelado utilizando un sustrato quimioluminiscente (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad). Como control de carga se utilizó la GAPDH, la cual fue detectada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GAPDH producido en ratón (Sigma, diluido 1:1000 en PBS-Tween 20 0.05% (v/v)).

2.4.3 Análisis de la expresión de marcadores fenotípicos por PCR en tiempo real

2.4.3.1 Extracción de ARN

El ARN total fue extraído utilizando TRIzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Durante todo el procedimiento, se utilizó material libre de nucleasas. Para los experimentos *in vitro*, 1×10^6 células fueron homogeneizadas por pipeteo en 400 μ l de TRIzol, mientras que en los ensayos *in vivo*, el pellet de células obtenido del lavado de la cavidad peritoneal fue lisado en 1 ml de este reactivo. Los homogeneizados se conservaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Para la extracción de ARN, luego del descongelado, se le agregó a cada muestra un quinto del volumen inicial de cloroformo, se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Luego se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C y la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo. Los ácidos nucleicos fueron precipitados mediante el agregado de un medio del volumen inicial de isopropanol. Luego de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C . El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con un volumen de etanol 75%. Luego se centrifugó nuevamente a 7500 g durante 5 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 10 minutos. Finalmente, el mismo se resuspendió en agua libre de nucleasas y se incubó durante 10 minutos a 55°C para contribuir a la solubilización del ARN. La concentración y calidad del ARN obtenido fue verificado utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo).

2.4.3.2 Obtención de ADN copia

La transcripción reversa se llevó a cabo a partir de 1 μ g de ARN. Previo a la retrotranscripción, se realizó un tratamiento con DNasa I (Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente para eliminar el ADN genómico contaminante. La enzima fue inactivada mediante la adición de EDTA y una incubación a

65°C por 10 minutos. Luego se procedió a la generación del ADN copia utilizando hexámeros como cebadores y la transcriptasa reversa M-MLV (del inglés, *Moloney Murine Leukemia Virus*; Invitrogen). El programa utilizado consistió en 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C.

2.4.3.3 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Para realizar el análisis de expresión de los genes de interés en BMDM, la PCR en tiempo real se realizó en un volumen de reacción de 10 µl, conteniendo 5 µl de *SYBR Green Quantitect* (Qiagen), 0.9 µl de los cebadores sentido y antisentido, 1.2 µl de agua ultrapura y 2 µl de ADN copia. Las reacciones se llevaron a cabo en placas ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystems) usando el sistema ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados para los genes *Arg1*, *Mrc1*, *Chi3l3* y *Retnla* fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems) y su secuencia se detalla en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Lista de los cebadores diseñados para el estudio del fenotipo de los BMDM por PCR en tiempo real, utilizando el método del SYBR green.

Nombre del gen	Sentido	Antisentido
β -Actina (<i>Actb</i>)	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG
Arg-1 (<i>Arg1</i>)	CGATTCACCTGAGCTTTGATGTC	GTCCTGAAAGGAGCCCTGTCT
RELM α (<i>Retnla</i>)	CGTGGAGAATAAGGTCAAGGAACT	CACTAGTGCAAGAGAGAGTCTTCGTT
Ym1 (<i>Chi3l3</i>)	CATTGGAGGATGGAAGTTTGGA	GAATATCTGACGGTTCTGAGGAGTAGA
MR (<i>Mrc1</i>)	GCATGGGTTTTACTGCTACTTGATT	CAGGAATGCTTGTTTCATATCTGTCTT

En cuanto al análisis de expresión realizado en BMDC, este estudio se llevó a cabo utilizando el sistema TaqMan, en un volumen de reacción de 20 μ l, conteniendo 10 μ l de *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems), 1 μ l de la mezcla de cebadores incluyendo la sonda TaqMan (Applied Biosystems), 7 μ l de agua ultrapura y 2 μ l de ADN copia. Las reacciones se llevaron a cabo en placas ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystems) usando el sistema One Step Plus (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados fueron obtenidos comercialmente de Applied Biosystems.

Para la cuantificación, se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ¹¹¹, tomando el gen de la β -actina como gen calibrador y el cambio en la expresión en los niveles de ARNm se reportó relativo a los niveles observados en las muestras control.

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

Se determinó la presencia de varias moléculas en las BMDC tomando ventaja del uso de anticuerpos específicos, los cuales se detallan en la tabla 2.2. Luego de la incubación con los estímulos, se procedió al despegado de las células por pipeteo. Todo el protocolo de marcado se realizó en hielo. Se pasaron 0.5×10^6 células de cada pozo a una placa de 96 pozos de fondo en V, las cuales se centrifugaron a 350 g durante 3 minutos y se incubaron durante 20 minutos en 25 μ l de una solución tampón de PBS conteniendo 0,1% BSA, 2 mM EDTA y 10% suero normal de rata. Luego se adicionaron a cada pocillo 25 μ l de la mezcla correspondiente de anticuerpos conjugados a fluorocromos y se incubó por 30 minutos. Se realizaron en paralelo marcados con los controles isotípicos de cada anticuerpo y marcados simples con cada anticuerpo utilizado para poder realizar la compensación. Luego se lavaron las células con el tampón PBS-BSA-EDTA 2 veces y se resuspendieron en 100 μ l de este tampón para luego analizarlas en el citómetro de flujo (FACSCantoll, BD Biosciences). Se adquirieron como mínimo 10.000 eventos de cada muestra. El análisis posterior se realizó utilizando el software FlowJo v7.6 (TreeStar). Se realizó un gate en las células CD11c⁺ y se estudió la expresión de las distintas moléculas evaluadas sobre esta población. Los resultados se reportaron como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia.

2.4.5 Cuantificación de citoquinas por ELISA

La concentración de citoquinas acumuladas en el sobrenadante de BMDC cultivadas en diferentes condiciones se analizó utilizando reactivos comerciales BD OptEIA (BD Biosciences). Para realizar estos ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos con alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc). Para la cuantificación de las citoquinas IL-10, IL-12/23p40 e IFN γ se utilizaron los kits comerciales BD OptEIA (BD Biosciences) y se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Para el revelado se utilizó un sustrato de revelado comercial (*BD OptEIA TMB substrate reagent set*, BD Biosciences) y la reacción se detuvo con H $_2$ SO $_4$ 1M. Luego se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

2.4.6 Determinación de nitrito por el método de Griess

Con el motivo de evaluar la producción de óxido nítrico por las BMDC, se determinaron los niveles de nitrito acumulados en los sobrenadantes de cultivo mediante el método de Griess, el cual se basa en la reacción de diazotización de Griess, que utiliza sulfanilamida y N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato (NED) bajo condiciones ácidas. Brevemente, esto consistió en agregar 50 μ l de cada muestra en un pozo de una placa de microtitulación seguidos de 50 μ l de sulfanilamida 1% en 5% de ácido fosfórico. Luego la placa se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos en oscuridad y se le agregó a cada pozo 50 μ l de NED 1%. Luego de 5-10 minutos de incubación en oscuridad se procedió a determinar la absorbancia a 560 nm utilizando un lector de placas. En paralelo a la lectura de las muestras problema, se realizó una curva estándar a partir de diluciones de una solución de nitrito de sodio de concentración conocida en el rango de 0 a 100 μ M.

Tabla 2.2. Lista de los anticuerpos utilizados para la caracterización celular de las BMDC por citometría de flujo.

Molécula que reconoce el anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Nombre de la clona	Isotipo	Compañía
CD4	APC-Cy7	GK1.5	IgG $_{2b}$, κ Rata	BD
CD11c	PE-Cy7	N418	IgG Hamster	eBioscience
CD40	FITC	3/23	IgG $_{2a}$, κ Rata	BD
CD80	PE	16-10A1	IgG Hamster	eBioscience
CD86	PE	GL1	IgG $_{2a}$, κ Rata	BD
CCR7	PE	4B12	IgG $_{2a}$, κ Rata	Biolegend
MHC II	PerCP/APC	M5/114.15.2	IgG $_{2b}$, κ Rata	Biolegend
PD-L1	PE	MIH5	IgG $_{2a}$, λ Rata	eBioscience
PD-L2	FITC	122	IgG $_{2a}$, κ Rata	eBioscience

2.4.7 Métodos para la determinación de la viabilidad celular

Se utilizaron distintos métodos para evaluar la viabilidad celular dependiendo del ensayo. Para el caso de las BMDC condicionadas con NO₂CLA o RGZ, se procedió a contar las células cosechadas en cámara de Neubauer utilizando el colorante vital Azul de Tripán para constatar que los tratamientos no causaran un descenso en el número de células viables. Por otro lado, en los ensayos de BMDC descritos en 2.5.2 también se analizó el porcentaje de células viables por citometría de flujo utilizando el reactivo comercial LIVE/DEAD (Invitrogen), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Con el motivo de analizar el porcentaje de células apoptóticas en los cultivos de BMDC, también se realizó una tinción con ioduro de propidio (Sigma) y Anexina V conjugada a FITC (eBioscience). Básicamente, se utilizaron 0.3 x 10⁶ células por condición, las cuales fueron lavadas 2 veces con PBS frío y luego resuspendidas en 100 µl del tampón de *binding* (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM, pH 7.4). Luego se les agregó 5 µl de Anexina V conjugada a FITC (eBioscience) y se las incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Finalizado el paso de incubación, las células fueron lavadas 2 veces con el tampón de *binding*, y resuspendidas también en 200 µl del mismo. El análisis por el citómetro se realizó inmediatamente después, y previo al mismo, se le adicionó a cada muestra 5 µl de una solución 10 µg/ml de Ioduro de Propidio (PI, Sigma) para determinar el porcentaje de muerte en cada condición. A modo de control positivo, se incubaron BMDC durante 10 minutos a 60 °C para inducir su muerte y poder así verificar que la tinción funcionara correctamente. Las células apoptóticas se definieron como Anexina V⁺, PI⁻.

2.5 Ensayos *in vitro*

2.5.1 Estudios para evaluar el efecto de los NO₂-FA sobre la activación alternativa de macrófagos

Con el fin de llevar a cabo estos estudios, se dispusieron los BMDM en placas de 24 pozos en un volumen final de 1 ml (0.5 x 10⁶ células/pozo) y se agregó el OANO₂ en un rango de concentraciones de 0.1 a 2 µM, en ausencia o presencia de IL-4 (BD Biosciences, concentración final 0.5 ng/ml). En paralelo se incubaron el vehículo del OANO₂ (DMSO) y el ácido oleico (OA, 2 µM) como controles negativos y la RGZ (0.1 a 2 µM) para visualizar el efecto de un ligando de PPAR_γ conocido. Para los estudios de expresión por PCR en tiempo real, los tiempos de incubación fueron de 2 (*Arg1*) y 4 horas (*Chi3l3*, *Mrc1*,

Retnla), luego de los cuales se retiró el sobrenadante y se recolectaron las células para la extracción de ARN total. En el caso de la medida de actividad y el análisis por inmunoblot, el tiempo de incubación fue de 24 horas. Luego de transcurrido este tiempo, las células fueron lisadas con Tritón X-100 0.1% (v/v) conteniendo un cóctel de inhibidores obtenido comercialmente (Sigma)

2.5.2 Estudios para evaluar el efecto de los NO₂-FA sobre el fenotipo de DC

Para llevar a cabo estos estudios, se utilizaron dos diseños experimentales diferentes. En primer lugar, se analizó la capacidad de los NO₂-FA de inhibir la activación de las DC cuando estos son adicionados al mismo tiempo que un estímulo pro-inflamatorio. En segundo lugar, las BMDC fueron condicionadas durante su diferenciación con los NO₂-FA y posteriormente fueron sometidas a un estímulo pro-inflamatorio en ausencia de los mismos. A continuación se explican en mayor detalle ambas estrategias utilizadas.

2.5.2.1 Estudios del efecto de la administración de NO₂-FA en forma concomitante a la inducción de la maduración de las BMDC

Este análisis consistió en disponer las BMDC ya diferenciadas (día 10 del cultivo) en placas de 48 pozos, a una densidad de 1x10⁶ células por pozo, y agregar NO₂CLA en un rango de concentraciones de 1 a 10 µM junto con lipopolisacárido bacteriano, un agonista de TLR4 (LPS *E.coli*, cepa 0127:B8, Sigma, concentración final 100 ng/ml) en un volumen total de 0.5 ml. El tiempo de estimulación fue de 18 horas; pasado el mismo se retiró parte del sobrenadante para analizar la producción de citoquinas (IL-10 e IL-12/23p40) por ELISA y se cosecharon las células para estudiar su expresión de la molécula coestimuladora CD86 y su viabilidad por citometría de flujo.

2.5.2.2 Estudios del efecto de la administración de NO₂-FA durante la diferenciación de las BMDC

Con el objetivo de estudiar su efecto sobre la diferenciación y activación de las DC, el NO₂CLA, el CLA, o el DMSO fueron agregados a una concentración de 5 µM desde el primer día del cultivo y se recambiaron junto con el medio de cultivo. Para descartar efectos del vehículo, también se trataron células con un volumen equivalente DMSO durante su diferenciación. Las BMDC previamente condicionadas según se describió previamente fueron dispuestas en placas de 48 pozos (1 x 10⁶

células/pozo) y estimuladas con los ligandos de TLR LPS (concentración final 100 ng/ml), Poly (I:C) (Invivogen, 10 µg/ml) y Pam3CSK4 (Invivogen, 1 µg/ml) en un volumen total de 0.5 ml. El tiempo de estimulación fue de 18 horas; pasado el mismo se retiró parte del sobrenadante para analizar concentración de citoquinas (IL-10 e IL-12/23p40) por ELISA y determinar la acumulación de nitrito por el método de Griess. Las células fueron cosechadas para realizar estudios de la expresión de CCR7, CD11c, CD40, CD80, CD86, MHC II, PD-L1, PD-L2 por citometría de flujo. También se verificó por citometría el porcentaje de células necróticas y apoptóticas presentes utilizando las técnicas descriptas en 2.4.7.

2.5.3 Estudio de la capacidad de las BMDC condicionadas con NO₂-FA de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes

2.5.3.1 Purificación de linfocitos T CD4⁺ a partir de ratones OTII

Con el objetivo de realizar ensayos de co-cultivo de BMDC con linfocitos T, los últimos fueron purificados a partir de bazo y ganglios (poplíteos, inguinales, mesentéricos, lumbares, caudales) utilizando un reactivo comercial de purificación (*Dynabeads® Untouched™ Mouse CD4 Cells Kit*, Invitrogen) que se basa en la utilización de perlas magnéticas covalentemente unidas a un anticuerpo policlonal anti IgG de rata, junto con una mezcla de anticuerpos IgG monoclonales diseñada para reconocer marcadores presentes en todas las células exceptuando los linfocitos T CD4⁺. Brevemente, esto consistió en romper mecánicamente los ganglios y bazo por separado y hacer pasar la suspensión celular resultante a través de una malla de serigrafía. Luego las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y en el caso del bazo, se lisaron los glóbulos rojos presentes utilizando un tampón de lisis comercial (Sigma). Los leucocitos obtenidos fueron incubados con la mezcla de anticuerpos proporcionada en el reactivo de purificación siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego se le agregaron las perlas magnéticas y se procedió a realizar la purificación utilizando un imán (Invitrogen). Cabe destacar que esta forma de purificación asegura que las únicas células que no permanecen unidas al imán son los linfocitos T CD4⁺. Luego de la purificación y previo al co-cultivo, estos fueron marcados con la sonda fluorescente CFDA-SE (5µM, Invitrogen) para luego poder monitorear su proliferación.

2.5.3.2 Co-cultivo de BMDC con linfocitos OTII

Para realizar estos ensayos, se incubaron BMDC preparadas según lo descrito en 2.5.2.2 (40×10^3 células/pozo) con OVA péptido (OVA 323-339, GenScript, 0.1 $\mu\text{g/ml}$) en placas de 96 pocillos con fondo en U durante 30 minutos y luego se le adicionaron al cultivo linfocitos T CD4⁺ provenientes de ratones OTII (200×10^3 células/pozo), con los cuales se co-cultivaron durante 3 días. Pasados los 3 días de cultivo, se retiró parte del sobrenadante para determinar la producción de IFN γ por ELISA. Por otro lado, las células se analizaron por citometría de flujo para medir su proliferación siguiendo la pérdida de fluorescencia proveniente del CFSE, habiendo sido las mismas marcadas previamente con los anticuerpos anti-CD11c y anti-CD4 conjugados a fluorocromos para poder definir las poblaciones presentes. La viabilidad celular fue verificada mediante el agregado de la sonda fluorescente TO-PRO® 3 (Invitrogen) previo al análisis por citometría, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

2.5.4 Estudio de la contribución de los receptores Nrf2 y PPAR γ al fenotipo observado.

Esta sección del trabajo se realizó en el marco de una pasantía en el Departamento de Farmacología y Química Biológica de la Universidad de Pittsburgh, Estados Unidos, en colaboración con el Dr. Bruce Freeman y el Dr. Francisco Schopfer.

2.5.4.1 Nrf2

Con el objetivo de estudiar la participación del factor Nrf2 en el fenotipo observado tras el condicionamiento con NO₂CLA, se prepararon BMDC siguiendo el protocolo descrito en 2.3.3 a partir de ratones deficientes en este factor (Nrf2^{-/-}) generosamente donados por el Dr Thomas Kensler (Departamento de Farmacología y Química Biológica de la Universidad de Pittsburgh, Estados Unidos). Las BMDC condicionadas se obtuvieron y procesaron de la manera detallada en el punto 2.5.2.2. Luego de 18 horas de estimulación, se determinó la expresión de los marcadores CD11c, CD40, CD80, CD86, MHC II, PD-L2 por citometría de flujo y la producción de IL-10 e IL-12/23p40 por ELISA.

2.5.4.2 PPAR γ

Con el fin de estudiar la contribución del receptor PPAR γ al fenotipo inducido por NO₂CLA, en primer lugar se trabajó con el agonista de PPAR γ , RGZ. Esto consistió en diferenciar BMDC en presencia de 5 μ M de RGZ de acuerdo al protocolo descrito en 2.5.2.2 para el NO₂CLA. En paralelo, se diferenciaron BMDC en presencia de volúmenes equivalentes de DMSO para descartar posibles efectos del vehículo. Las BMDC condicionadas se procesaron de la manera detallada en el punto 2.5.2.2. Luego de 18 horas de estimulación, se determinó la expresión de CD11c, CD40, CD80, CD86, MHC II, PD-L1, PD-L2 por citometría de flujo y la producción de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante por ELISA.

Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos con el inhibidor irreversible de PPAR γ GW9662 (5 μ M, Cayman Chemical), condicionando las BMDC con NO₂CLA en presencia o ausencia del inhibidor según lo descrito previamente. Luego de 18 horas de estimulación, se determinó la expresión de CD11c, CD40, CD80, CD86, MHC II, PD-L2 por citometría de flujo y la producción de IL-10 e IL-12/23p40 en el sobrenadante por ELISA.

2.6 Ensayos *in vivo*

2.6.1 Estudios para evaluar el efecto de los NO₂-FA sobre la activación alternativa de macrófagos

Se utilizaron ratones hembra de 10-12 semanas de la cepa BALB/c, a los cuales se les administró vía intraperitoneal 20 ng de IL-4 junto con 0.035 μ moles de OANO₂, OA o RGZ en 100 μ l de alúmina (13 mg/ml, Pierce). Pasadas las 8 horas de administración, se sacrificaron los ratones por exceso de anestesia inhalatoria y se recuperaron las células presentes en la cavidad peritoneal realizando 2 lavados de 3 ml de PBS 0.1% BSA, 2mM EDTA. Con el fin de verificar que el porcentaje de macrófagos en los lavados peritoneales de los animales inyectados con las diferentes preparaciones fueran similares se tomaron 0.5 x 10⁶ células de cada muestra para analizar por citometría de flujo, utilizando F4/80 como marcador (anti-F4/80-PE, Cederlane). Luego, la suspensión celular fue centrifugada a 350 g y 4°C por 5 minutos y el pellet fue lisado con 1 ml de TRIzol para su posterior procesamiento.

2.7 Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0. Para determinar la significancia estadística de los resultados, se realizó el test estadístico de ANOVA con el post test de Tukey. Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas comparaciones cuyo valor p fue menor a 0.05. En todos los experimentos las muestras se analizaron por triplicado y cada experimento se realizó al menos 3 veces en forma independiente.

3 Resultados

2.1. Estudio de la capacidad de los NO₂-FA de modular la activación alternativa de macrófagos

Hasta el momento de iniciar este trabajo de tesis, la capacidad de los NO₂-FA de modular la diferenciación de macrófagos había sido estudiada a nivel de los efectos globales sobre la síntesis de algunas citoquinas y enzimas características de los fenotipos inflamatorios (inducidos por TLR en ausencia o presencia e IFN γ) y su asociación con algunas vías de señalización^{90,93}. Sin embargo, no se conocía su potencial para sesgar la diferenciación de macrófagos al fenotipo alternativo, el cual es sin duda un fuerte componente regulador de las respuestas Th2. Durante mi trabajo de tesina de Licenciatura en Bioquímica¹⁰⁰ observamos que el OANO₂ fue capaz de potenciar la respuesta de Arg-1 en BMDM estimulados con IL-4 por un mecanismo que involucra la activación del receptor PPAR γ . Este antecedente condujo a profundizar en el estudio de los NO₂-FA como posibles potenciadores del fenotipo alternativo de macrófagos inducido por IL-4. Dado que ya contábamos con evidencias de la modulación por OANO₂ de la síntesis de la Arg-1 en BMDM, gracias a estudios de actividad enzimática y Western Blot (Figura 3.1a y b, respectivamente), se realizaron estudios similares sobre la expresión del gen de Arg-1 para complementar la información obtenida. Este análisis mostró que el OANO₂, pero no el OA fue capaz de potenciar la expresión de ARNm de Arg-1 en presencia de IL-4 (ver Figura 3.1c). Este resultado apoya los datos obtenidos hasta el momento, indicando que esta actividad potenciadora es mediada solamente por el producto de la nitración del ácido graso, OANO₂, y que su efecto ocurre a nivel transcripcional. Con el fin de profundizar en el fenotipo que los NO₂-FA podrían inducir en macrófagos en el marco de una respuesta inflamatoria de tipo 2, se estudió el perfil de expresión de otros genes característicos de la activación alternativa, como son el receptor de manosa (MR) y las proteínas RELM α y Ym1, en BMDM estimulados con IL-4. En contraste a los resultados obtenidos para el

gen *Arg1*, no se observó ningún efecto del OANO₂ sobre la expresión de estos genes en presencia de IL-4 en las condiciones experimentales utilizadas, detalladas en 2.5.1 (datos no mostrados). Sin embargo, es necesario precisar que la inducción por IL-4 de estos marcadores fue muy pobre en las condiciones ensayadas, presentando niveles de expresión muy cercanos al umbral de detección o incluso indetectables en algunos casos, por lo cual no es posible concluir si el OANO₂ es capaz de potenciar la expresión de estos genes utilizando este diseño experimental.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, se procedió a estudiar si lo observado en estos experimentos, en especial la potenciación de la expresión de Arg-1 mediada por OANO₂ en presencia de IL-4, se reproducía en condiciones *in vivo*. Para esto, se administró el OANO₂ vía intraperitoneal junto con IL-4, utilizando alúmina como adyuvante. La razón por la cual se decidió agregar alúmina a la preparación es que estudios previos han demostrado que la administración de IL-4 en forma de complejo previene su rápida degradación¹¹². En este trabajo formaron complejos de IL-4 con anticuerpos anti-IL-4, pero dado que no disponíamos de este reactivo planteamos como alternativa la utilización de alúmina, dado que se conoce que este gel actúa como un adyuvante adsorbiendo proteínas y protegiéndolas de la degradación. Además, la alúmina es un adyuvante que ha sido asociado con respuesta de tipo Th2 (revisado por ¹¹³), por lo cual se consideró que la inflamación que podría inducir contribuiría a la generación y presencia de IL-4 en el sitio de inoculación. A las 8 horas de inoculación se midió en las células reclutadas al sitio de inyección la expresión de genes de activación alternativa, con principal interés en la Arg-1. En paralelo se realizó el mismo estudio con el agonista de PPAR γ RGZ para determinar si se observaban efectos similares, dada nuestra comprobación de que este agonista reproducía *in vitro* los efectos del OANO₂. Para estar seguros que las eventuales diferencias encontradas se deben a cambios en el nivel de expresión génica, se verificó que el porcentaje de macrófagos en los lavados peritoneales de los animales inyectados con las diferentes preparaciones fueran similares (ver figura 3.2f). Como se puede observar en la figura 3.2, los resultados obtenidos en este modelo reproducen lo descrito anteriormente para los ensayos *in vitro*; se observa una significativa potenciación de la respuesta de Arg-1 inducida por la IL-4 tanto con el OANO₂ como con la RGZ; los efectos se registraron tanto a nivel del ARNm (figura 3.2a) como de la proteína sintetizada (figura 3.2b). Interesantemente, en este caso se observó un efecto similar sobre la expresión de los genes asociados al fenotipo alternativo correspondientes a MR (figura 3.2c) y Ym1 (figura 3.2d) pero no así del correspondiente a RELM α (figura 3.2e). Este marcador se comportó de manera diferencial con respecto a los otros analizados, ya que no se observó un aumento en su expresión tras el tratamiento

con IL-4, sino un descenso. Estos resultados sugieren que el OANO₂ sería capaz de potenciar la inducción mediada por IL-4, no solo de Arg-1, sino también de MR y Ym1 en macrófagos, durante un proceso inflamatorio de tipo 2 *in vivo*.

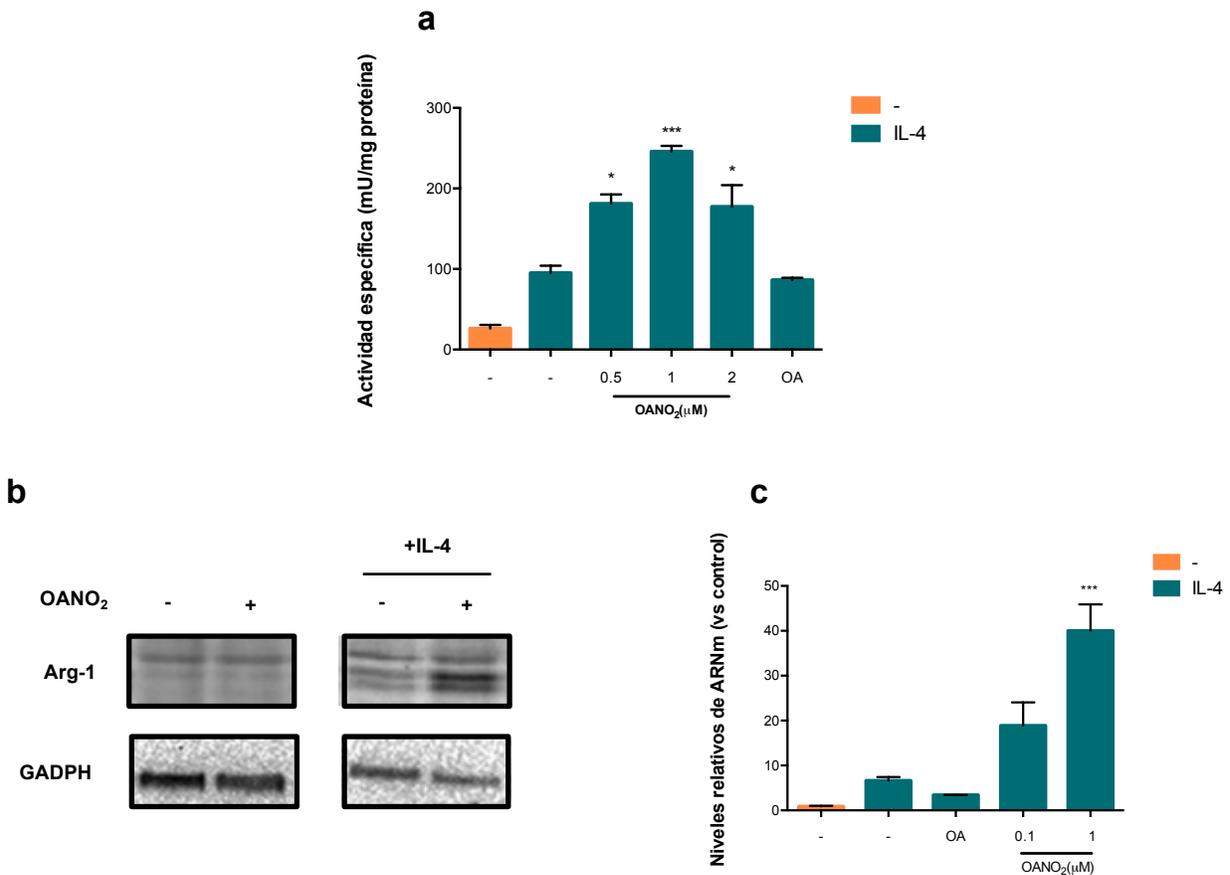


Figura 3.1. El OANO₂ es capaz de potenciar la inducción de Arg-1 mediada por IL-4 en macrófagos murinos. Se estimularon BMDM (0.5×10^6 células) con IL-4 (0.5 ng/ml) en presencia o ausencia de OANO₂, OA o el vehículo (representado como -) como controles. A las 24hs de cultivo se determinó en los lisados celulares: **(a)** la actividad arginasa (normalizada por la concentración de proteína), que se expresa como la media \pm desvío estándar de 3 experimentos independientes, y **(b)** la presencia de Arg-1 por Western Blot. (la Arg-1 corresponde a la doble banda). Además en experimentos en iguales condiciones se analizó tras 2 horas de estimulación los niveles de ARNm de Arg-1 por RT-PCR cuantitativa. El nivel de expresión se normalizó contra el gen de actina de expresión constitutiva. Los resultados se muestran en **(c)** y corresponden al incremento en los niveles de Arg-1 relativo a las células tratadas con el vehículo (-). Los resultados se encuentran expresados como la media \pm el desvío estándar y corresponden a 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la estimulación con IL-4 más el vehículo (-) (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, según el test de ANOVA, post-test de Tukey).

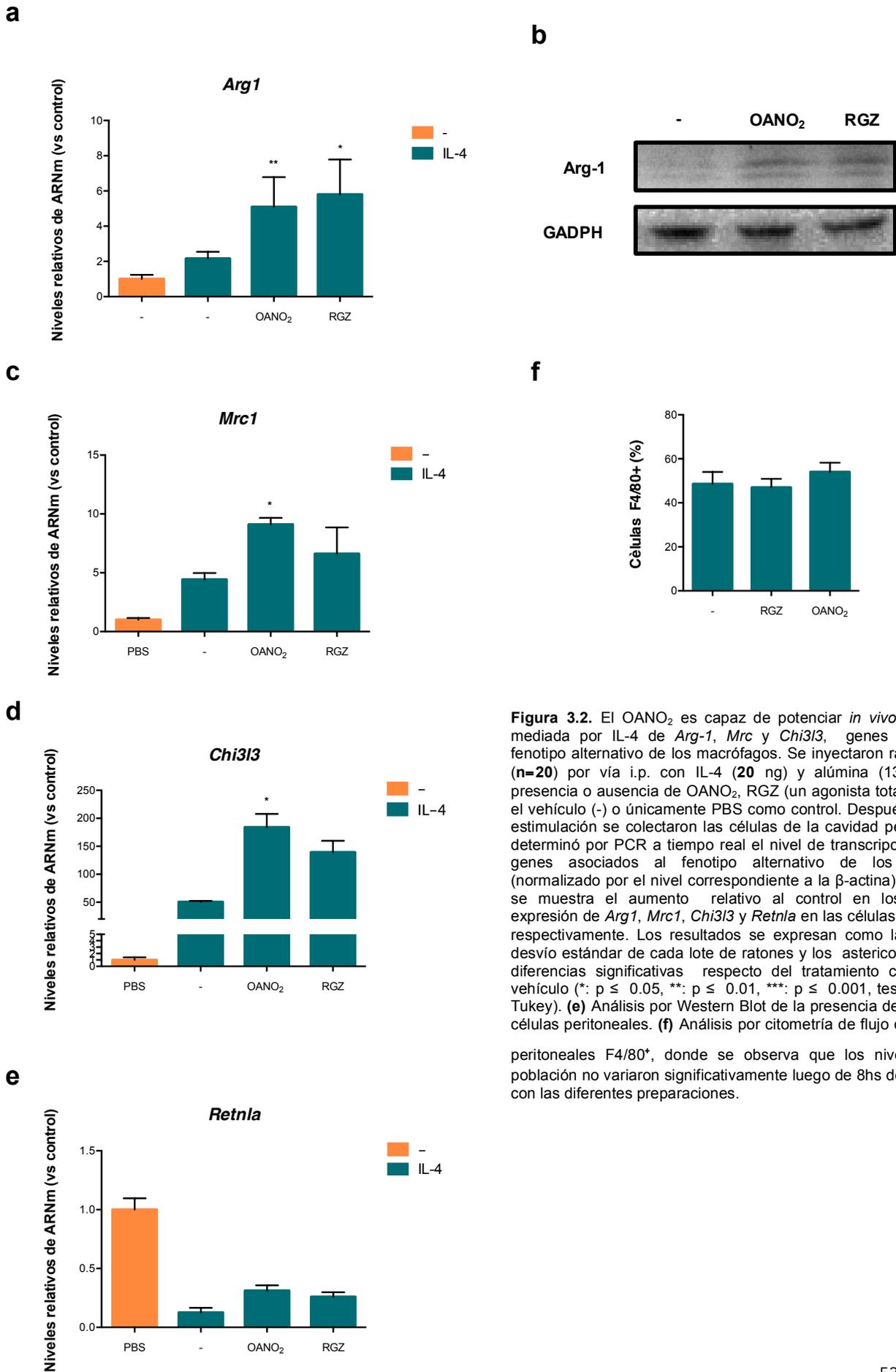


Figura 3.2. El OANO₂ es capaz de potenciar *in vivo* la inducción mediada por IL-4 de *Arg-1*, *Mrc* y *Chi313*, genes asociados al fenotipo alternativo de los macrófagos. Se inyectaron ratones Balb/c (n=20) por vía i.p. con IL-4 (20 ng) y alúmina (13 mg/ml), en presencia o ausencia de OANO₂, RGZ (un agonista total de PPAR_γ), el vehículo (-) o únicamente PBS como control. Después de 8 hs de estimulación se colectaron las células de la cavidad peritoneal y se determinó por PCR a tiempo real el nivel de transcripción de varios genes asociados al fenotipo alternativo de los macrófagos (normalizado por el nivel correspondiente a la β-actina). De (a) a (d) se muestra el aumento relativo al control en los niveles de expresión de *Arg1*, *Mrc1*, *Chi313* y *Retnla* en las células peritoneales, respectivamente. Los resultados se expresan como la media ± el desvío estándar de cada lote de ratones y los asteriscos indican las diferencias significativas respecto del tratamiento con IL-4 y el vehículo (*: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01, ***: p ≤ 0.001, test de ANOVA-Tukey). (e) Análisis por Western Blot de la presencia de Arg-1 en las células peritoneales. (f) Análisis por citometría de flujo de las células peritoneales F4/80⁺, donde se observa que los niveles de esta población no variaron significativamente luego de 8hs del tratamiento con las diferentes preparaciones.

3.2 Estudio de la capacidad de los NO₂-FA de modular la activación de las BMDC

3.2.1 Comparación de la administración del NO₂-FA durante la diferenciación versus durante la activación por estímulos pro-inflamatorios en BMDC

Como se mencionó anteriormente, las DC constituyen el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa, jugando un rol crucial en el disparo y las propiedades de esta última, ya que las señales de peligro que reconocen en los tejidos son indispensables para instruir a la DC sobre el tipo de infección que se está desarrollando y de esta manera contribuir a sesgar la activación y diferenciación de los linfocitos T hacia una respuesta adaptativa adecuada. Debido a su importancia en este proceso, y considerando los antecedentes detallados en la introducción de esta tesis acerca de las múltiples interacciones entre los NO₂-FA y vías de señalización involucradas en la activación de las DC, se procedió a estudiar el efecto de estos mediadores lipídicos sobre algunas propiedades de las DC centrándonos sobre todo en aquellas relacionadas con su capacidad inmunoestimuladora.

Teniendo en cuenta reportes previos que indicaban que el NO₂-FA con mayor relevancia biológica sería el NO₂CLA^{81,82}, se seleccionó este NO₂-FA para realizar este estudio. Uno de los aspectos a considerar fue en qué etapa de la diferenciación de las DC introducir el NO₂-FA, ya que al menos podrían estar presente en dos situaciones: antes de la diferenciación de la célula inmadura que reside en tejidos, o durante el proceso de maduración inducido por estímulos pro-inflamatorios. Los antecedentes expuestos en la introducción nos llevaron a plantearnos estrategias experimentales que contemplaran estas dos posibilidades ya que existen antecedentes que sugieren que la presencia de ligandos de PPAR γ durante el proceso de diferenciación de precursores mieloides a DC inmadura conduce a la generación de un fenotipo de carácter inmunorregulador en las DC, con una capacidad reducida de inducir respuestas T efectoras o incluso con la capacidad de promover respuestas T reguladoras. Por otro lado, en células mieloides como monocitos y macrófagos están reportados efectos moduladores de los NO₂-FA cuando estos son administrados conjuntamente con estímulos pro-inflamatorios. Así, nos planteamos explorar en primer lugar ambas posibilidades buscando determinar si en alguna de estas condiciones se observaban efectos, y de ser así en cuál condición el efecto era más robusto. Para ello utilizamos como modelo celular a las BMDC, es decir células dendríticas diferenciadas a partir de precursores de médula ósea utilizando el factor de diferenciación GM-CSF, las cuales, como ya se

mencionó, constituyen un modelo aceptado para estudiar la biología de las DC inflamatorias⁴³. Por otro lado, para evaluar en forma preliminar el potencial del NO₂CLA de afectar las propiedades de las BMDC, en los dos formatos experimentales diseñados, monitoreamos la expresión del marcador CD86, una de las principales moléculas coestimuladoras expresadas por DCs maduras y activadas (en relación a su capacidad inmunoestimuladora de linfocitos T).

En primer lugar, se evaluó el potencial del NO₂CLA de modular la activación de las BMDC al ser administrado en forma concomitante con el LPS, un estímulo que induce su maduración y activación. También se incluyeron en este experimento incubaciones de las BMDC con el NO₂-FA en ausencia de LPS, de forma de visualizar si el NO₂CLA por sí mismo alteraba la expresión del marcador CD86, es decir si este NO₂-FA modificaba los niveles de activación basal de las BMDC. Utilizando este diseño experimental, se observó que el tratamiento con un rango de concentraciones entre 1 a 10 µM de NO₂CLA en forma concomitante con LPS no alteró en forma significativa la expresión de la molécula coestimuladora CD86 (figura 3.3b), si bien se observó una leve tendencia hacia niveles menores de expresión en las células tratadas. Asimismo, la presencia del NO₂CLA no condujo *per se* a cambios en la expresión de CD86 (figura 3.3a), indicando que bajo este diseño experimental, el NO₂CLA no es capaz de inhibir la activación basal de las BMDC.

En contraste, sí observamos cambios significativos en la activación de las BMDC al evaluar el efecto del NO₂CLA cuando el mismo es administrado durante el proceso de diferenciación de precursores mieloides a BMDC inmaduras. Básicamente en estos ensayos, se diferenciaron los progenitores de médula ósea de ratón en presencia de NO₂CLA o CLA como control. Luego de cumplirse el tiempo necesario para su diferenciación (10 días), se cosecharon las células y se estudió su fenotipo en ausencia o en presencia de un estímulo pro-inflamatorio capaz de activarlas. La figura 3.4 muestra los resultados obtenidos al utilizar un rango de concentraciones de NO₂CLA de 0.2 a 25 µM y distintos agonistas de TLR como estímulos inflamatorios. En primer lugar se observó que el condicionamiento con NO₂CLA inhibió la expresión basal de CD86 (figura 3.4a): a la menor concentración de NO₂CLA utilizada (0.2 µM) se observó un descenso significativo en los niveles de CD86 en las BMDC cultivadas en ausencia de agonistas de TLR. Un efecto más leve, pero también significativo, fue provocado por el condicionamiento con CLA (25 µM). Además, se observó que las BMDC condicionadas con NO₂CLA respondieron a la estimulación por varios agonistas de TLR en forma más pobre que las BMDC control o las BMDC condicionadas con CLA, ya que presentaron niveles significativamente menores de CD86 en

su superficie. Esta inhibición de la inducción de CD86 mostró ser dependiente de la dosis de NO₂CLA utilizada durante la diferenciación de las BMDC cuando se utilizó LPS, un ligando de TLR4 (figura 3.4b) o Poly (I:C), un ligando de TLR3 (figura 3.4c), aunque la concentración en la cual se alcanzó la máxima inhibición fue distinta para ambos. Considerando que la magnitud de la respuesta de CD86 inducida por estos agonistas fue similar, esta diferencia podría asociarse a un efecto diferencial del NO₂CLA sobre las vías de señalización disparadas por estos agonistas, que si bien comparten componentes no son idénticas. Por otro lado, cuando la maduración y activación fue inducida con el agonista de TLR2 Pam3CSK4, la menor dosis utilizada (0.2 µM) fue suficiente para obtener el máximo de inhibición (figura 3.4d), pero esto podría deberse a que los niveles de CD86 inducidos por este estímulo pro-inflamatorio fueron significativamente menores que para los otros tratamientos utilizados.

Nuevamente se evidenció que el condicionamiento con el ácido graso nativo, CLA, también provocó un efecto inhibitorio significativo respecto a las BMDC control sobre la expresión de CD86 inducida por los tres agonistas de TLRs utilizados. De todas maneras, este efecto inhibitorio del CLA fue significativamente menor que el provocado por el NO₂CLA, sugiriendo que la nitración es necesaria para inducir el efecto mencionado sobre las BMDC.

3.2.2 Caracterización del fenotipo inducido por el condicionamiento de BMDC con NO₂CLA

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos utilizando las dos aproximaciones experimentales descritas arriba, se eligió caracterizar los efectos inducidos por el NO₂CLA sobre las BMDC durante su diferenciación a células inmaduras, a los efectos de determinar su fenotipo en término de expresión de marcadores de activación y capacidad de inmunoestimular en forma antígeno específica linfocitos T vírgenes. Para esta caracterización fue importante seleccionar una dosis de NO₂CLA óptima, en base a la intensidad de los efectos moduladores. Para definir esta dosis se consideró fundamental verificar que la concentración del NO₂CLA utilizada no afectara la viabilidad celular. La figura 3.5b muestra que el tratamiento con NO₂CLA bajo estas condiciones no causó ningún efecto sobre la viabilidad de las BMDC, incluso cuando éste fue agregado a una concentración 20 µM.

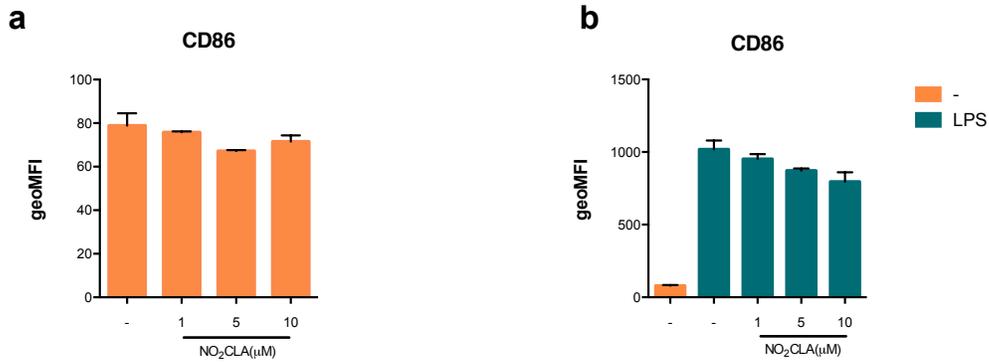


Figura 3.3. Efecto del NO₂CLA sobre la expresión de CD86 por BMDC: administración de NO₂-FA en forma conjunta con un ligando de TLR. Se cultivaron BMDC (1x10⁵ células/pozo) con NO₂CLA, en ausencia (**a**) o presencia (**b**) de LPS (100 ng/ml). Luego de 18hs de estimulación se midió por citometría de flujo la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en la población de células CD11c⁺. Los resultados se expresan como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (geoMFI) ± desvío estándar de triplicados obtenidos en un experimento y son representativos de 2 experimentos independientes.

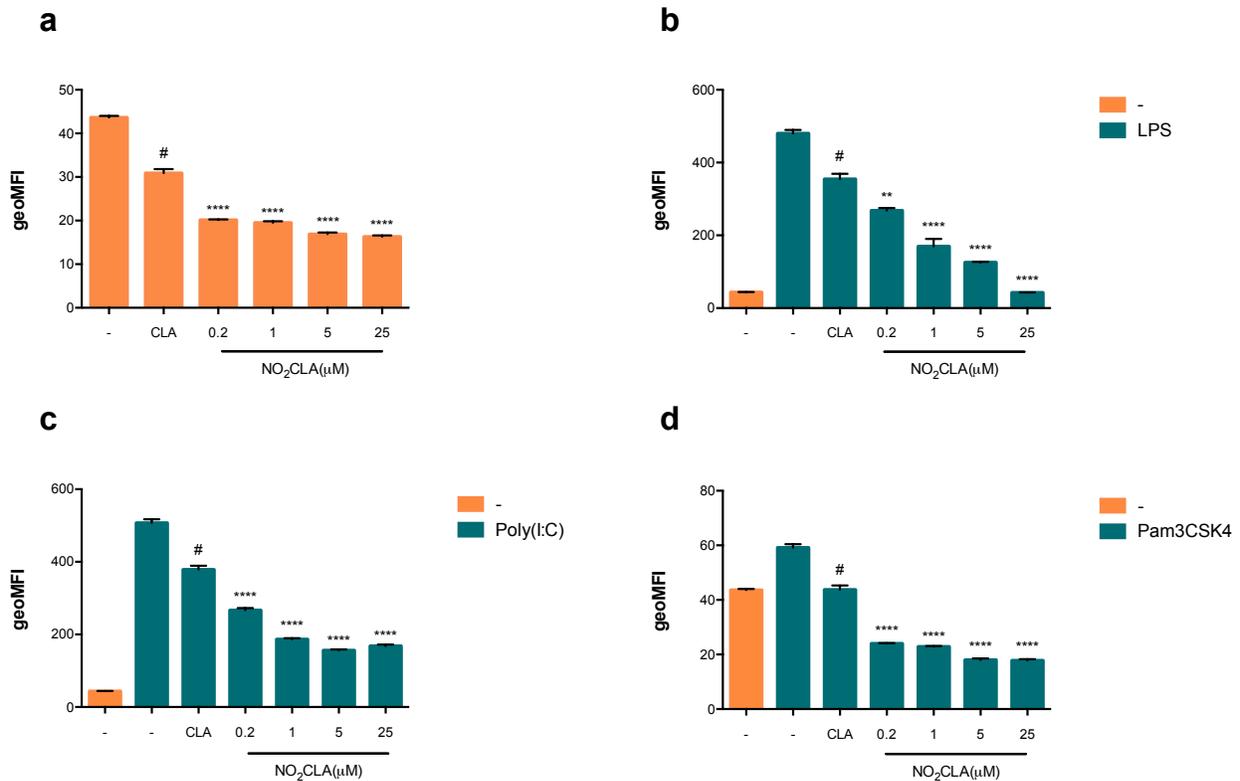


Figura 3.4. Efecto del NO₂CLA sobre la expresión de CD86 en BMDC durante la diferenciación celular. Se prepararon BMDC, tal como se detalla en Materiales y Métodos, en presencia de un rango de concentraciones de NO₂CLA de 0.2 a 25 μM. Cumplidos los 10 días del protocolo de diferenciación las células se cosecharon y se cultivaron en ausencia (**a**) o presencia de los siguientes agonistas de TLRs: LPS (**b**), Poly(I:C) (**c**) y Pam3CSK4 (**d**). A las 18hs de estimulación se midió por citometría de flujo la expresión de la molécula coestimuladora CD86 en la población de células CD11c⁺. Los resultados se expresan como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (geoMFI) ± el desvío estándar de triplicados de un experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al tratamiento con CLA (*: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01, ***: p ≤ 0.001, ****: p ≤ 0.0001, según el test de ANOVA y post-test de Tukey); # indica diferencias significativas (p ≤ 0.001) respecto a la condición sin tratar (-).

Dado que se ha reportado que la incubación de DC con cuerpos apoptóticos es capaz de inducir un fenotipo tolerogénico en estas células, consideramos relevante verificar que el condicionamiento con NO₂CLA no modificara el porcentaje de células apoptóticas en el cultivo, para descartar que el efecto observado fuera debido a esto. La figura 3.6 muestra que en condiciones basales el porcentaje de células positivas para Anexina V no varió tras el tratamiento con NO₂CLA, indicando que el condicionamiento con este NO₂-FA no desencadenó la apoptosis. Además, luego de la estimulación con LPS se observó un aumento marginal en el porcentaje de células apoptóticas en las BMDC condicionadas con NO₂CLA en relación a las BMDC control, lo cual sugiere que la inducción del fenotipo observado en las BMDC por NO₂CLA no involucra un aumento en la apoptosis.

Así, de acuerdo con estos resultados se decidió continuar trabajando con 5 µM ya que a esta dosis se observó una fuerte inhibición de la inducción de CD86 mediada por LPS sin tener efectos sobre la viabilidad celular. A partir de ahora me referiré a las BMDC obtenidas de esta manera como BMDC condicionadas por NO₂CLA

En primer lugar nos interesó profundizar en la caracterización del fenotipo adquirido por las BMDC condicionadas por NO₂CLA en cuanto a su expresión de moléculas asociadas a su capacidad de inmunoestimular linfocitos T, para lo cual analizamos mediante citometría de flujo la expresión de maduración/activación celular. Como se puede observar en la figura 3.7, los resultados obtenidos mostraron que las BMDC condicionadas por NO₂CLA presentaban niveles basales significativamente inferiores de MHC II y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 que las células diferenciadas en presencia de CLA. En este análisis observamos que el CLA tiene efectos más dispares sobre estos marcadores, con tendencias a aumentarlos (CD80 y MHC II) o disminuirlos de manera significativa (CD86). Por otro lado, este estudio también evidenció que las BMDC condicionadas por NO₂CLA demostraron ser más resistentes a la activación, ya que los aumentos inducidos por LPS en la expresión de los marcadores previamente mencionados, así como sobre CD40 (otra molécula coestimuladora relevante para la activación de los linfocitos T), fueron significativamente menores que los determinados para las BMDC controles condicionados por CLA (ver figura 3.8). Por otro lado, también se observó un aumento en la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 luego del tratamiento con LPS (figura 3.8), aunque el mismo fue menor en estas células que en aquellas diferenciadas en presencia del ácido graso nativo.

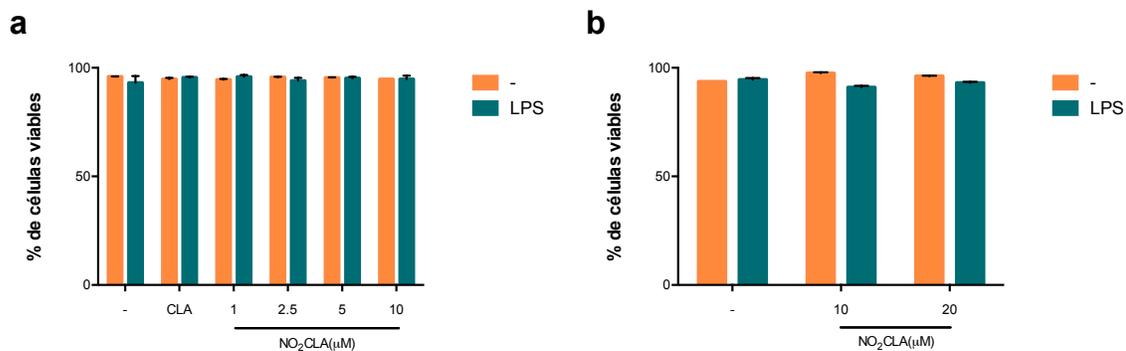


Figura 3.5. Efecto del NO_2CLA sobre la viabilidad de BMDC. Se incubaron BMDC con NO_2CLA en forma concomitante a la estimulación con LPS (a) o durante su protocolo de diferenciación (b) y luego se determinó su viabilidad por citometría de flujo utilizando el reactivo comercial LIVE/DEAD, en ausencia y presencia de LPS (100 ng/ml, 18 horas de estimulación). Se utilizaron células tratadas con el ácido graso no nitrado (CLA, 10 μM) como control. Los resultados se encuentran expresados como la media \pm desvío estándar de triplicados de un experimento y son representativos de 2 experimentos independientes.

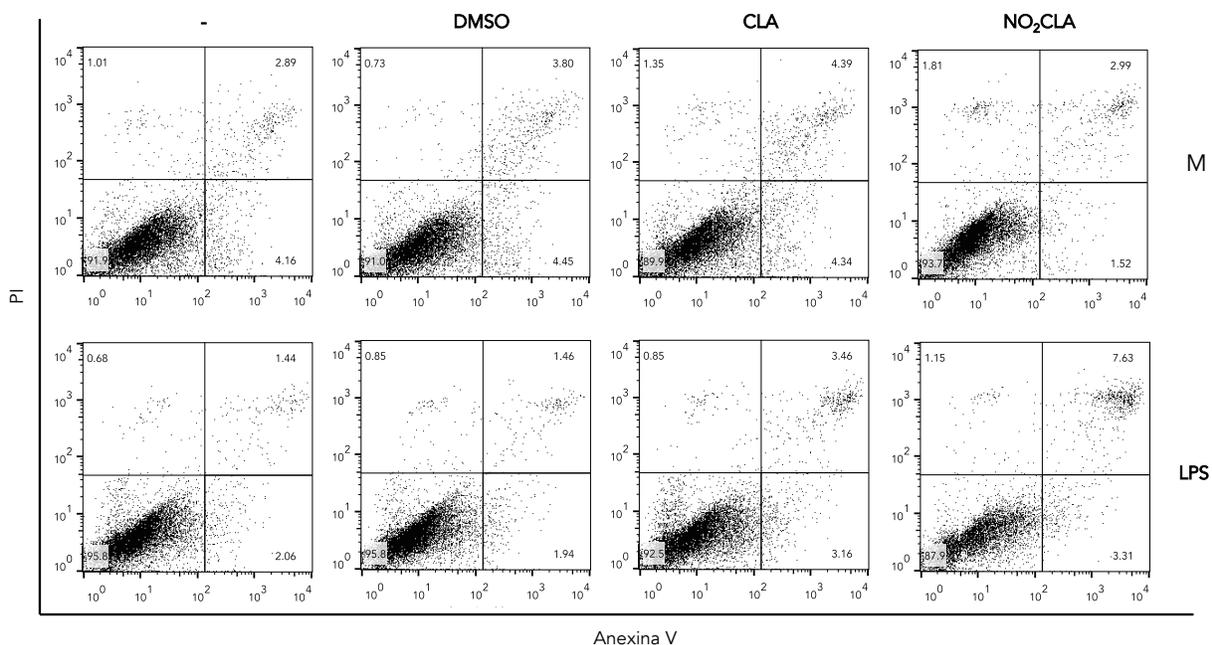


Figura 3.6. El condicionamiento con NO_2CLA no induce un aumento en la apoptosis de las BMDC. Se obtuvieron BMDC tal como se describe en Materiales y Métodos, en ausencia (-) o en presencia de DMSO, CLA o NO_2CLA (ambos ácidos grasos a 5 μM). Las BMDC control y condicionadas se cosecharon a los 10 días de diferenciación y se evaluó la presencia de células apoptóticas mediante la tinción con Anexina V-FITC y ioduro de propidio (PI) y análisis por citometría de flujo, tanto en condiciones basales (M) como luego de 18 horas de estimulación con LPS (100 ng/ml).

En el caso del receptor inhibitorio PD-L2, también se constató un descenso significativo en su expresión en las células condicionadas con NO₂CLA en comparación a las BMDC condicionadas con CLA (figura 3.8). Sin embargo, esto no fue así para el receptor inhibitorio PD-L1, que es inducido tras la estimulación con LPS y para el cual no se observaron diferencias entre las células condicionadas con NO₂CLA y aquellas que fueron tratadas con CLA (figura 3.8).

También se estudió el efecto del condicionamiento con NO₂CLA sobre la producción de citoquinas en condiciones de reposo como luego de la estimulación de las BMDC con LPS. En particular se analizó el efecto sobre la secreción de la subunidad p40 de IL-12, la IL-10 y el TNF α . Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 3.9. Para el caso de IL-12/23p40, se constató un descenso significativo en su secreción por las BMDC condicionadas con NO₂CLA en condiciones de reposo (figura 3.9a), pero no en la producción asociada a la activación inducida por LPS; bajo estas condiciones no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-12/23p40 secretados por BMDC condicionadas con NO₂-FA respecto a los correspondientes a BMDC diferenciadas en presencia de CLA (figura 3.9b). En el caso de la IL-10, esta citoquina anti-inflamatoria no fue detectable en BMDC inmaduras en condiciones de reposo independientemente del tratamiento realizado durante su diferenciación. En contraste con lo observado para la IL-12/23p40, el condicionamiento con NO₂CLA, pero no con CLA, provocó una inhibición casi total de la producción de IL-10 inducida por LPS (figura 3.9d). Este efecto también se pudo constatar a nivel de ARNm, ya que el análisis por PCR en tiempo real mostró que las BMDC condicionadas con NO₂CLA presentaban una expresión del gen correspondiente a IL-10 (*Il10*) considerablemente menor que las BMDC tratadas con CLA tras la estimulación con LPS (ver figura 3.9c).

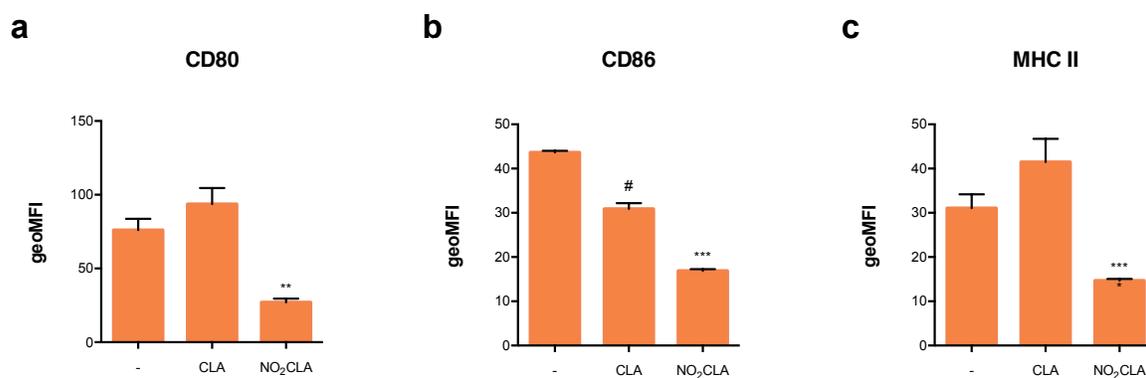


Figura 3.7. Efecto del NO₂CLA sobre la diferenciación inducida por GM-CSF de precursores mieloides a BMDC. Se diferenciaron BMDC a partir de precursores mieloides utilizando GM-CSF, tal como se detalla en Materiales y Métodos, en ausencia (indicado con -) o presencia de 5 μ M de NO₂CLA o CLA (control). A los 10 días de cultivo se cosecharon las células, se cultivaron con medio por 18hs y se determinó por citometría de flujo la expresión en superficie de los marcadores de activación CD80 (a), CD86 (b) y MHC II (c). Los resultados se encuentran expresados como la media geométrica de triplicados de la intensidad de fluorescencia (geoMFI) \pm el desvío estándar de la población CD11c⁺, y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$ vs el tratamiento con CLA, según el test de ANOVA, post test Tukey. # indica diferencias significativas ($p \leq 0.001$) respecto a la condición sin tratar (-).

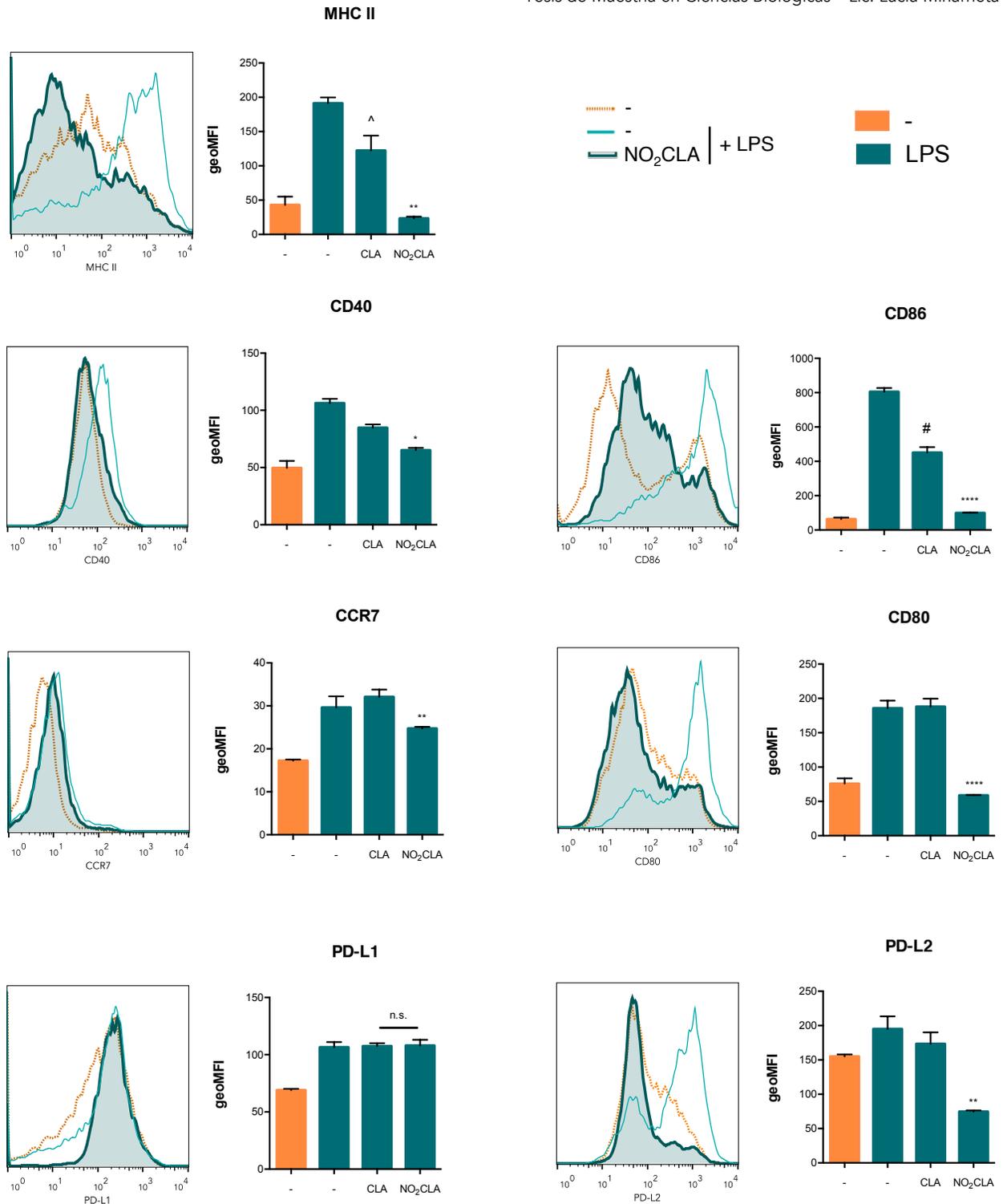


Figura 3.8. Efecto del NO₂CLA sobre la maduración de las BMDC inducida por LPS: análisis de la expresión de moléculas de superficie celular. Se indujo la maduración con LPS (100 ng/ml) de BMDC diferenciadas en ausencia (-) o en presencia de NO₂CLA o CLA (ambos a 5 μM). A las 18hs post-inducción se determinó por citometría de flujo la expresión en la población CD11c⁺ de varios marcadores de activación. Los histogramas superpuestos ilustran el resultado obtenido para las BMDC tratadas en cada una de las condiciones y son representativos de triplicados de un experimento. Los gráficos de barras muestran la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (geoMFI) ± el desvío estándar para cada condición y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tratamiento con CLA, (test de ANOVA, post-test Tukey), *: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01, ***: p ≤ 0.001, ****: p ≤ 0.0001). # y ^ indican diferencias significativas (#p ≤ 0.0001 y ^ p ≤ 0.05) respecto a la condición sin tratar (-).

Por otro lado, el análisis de la expresión del gen correspondiente a $TNF\alpha$ (*Tnf*), otra citoquina pro-inflamatoria, mostró resultados que acompañan a los obtenidos para la subunidad p40 de la IL-12. El condicionamiento con NO_2CLA provocó un marcado descenso en los niveles basales de ARNm de *Tnf* (figura 3.9e), pero no fue capaz de inhibir la inducción de la expresión de este gen tras la estimulación con LPS (ver figura 3.9f).

Además, el estudio del fenotipo de las BMDC condicionadas con NO_2CLA también incluyó el análisis del efecto sobre la respuesta mediada por la NOS2 inducida por LPS, otro marcador de activación ampliamente caracterizado. Para ello, se determinó la expresión de la enzima NOS2 por PCR en tiempo real, y los niveles de nitrito acumulados en el sobrenadante de cultivo tras la estimulación con LPS. Cabe mencionar que el nitrito refleja la producción de *NO por estas células y por lo tanto también brinda información sobre la expresión de la NOS2. El condicionamiento con NO_2CLA bloqueó de manera significativa la capacidad de las BMDC de inducir la expresión de esta enzima tras la estimulación con LPS (figura 3.10a), lo cual se vio acompañado de un marcado descenso en los niveles de nitrito detectados en los sobrenadantes de cultivo provenientes de estas células (figura 3.10b).

Finalmente, se realizó un análisis exploratorio de la expresión de algunos genes reporteros de distintas vías de señalización que han sido previamente asociadas a los efectos de los NO_2-FA . Como se puede constatar en la figura 3.11a, luego de 10 días de diferenciación en presencia de NO_2CLA , las BMDC presentaban un marcado aumento en la expresión del gen *Hspa1a*, que codifica para Hsp70, proteína asociada a la respuesta de *shock* térmico, la cual, como se mencionó en la introducción, es disparada por NO_2-FA . Este NO_2-FA también indujo la expresión, aunque de manera mas moderada, de los genes que codifican para la Fabp4 (del inglés, *fatty acid binding protein 4*, figura 3.11b) y la HO-1 (figura 3.11c), cuya expresión se encuentra asociada a la activación de las vías reguladas por PPAR γ y Nrf2, respectivamente.

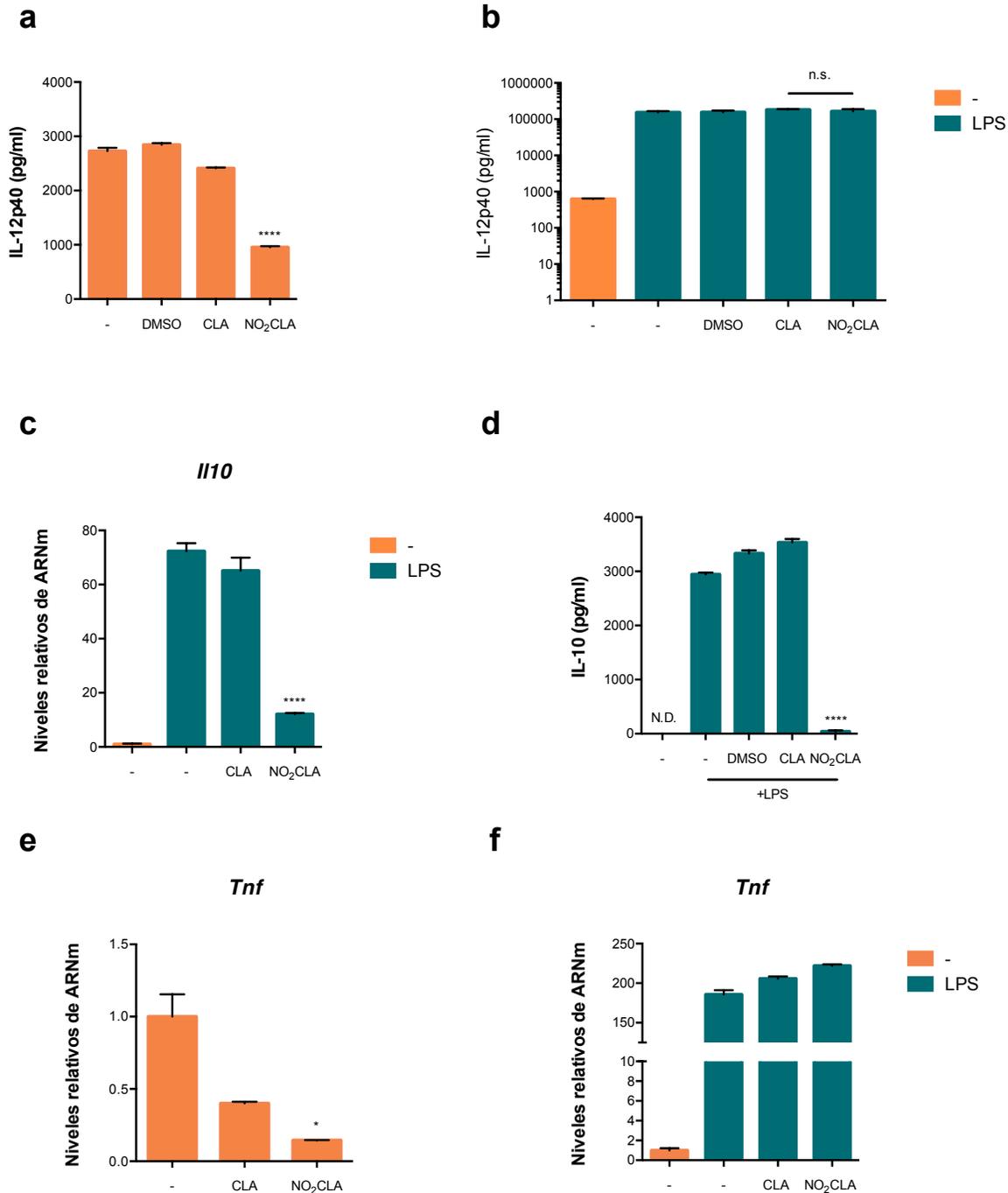


Figura 3.9. Efecto del NO₂CLA sobre la maduración de las BMDC inducida por LPS: análisis de la producción de citoquinas. Se prepararon BMDC tal como se detalla en Materiales y Métodos en ausencia (-) o en presencia de NO₂CLA, CLA (ambos a 5 μM) o DMSO (vehículo). Las BMDC control y condicionadas se cosecharon a los 10 días de diferenciación y se evaluó por ELISA su capacidad de secretar IL-12/23p40, en condiciones basales (**a**) y tras ser estimuladas con LPS (100 ng/ml) (**b**). También se determinó la expresión del gen correspondiente a IL-10 (*Ii10*) por PCR en tiempo real (**c**) y la producción de IL-10 luego del tratamiento con LPS (18 horas) por ELISA (**d**). Los niveles de expresión de la citoquina pro-inflamatoria TNFα (*Tnf*) en condiciones de reposo (**e**) y tras 4 horas de incubación con LPS (100 ng/ml) (**f**) fueron determinados por PCR en tiempo real. Los resultados se expresan como la media de triplicados con su correspondiente desvío estándar y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencia significativa con el tratamiento con CLA, según el test de ANOVA y post-test de Tukey (*: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01, ***: p ≤ 0.001, ****: p ≤ 0.0001).

3.2.3 Estudio de la capacidad de las BMDC condicionadas con NO₂CLA de promover la activación de linfocitos T

Con la finalidad de evaluar el impacto a nivel funcional de los efectos de los NO₂FA sobre las BMDC, se estudió la capacidad de las DC condicionadas en presencia de NO₂CLA de inducir la proliferación de linfocitos T *in vitro*. Para esto, se utilizó el modelo transgénico OTII, co-cultivando BMDC con linfocitos T CD4⁺ provenientes de estos ratones en presencia del péptido de la OVA que es reconocido por su TCR (OVA 323-339), y analizando su proliferación luego de 3 días de co-cultivo. Como se puede observar en la figura 3.12a, estos experimentos sugieren que el condicionamiento con NO₂CLA disminuye la capacidad de las BMDC para inducir la proliferación de linfocitos T antígeno específica. Sin embargo, no se observaron cambios en la producción de IFN γ (figura 3.12b). En conjunto, estos resultados indican que los NO₂FA serían capaces de inducir un fenotipo inmaduro de tipo tolerógeno en las BMDC, describiendo por lo tanto una nueva vía por la cual estos mediadores lipídicos serían potencialmente capaces de modular la respuesta inflamatoria.

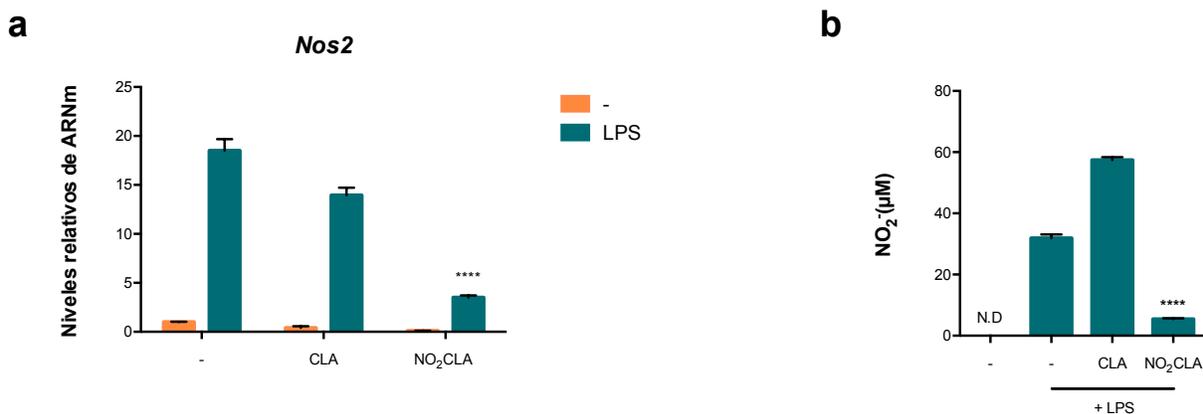


Figura 3.10. El condicionamiento con NO₂CLA inhibe la expresión de NOS2 y la correspondiente producción de •NO por BMDC. Se obtuvieron BMDC tal como se describe en Materiales y Métodos, en ausencia (control -) o en presencia de NO₂CLA o CLA (ambos a 5 µM). Las BMDC control y condicionadas se cosecharon a los 10 días de diferenciación. **(a)** Evaluación por PCR en tiempo real de la expresión del gen que codifica para la NOS2 (*Nos2*) en condiciones basales y a las 3 horas de estimulación con LPS (100 ng/ml). **(b)** Análisis de la producción de óxido nítrico mediante la determinación de los niveles de nitrito en el sobrenadante de cultivo de las BMDC luego de 18 horas de incubación con LPS según el método de Griess. Los resultados se expresan como la media de triplicados y su desvío estándar, y son representativos de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas versus el tratamiento con CLA, según el test de ANOVA y post-test Tukey (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$ vs). N.D.: No detectado.

3.3 Estudio de la contribución de los receptores PPAR γ y Nrf2 al fenotipo de las BMDC tratadas con NO₂-FA

3.3.1 *Nrf2*

De acuerdo a los antecedentes expuestos en la sección introducción, el factor Nrf2 participa en la modulación de la respuesta inmune y la pérdida del mismo en células mieloides lleva a un estado de desregulación que se traduce en mayores niveles de activación de las vías de señalización reguladas por NF- κ B. Por otro lado, existen sólidas evidencias de que los NO₂-FA, debido a su condición de electrófilos, son capaces de activar la respuesta antioxidante mediada por Nrf2. Interesantemente, los resultados expuestos anteriormente del estudio exploratorio del perfil de expresión de las BMDC condicionadas, mostraron un aumento moderado pero significativo de los niveles de ARNm correspondiente al gen que codifica para la HO-1 (*Hmox1*, ver figura 3.11c). Esto por un lado sugiere que la vía regulada por Nrf2 está siendo activada por el NO₂CLA, pero presenta interés adicional ya que existen trabajos que apoyan el rol inmunorregulador de la HO-1 en DC, sugiriendo una posible implicancia de la inducción de esta enzima en el fenotipo observado.

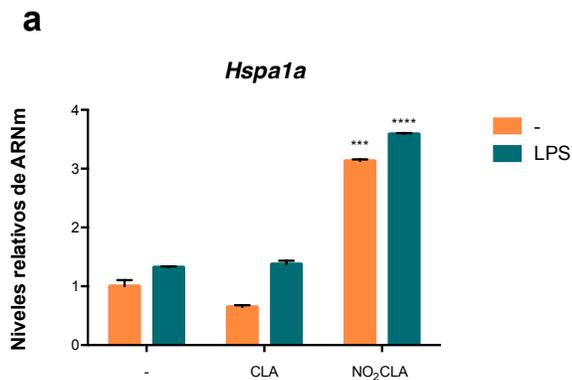
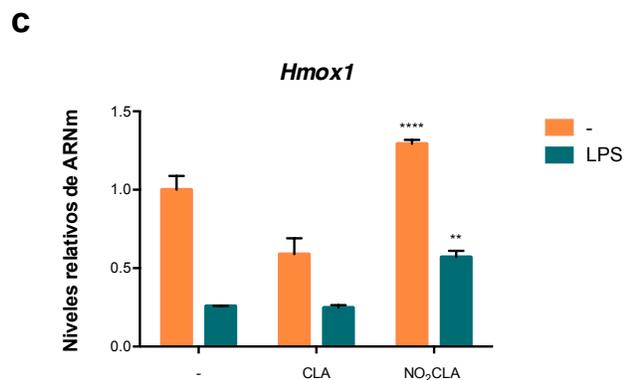
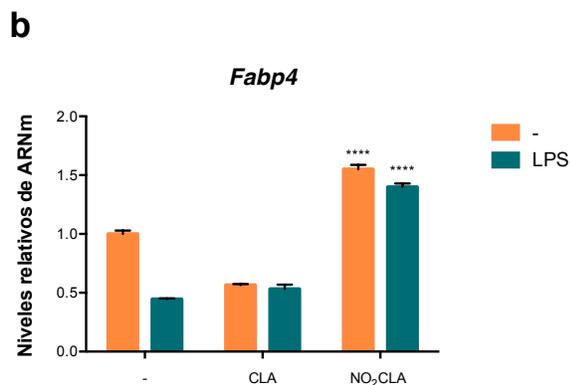
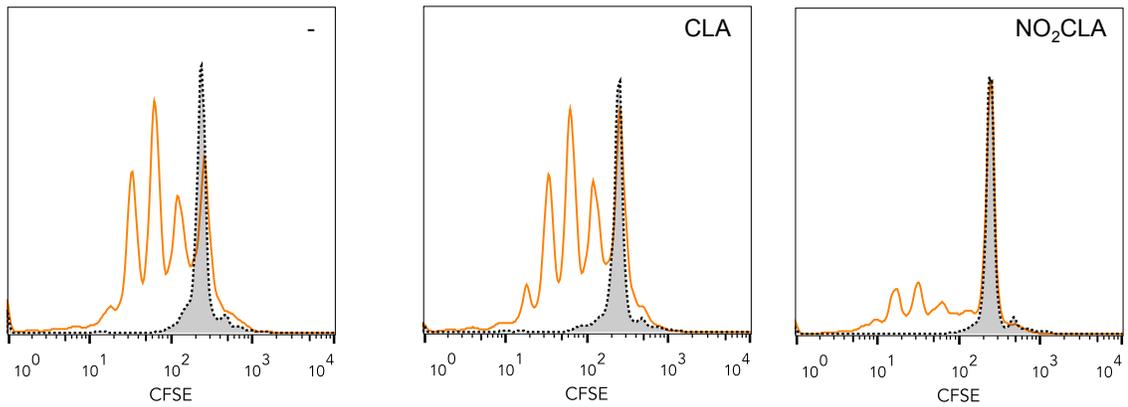


Figura 3.11. Perfil de expresión de las BMDC condicionadas con NO₂CLA. Se generaron BMDC tal como se describe en Materiales y Métodos, en ausencia (-) o en presencia de NO₂CLA o CLA (ambos a 5 μ M). Las BMDC control y condicionadas por los ácidos grasos se cosecharon a los 10 días de diferenciación. Se estudió por PCR a tiempo real la expresión basal y en respuesta (3hs post-estimulación) al LPS (100 ng/ml), de los genes que codifican para (a) HSP70 (*Hspa1a*), (b) FABP4, (*Fabp4*) y (c) HO-1 (*Hmox1*). Se utilizó para la normalización de los niveles de ARNm la expresión del gen de la β -actina. Los resultados se expresan en forma relativa a los niveles de las células sin tratar (-) y corresponden a la media más el desvío estándar, siendo representativos de 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas versus el tratamiento con CLA, según el test de ANOVA y post-test Tukey. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$



a



b

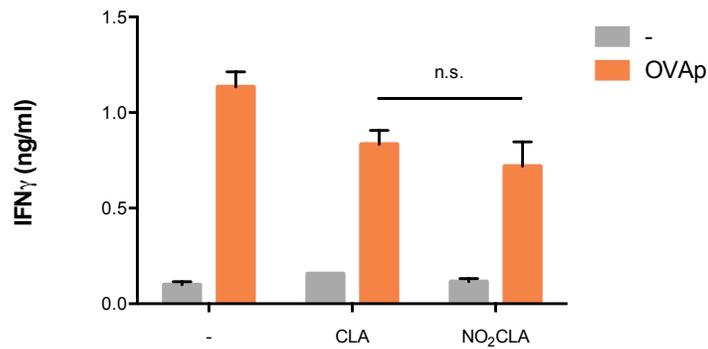


Figura 3.12. Análisis de la capacidad inmunoestimuladora de BMDC condicionadas con NO₂CLA. Se generaron BMDC tal como se describe en Materiales y Métodos, diferenciándolas en ausencia (-) o presencia de 5 μM de NO₂CLA o CLA. Al décimo día de diferenciación se cosecharon las células y co-cultivaron con linfocitos TCD4⁺ OTII marcados con CFSE en ausencia o presencia de OVA péptido (OVAp, 100 ng/ml). **(a)** Análisis de la proliferación de los linfocitos TCD4⁺, determinada por citometría de flujo, como indicador de la capacidad inmunoestimuladora de las BMDC. **(b)** Análisis de la producción de IFN_γ luego de 3 días de cultivo por ELISA; los datos graficados corresponden a la media y su desvío estándar de triplicados obtenidos en un experimento, y son representativos de 3 experimentos independientes. (n.s.= no significativo según el test de ANOVA)

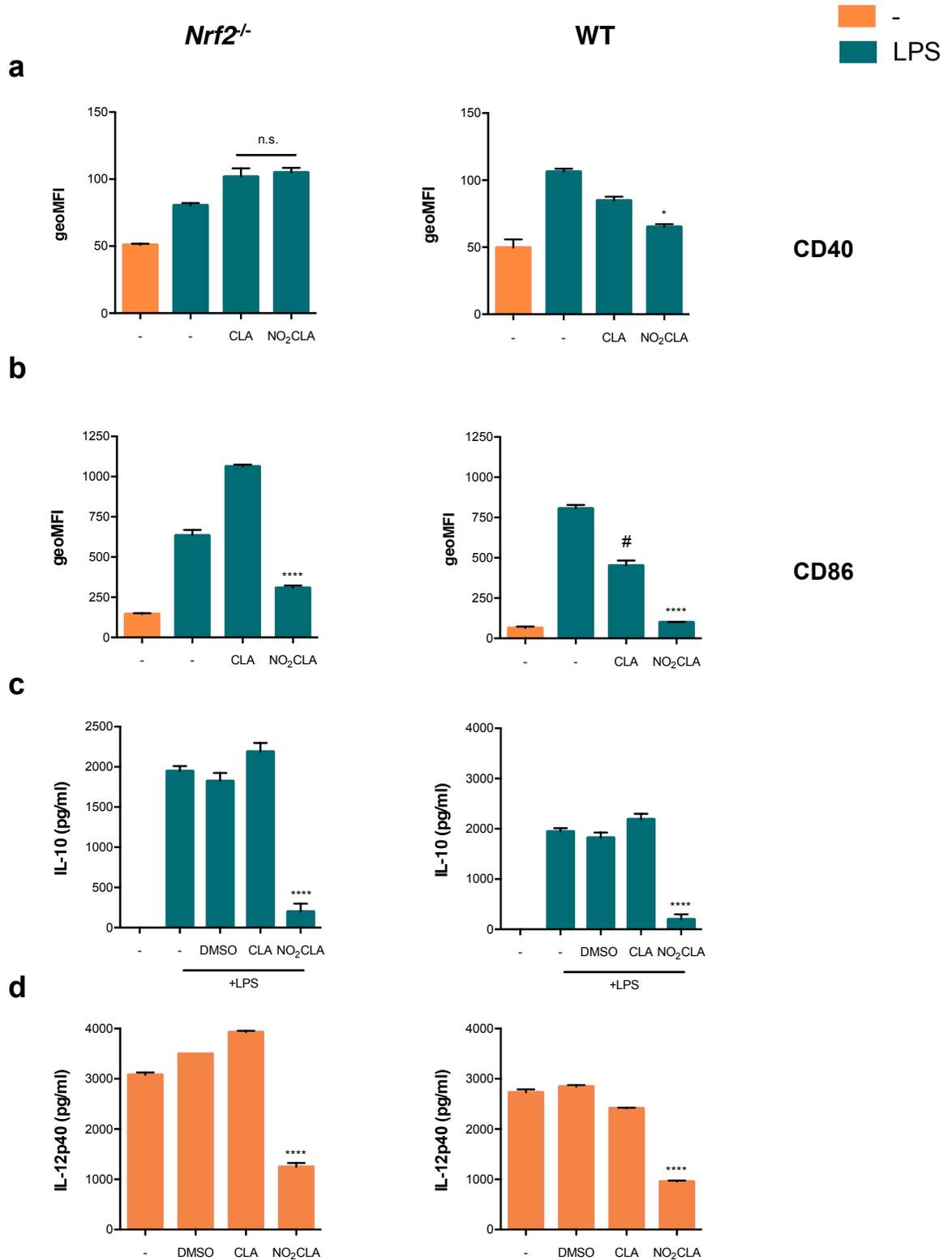


Figura 3.13. Estudio de la contribución de Nrf2 al efecto inducido por el NO₂CLA sobre el fenotipo de las BMDC. Se condicionaron BMDC de ratones deficientes en el factor Nrf2 (Nrf2^{-/-}) con NO₂CLA o CLA (ambos a 5 μM), o DMSO (vehículo) durante su diferenciación. Las células condicionadas y control se cosecharon al décimo día de diferenciación y se estudió su fenotipo basal y en respuesta a la estimulación con LPS (100 ng/ml, 18 horas). Se muestran los niveles de expresión de CD40 (a) y CD86 (b) (determinados por citometría de flujo en la población de células CD11c⁺). También se muestran los niveles en los sobrenadantes de cultivo de IL-10 (c) e IL-12/23p40 (d) (sólo en condiciones basales donde se observaron diferencias por el condicionamiento con NO₂CLA), ambos determinados por ELISA. Todos los resultados se expresan como la media y el desvío estándar de triplicados, y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tratamiento con CLA, según el test de ANOVA, utilizando el post-test de Tukey(*: p ≤ 0.05, **: p ≤ 0.01, ***: p ≤ 0.001, ****: p ≤ 0.0001). N.D.= No detectado.

Esta información en conjunto nos condujo a evaluar una posible participación de este factor en el fenotipo descrito en la sección anterior. Para esto, se prepararon BMDC a partir de precursores de médula ósea de ratones deficientes en Nrf2 (Nrf2^{-/-}). Sorprendentemente, contrario a lo reportado por otros grupos ⁷¹, el estudio del fenotipo de estas células reveló que las mismas no presentaban marcadas diferencias con las BMDC *wild type*, teniendo niveles de activación muy similares entre sí, tanto a nivel basal como luego de la estimulación con LPS, en términos de los marcadores CD80, CD86, MHC II y la producción de IL-10 e IL-12/23p40 (figura 3.13). En cuanto a la participación de Nrf2 en el fenotipo inducido por NO₂CLA, la ausencia de este factor no causó la pérdida del efecto observado sobre CD80, CD86, MHC II, PD-L2 (datos no mostrados, se seleccionó la expresión de CD86 como marcador representativo, ver figura 3.13b). En cuanto a la producción de citoquinas, la deficiencia de Nrf2 no revirtió el efecto causado por el NO₂CLA sobre la producción de IL-10 tras la estimulación con LPS (figura 3.13c) ni sobre la secreción basal de IL-12/23p40 (figura 3.13d). Sin embargo, sí se observó un efecto sobre la expresión de CD40 luego de la estimulación con LPS, ya que en las BMDC provenientes de ratones Nrf2^{-/-} el condicionamiento con NO₂CLA no causó un descenso en la expresión en superficie de esta molécula con respecto a las BMDC tratadas con CLA, a diferencia de lo ocurrido con las BMDC Nrf2^{+/+} (figura 3.13a). Estos resultados sugerirían que Nrf2 estaría involucrado en la inhibición de la inducción de CD40 mediada por NO₂CLA. De todas maneras, la mayor parte del fenotipo inducido por el NO₂CLA no puede ser explicado por la activación de este factor.

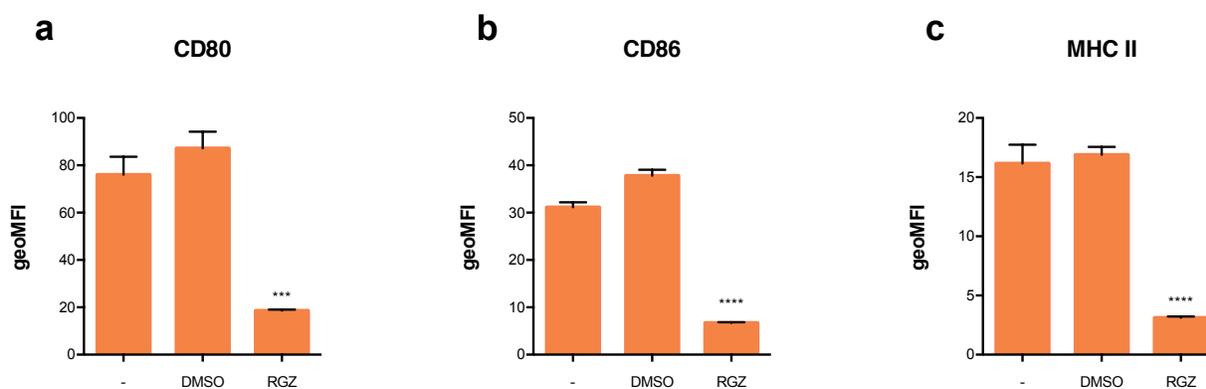


Figura 3.14. La RGZ, un agonista de PPAR γ , imita los efectos asociados al condicionamiento por el NO₂CLA de las BMDC. Se obtuvieron BMDC siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, en ausencia (-) o en presencia de RGZ (5 μ M), o de DMSO (vehículo) como control. Luego de 10 días de diferenciación se cosecharon las BMDC y se estudió por citometría de flujo la expresión de los marcadores de activación CD80 (a), CD86 (b) y MHC II (c) en superficie analizando la población CD11c⁺. Los resultados se expresan como la media y su correspondiente desvío estándar de triplicados de un experimento y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tratamiento con DMSO, según el test de ANOVA, utilizando el post-test de Tukey (*: p \leq 0.05, **: p \leq 0.01, ***: p \leq 0.001, ****: p \leq 0.0001)

3.3.2 PPAR γ

De acuerdo a la información previamente expuesta, otra de las vías de señalización que podrían estar involucradas en el fenotipo descrito tras el condicionamiento con NO₂CLA es la regulada por el receptor PPAR γ . Como ya se mencionó, existen varios trabajos que evidencian que el condicionamiento de DC con agonistas de PPAR γ induce en estas células fenotipos con características muy similares al que se describió para el NO₂CLA en este trabajo. Además, nuestro estudio exploratorio sobre el perfil de expresión inducido en las BMDC tras el condicionamiento con NO₂CLA reveló un aumento en la expresión del gen correspondiente a FABP4 (*Fabp4*), que si bien fue moderado, fue significativo. Este es un gen regulado por PPAR γ y por lo tanto su inducción por el tratamiento con NO₂CLA estaría sugiriendo la inducción de esta vía por el NO₂-FA. Teniendo esta información en cuenta, decidimos estudiar si la activación de PPAR γ estaba involucrada en el fenotipo inducido por NO₂CLA en las BMDC.

3.3.2.1 Estudio del efecto de un agonista de PPAR γ sobre el fenotipo de las BMDC

Como primer estrategia para el estudio de la contribución del receptor PPAR γ al fenotipo observado luego del condicionamiento con NO₂CLA, se realizaron experimentos en paralelo con el agonista de PPAR γ RGZ con el objetivo de determinar si la activación de este receptor reproducía los efectos observados para este NO₂-FA. La caracterización por citometría de flujo de las DC resultantes mostró que el condicionamiento con RGZ (5 μ M) causó efectos muy similares a los determinados para el NO₂CLA. En primer lugar este ligando de PPAR γ también causó una marcada disminución de los niveles basales de CD80, CD86 y MHCII (ver figura 3.14). Además, en respuesta a la estimulación con LPS, las BMDC condicionadas por RGZ expresaron niveles significativamente inferiores de varios marcadores de activación en comparación con las BMDC control (figura 3.15). Sin embargo, en cuanto a la producción de citoquinas, la RGZ se comportó de manera parcialmente diferente, ya que el condicionamiento con esta droga causó la inhibición casi total de la producción de IL-10 inducida por LPS (figura 3.16c), al igual que un marcado descenso en la secreción basal de IL-12/23p40 (figura 3.16a), de forma similar a lo observado para el NO₂-FA, pero también fue capaz de disminuir significativamente la producción de IL-12/23p40 aún luego de inducir la maduración de las BMDC con LPS (figura 3.16b). Esto no sucedió en el caso del NO₂CLA, que solo indujo un descenso en la producción de esta citoquina pro-inflamatoria en condiciones de reposo. Esta diferencia en el comportamiento entre los dos tratamientos podría deberse a la condición de agonistas parciales que les ha sido atribuida a los NO₂-FA, en contraposición a la

propiedad de actuar como agonistas totales que presentan las drogas de la familia de las tiazolidinedionas como la RGZ.

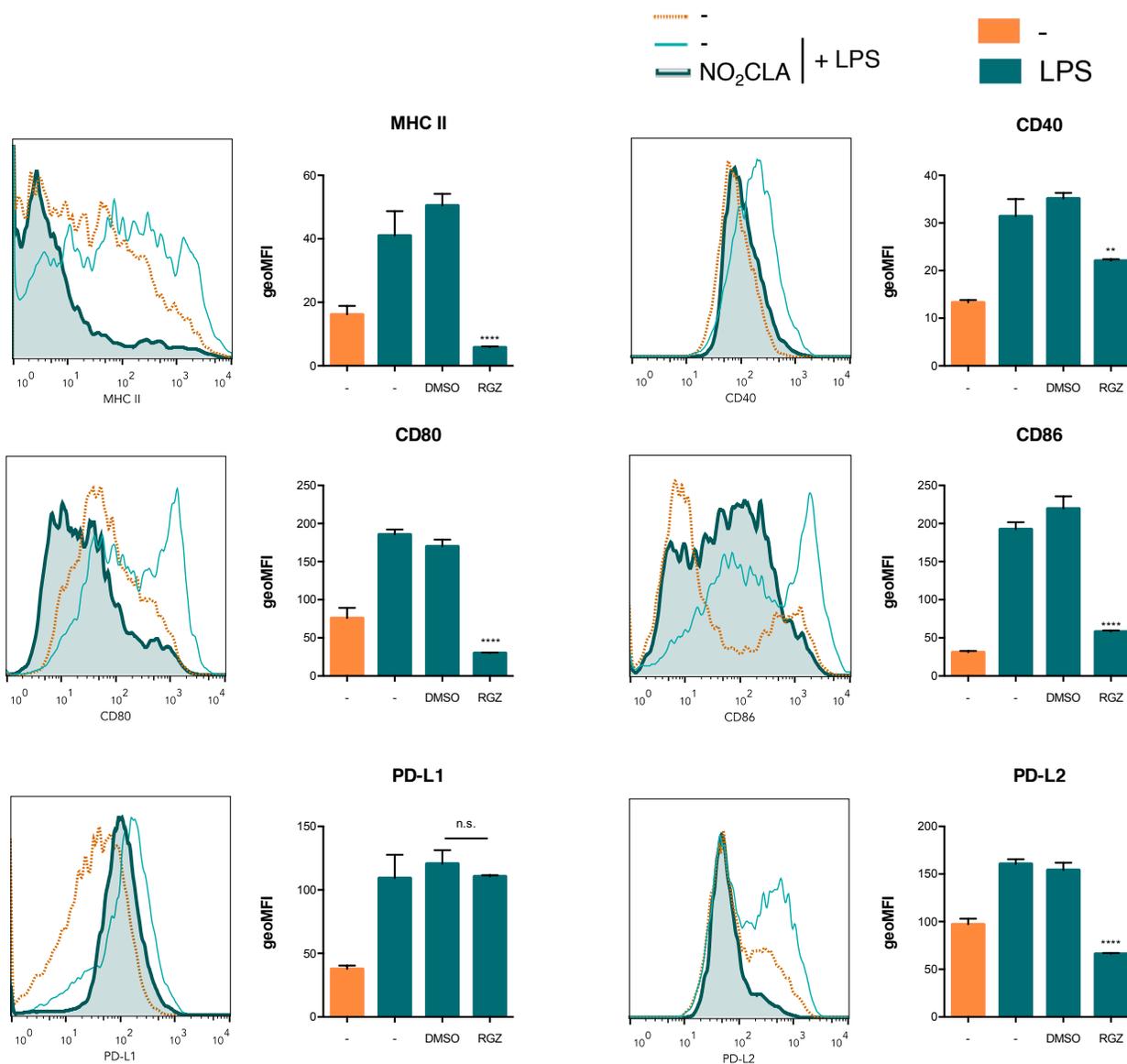


Figura 3.15. Efecto del condicionamiento de las BMDC con RGZ sobre la maduración de las BMDC inducida por LPS: análisis de moléculas de superficie celular. Se obtuvieron BMDC siguiendo el protocolo detallado en Materiales y Métodos, en ausencia (-) o presencia de RGZ (5 μ M), o de DMSO (vehículo). Luego de 10 días de diferenciación se cosecharon las BMDC y se estudió su respuesta a la incubación con LPS por 18 horas (100 ng/ml) analizando la expresión de varios marcadores de superficie celular por citometría de flujo, tal como se realizó en el análisis para el NO₂CLA. Los histogramas superpuestos ilustran el resultado obtenido para las BMDC tratadas en cada una de las condiciones y son representativos de triplicados de un experimento. Los graficos de barras muestran la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (geoMFI) \pm el desvío estándar para cada condición y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$ vs el tratamiento con DMSO, según el test de ANOVA.

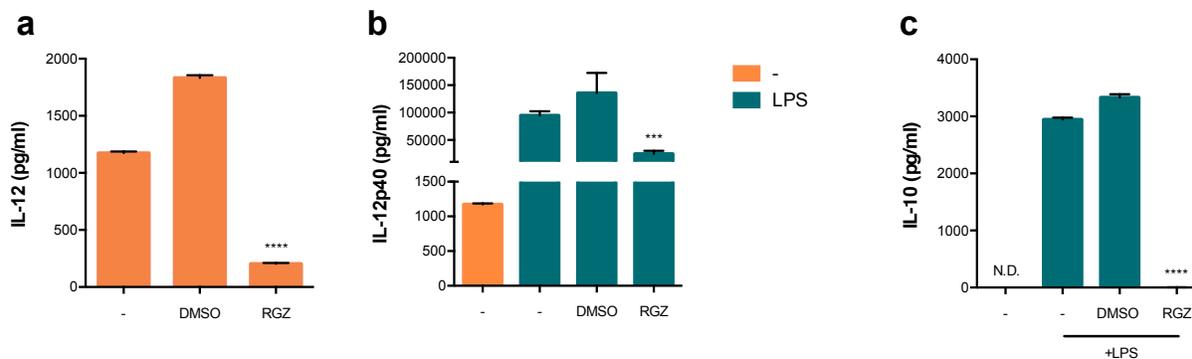


Figura 3.16. Efecto del condicionamiento de las BMDC por RGZ, agonista de PPAR γ , sobre la maduración de las BMDC inducida por LPS: análisis de la producción de citoquinas. Se prepararon BMDC siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, en ausencia (-) o presencia de RGZ (5 μ M), o DMSO (vehículo). Luego de 10 días de diferenciación se cosecharon las BMDC y se estudió su respuesta a la estimulación por 18 horas con LPS (100 ng/ml), analizando los niveles de citoquinas en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Se muestra en (a) y (b) la producción de IL-12/23p40 en condiciones basales y tras ser estimuladas con LPS (100 ng/ml), respectivamente y en (c) la producción de IL-10 luego de la activación con LPS (100 ng/ml). Los resultados se expresan como los valores medios y sus correspondientes desvíos estándar de triplicados de un experimento y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tratamiento con DMSO, según el test de ANOVA, utilizando el post-test de Tukey (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$). N.D.= No detectado.

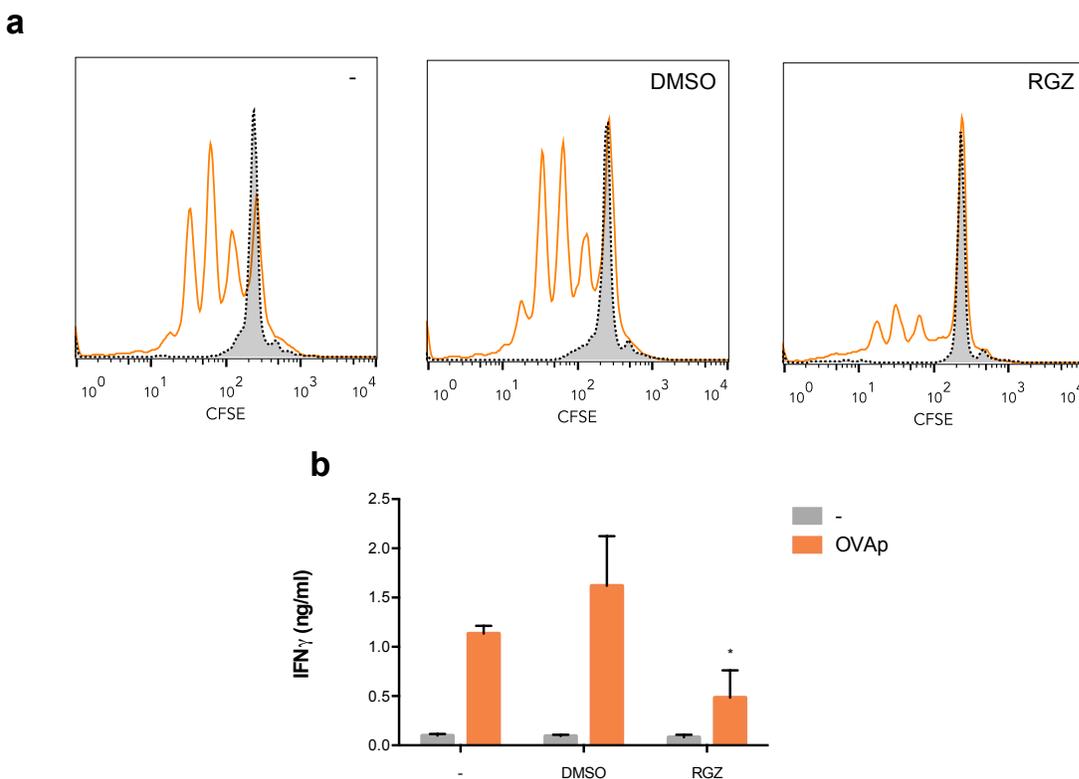


Figura 3.17. Efecto del condicionamiento con el agonista de PPAR γ , RGZ, sobre la capacidad inmunoestimuladora de las BMDC. Se generaron BMDC tal como se describe en Materiales y Métodos, diferenciándolas en ausencia (-) o presencia de 5 μ M de RGZ (5 μ M) o DMSO (vehículo). Al décimo día de diferenciación se cosecharon las células y co-cultivaron con linfocitos TCD4⁺ OTII marcados con CFSE en ausencia o presencia de OVA péptido (OVAp, 100 ng/ml). (a) Análisis de la proliferación de los linfocitos T CD4⁺, determinada por citometría de flujo, como indicador de la capacidad inmunoestimuladora de las BMDC. (b) Análisis de la producción de IFN γ luego de 3 días de cultivo por ELISA; los datos graficados corresponden a la media y su desvío estándar de triplicados obtenidos en un experimento, y son representativos de 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tratamiento con DMSO, según el test de ANOVA, utilizando el post-test de Tukey (*: $p \leq 0.05$).

Con la finalidad de evaluar a nivel funcional las BMDC condicionadas con RGZ y comparar los resultados con lo observado para el NO₂CLA, se estudió la capacidad de las mismas de inducir la proliferación de linfocitos T *in vitro*, utilizando el modelo transgénico OTII, tal como se describió para las BMDC condicionadas con NO₂CLA. El co-cultivo de las BMDC diferenciadas en presencia de RGZ con células T CD4⁺ OTII en presencia del péptido de la OVA reconocido por el TCR de estos linfocitos mostró que de manera similar a lo observado para el NO₂CLA, el tratamiento con RGZ disminuyó de manera dramática la capacidad de las BMDC de inducir la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ específica de antígeno (ver figura 3.17a). Sin embargo, contrario a lo constatado para el NO₂-FA, la RGZ indujo un descenso en la producción de IFN γ tras 3 días de co-cultivo (figura 3.17b). En conjunto, estos resultados constituyen un fuerte indicio de que el efecto inducido por NO₂CLA sobre la activación y diferenciación de las BMDC podría ser mediado por la activación del receptor PPAR γ .

3.3.2.2 Análisis de la inhibición de PPAR γ sobre el efecto mediado por NO₂CLA sobre el fenotipo de las BMDC

A modo de estrategia alternativa para evaluar la posible participación de esta vía en el establecimiento del fenotipo descrito anteriormente, se realizaron experimentos con el antagonista irreversible de PPAR γ GW9662. Interesantemente, el agregado de este inhibidor en forma concomitante al NO₂CLA durante la diferenciación de las BMDC eliminó en gran parte los efectos causados por este NO₂-FA sobre la activación de estas células, pero únicamente en el proceso de maduración inducida por LPS. La figura 3.18 muestra que el tratamiento con este inhibidor no fue capaz de revertir los efectos causados por el NO₂CLA sobre la activación basal de las BMDC, dado que no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión en superficie de CD80, CD86 ni MHC II (figuras 3.18a-c) ni en la producción de IL-12/23p40 en condiciones de reposo (figura 3.18d). En contraste, tal como se muestra en la figura 3.19, el GW9662 disminuyó en forma parcial la inhibición de la expresión mediada por NO₂CLA de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, así como de MHC II y de PD-L2 (figuras 3.19a-e). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la producción de IL-10 entre las BMDC condicionadas con NO₂CLA y aquellas tratadas con GW9662 junto con el NO₂-FA, aunque el inhibidor por sí mismo indujo un marcado descenso en los niveles de esta citoquina (figura 3.19f). Estos resultados, junto con lo observado previamente con la RGZ, indican que el NO₂CLA actuaría ejerciendo sus efectos al menos en parte a través de la activación del receptor PPAR γ . Sin embargo, las evidencias obtenidas hasta el momento sugieren que los efectos de este NO₂-FA sobre la activación basal de las

BMDC, tanto a nivel de marcadores de superficie como de producción de IL-12, serían mediadas por otra(s) vía(s) de señalización.

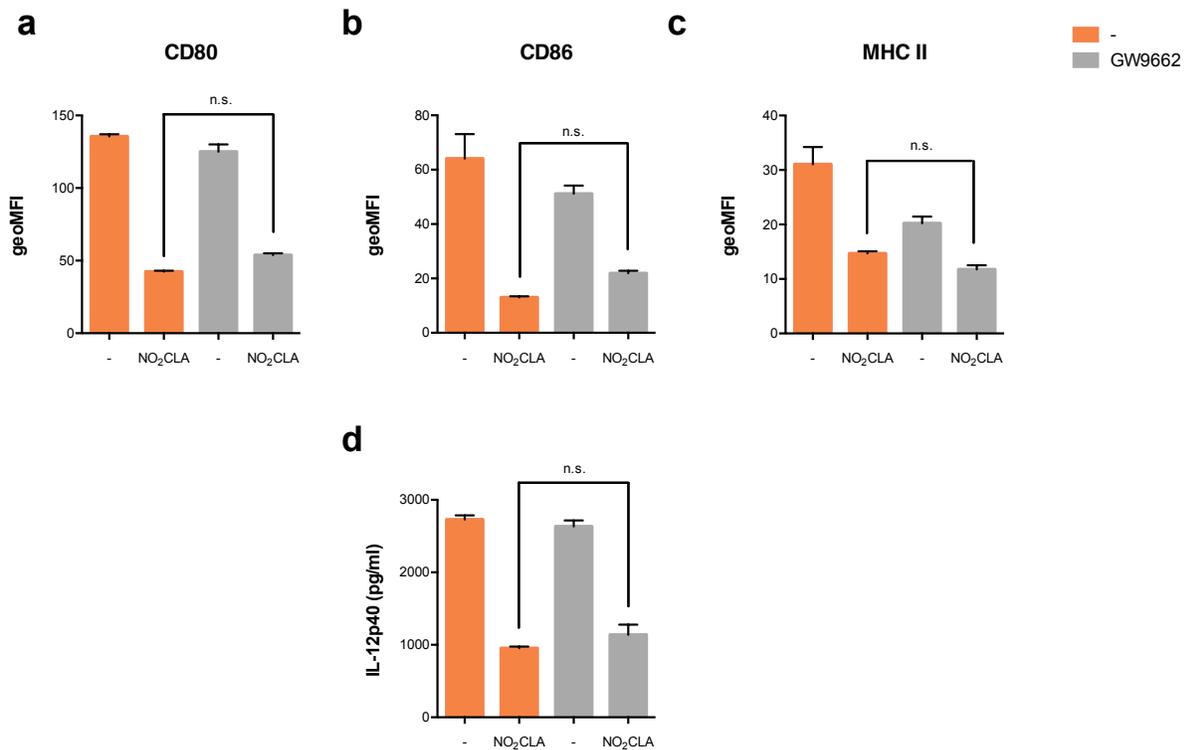


Figura 3.18. Estudio de la contribución de PPAR γ en el condicionamiento por NO₂CLA de las BMDC: efectos sobre el fenotipo obtenido en condiciones basales. Se condicionaron BMDC durante su diferenciación a partir de precursores mieloides en ausencia (-) o presencia de NO₂CLA (5 μ M). En paralelo se prepararon BMDC condicionadas y control en presencia del inhibidor de PPAR γ GW9662 (5 μ M). De (a) a (c) se muestran los resultados del perfil de expresión de varios marcadores de activación medidos por citometría de flujo (análisis sobre la población CD11c⁺). En (d) se representan los niveles de producción de IL-12/23p40 en condiciones basales. Todos los resultados se expresan como la media y su correspondiente desvío estándar de triplicados de un experimento y son representativos de 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tratamiento con DMSO, según el test de ANOVA, utilizando el post-test de Tukey (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

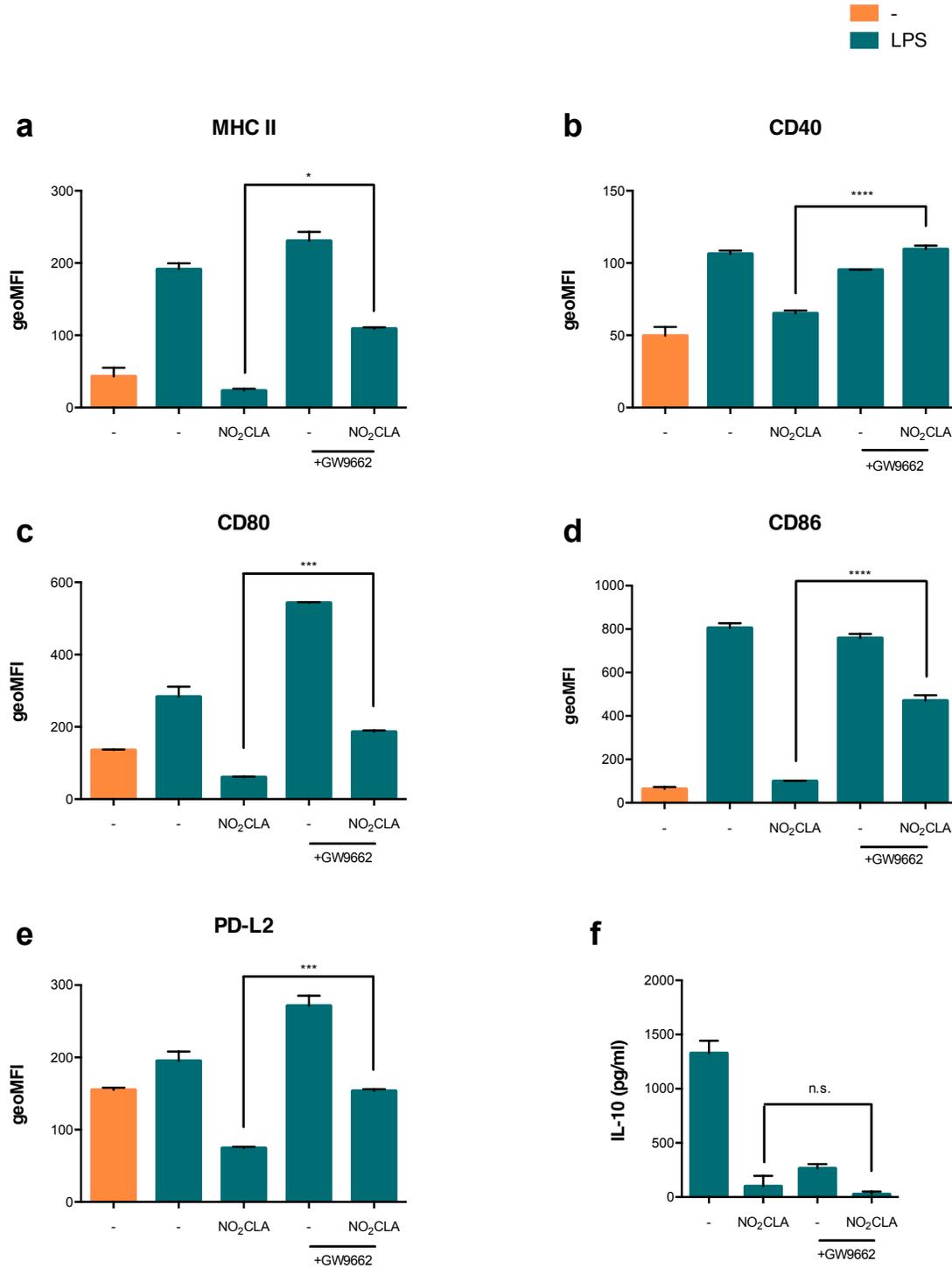


Figura 3.18. Estudio de la contribución de PPAR γ en el condicionamiento por NO₂CLA de las BMDC: efectos sobre el fenotipo obtenido en respuesta a la maduración inducida por LPS. Se condicionaron BMDC durante su diferenciación a partir de precursores mieloides en ausencia (-) o presencia de NO₂CLA (5 μ M). En paralelo se prepararon BMDC condicionadas y control en presencia del inhibidor de PPAR γ GW9662 (5 μ M). A los 10 días de la diferenciación se cosecharon las células y se estudió el fenotipo celular en respuesta a la estimulación con LPS (100 ng/ml, 18 horas). De (a) a (e) se muestran los niveles de expresión en superficie de varios marcadores de maduración/activación, medidos por citometría de flujo en la población CD11c⁺. En (f) se representan los niveles en los sobrenadantes de cultivo de IL-10 determinados por ELISA tras la estimulación con LPS durante 18 horas. Todos los resultados se expresan como la media y su correspondiente desvío estándar de triplicados de un experimento y son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con el tratamiento con DMSO, según el test de ANOVA, utilizando el post-test de Tukey (*: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$).

4 Discusión

4.1 Estudio de la capacidad de los NO₂-FA de modular la activación alternativa de macrófagos

El efecto de los NO₂-FA sobre la activación clásica de macrófagos ha sido ampliamente estudiado por varios grupos, incluyendo el nuestro; la administración de estos mediadores lipídicos ha demostrado causar un marcado descenso en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-6, quimioquinas y la NOS2, promoviendo de esta manera un fenotipo anti-inflamatorio en macrófagos^{90,93}. Sin embargo, el efecto de los NO₂-FA sobre la activación alternativa -inducida por IL-4- no había sido estudiado hasta ahora.

El trabajo realizado en el marco de mi Tesina de Licenciatura mostró que los NO₂-FA son capaces de potenciar la inducción mediada por IL-4 de Arg-1 por un mecanismo dependiente de la activación de PPAR γ . Estos resultados describirían una nueva vía a través de la cual los NO₂-FA podrían contribuir a la modulación de las respuestas inflamatorias, promoviendo la activación alternativa de los macrófagos. Esta modulación se basaría en que este fenotipo del macrófago se asocia a funciones inmunomoduladoras, ya que a través de la expresión de la enzima Arg-1 puede limitar la producción de \cdot NO y generar un ambiente deficiente en arginina que limite la proliferación de los linfocitos T¹⁵. Además, como ya se comentó, la inducción de Arg-1 promueve la síntesis de precursores de poliaminas y colágeno asociados con el proceso de reparación tisular (revisado por¹¹⁴). Por otro lado, la dependencia de este efecto de la activación de PPAR γ está de acuerdo con varios antecedentes que sugieren que este receptor tendría un papel importante en la activación alternativa⁵⁰ y con el hecho que los NO₂-FA pueden actuar como ligandos de PPAR γ ^{85,99}. Dado que la descripción del fenotipo alternativo de macrófagos incluye también la expresión de otros marcadores como Ym1, RELM α y MR,

resultó interesante analizar si los NO₂-FA pueden potenciar la expresión inducida por IL-4 de estas moléculas al igual que lo hacen con la Arg-1, lo cual contribuiría a describir el fenotipo celular inducido por los NO₂-FA en presencia de IL-4. Para poner esto a prueba, analizamos la expresión a nivel transcripcional de la enzima Arg-1, en paralelo con la expresión de las proteínas Ym1, RELM α y el receptor MR en presencia y ausencia de IL-4. Los resultados mostraron que los NO₂-FA no son capaces de inducir *per se* la expresión de Arg-1, ni de ninguno de los genes analizados asociados al fenotipo alternativo. Esto probablemente se explica por requerimientos para la expresión de estos genes de la señalización a través de STAT6, el cual es activado por IL-4 o IL-13¹¹⁵⁻¹¹⁷. En contraste, en presencia de IL-4, el OANO₂ produjo un incremento en los niveles de ARNm de Arg-1, que concuerda con el aumento previamente observado tanto a nivel de la proteína Arg-1 como de la actividad arginasa, apoyando la idea de que la regulación mediada por el OANO₂ se da a nivel transcripcional.

Estos resultados, junto con los datos obtenidos en mi tesis de Licenciatura, que mostraban dependencia de este efecto con la activación de PPAR γ , sugerirían que la modulación de la expresión de Arg-1 por NO₂-FA es regulada por PPAR γ . Esto se apoya además en observaciones donde los macrófagos deficientes en PPAR γ presentaban niveles de expresión de Arg-1 marcadamente menores que los macrófagos control⁵⁰. No obstante, la información disponible es controversial ya que otros trabajos proponen que este factor nuclear sería prescindible para la polarización hacia este fenotipo⁵⁴. Estas discordancias en los reportes podrían estar ligadas a diferencias entre las cepas de los ratones utilizados (Balb/c versus C57BL/6), ya que en el trabajo de Odegaard *et al* discuten las diferencias que existen en la capacidad de montar una respuesta Th2 entre estas cepas⁵⁰. De todas maneras, es certero que hay una interacción entre STAT6 y PPAR γ ; se ha propuesto que STAT6 actúa como un facilitador para los genes regulados por PPAR γ en macrófagos y DC, potenciando las respuestas reguladas por PPAR γ ⁵⁴. En este trabajo, los autores encontraron que la administración de IL-4 en presencia de un agonista de PPAR γ no solo aumentaba el número de genes modulados por PPAR γ , sino que también incrementaba la magnitud de las respuestas en genes individuales. El gen de Arg-1 presenta un sitio de unión para STAT6 y para PPAR γ en su promotor^{115,118}. La presencia de STAT6 podría contribuir a estabilizar la unión de PPAR γ a su elemento de respuesta, potenciando así la transcripción mediada por la activación de PPAR γ .

Sin embargo, el estudio de la expresión de otros genes característicos del fenotipo alternativo (MR, RELM α y Ym1) en BMDM no mostró cambios significativos en ninguno de ellos tras el tratamiento con

OANO₂ en presencia de IL-4. Esto estaría ligado a la ausencia de una inducción por IL-4 robusta de estos genes en las condiciones de trabajo utilizadas, las cuales fueron optimizadas para el estudio del efecto sobre la expresión de Arg-1. En primer lugar, es posible que los otros genes ensayados posean una cinética de inducción diferente a la del gen de Arg-1 y por lo tanto no sean detectables al tiempo en los que fueron estudiados. De hecho, muchos de los estudios realizados *in vitro* sobre la expresión de estos genes se basan en tiempos mucho más largos de estimulación (24-48 horas) y concentraciones de IL-4 diez veces mayores de las utilizadas en este trabajo. En particular, un análisis de dosis respuesta de esta interleuquina sobre la expresión de varios marcadores de activación alternativa en BMDM tras 24 horas de estimulación mostró que a dosis similares a la que nosotros utilizamos, el gen de Arg-1 fue el que presentó mayores niveles de inducción¹¹⁹. Otro estudio realizado en BMDM muestra que la cinética de inducción de Ym1 parece ser más lenta que la de Arg-1, ya que la detección de Ym1 por Western Blot solo es posible a partir de las 48 horas de estimulación, mientras que para el caso de Arg-1, ya se observan niveles considerables de proteína a las 24 horas¹²⁰. Cabe mencionar además que el sistema *in vitro* que utilizamos en este trabajo está muy alejado de lo que sería la situación *in vivo*, ya que en la situación fisiológica el macrófago estaría en contacto con otras células del sistema inmune o incluso del estroma que podrían producir señales capaces de promover su diferenciación. De hecho, la descripción de la mayoría de los genes asociados al fenotipo alternativo surge de observaciones realizadas a partir de macrófagos recuperados de modelos de infección con helmintos parásitos, y algunos autores discuten que la expresión de estos marcadores no es permanente en este fenotipo de macrófagos, pudiendo variar con el tipo de enfermedad, el estadio de la misma, o el sitio de donde fueron recuperados los macrófagos¹²¹.

En base a los resultados obtenidos y considerando que la presencia de otros estímulos en una situación fisiológica podría ser importante, analizamos el efecto del OANO₂ sobre la activación alternativa *in vivo*, administrando el NO₂-FA junto con IL-4 en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c. La determinación de la expresión de ARNm de la Arg-1 en las células recuperadas de la cavidad peritoneal reveló que, tal como se había observado *in vitro*, la administración de OANO₂ potenció la inducción de Arg-1 mediada por IL-4. Interesantemente, contrastando con las observaciones obtenidas *in vitro*, se observó un efecto sobre los marcadores de activación alternativa MR y Ym1 pero no sobre RELM α . Esta diferencia entre los distintos marcadores de activación alternativa puede ser explicada por el hecho de que RELM α no parece ser regulado por PPAR γ , ya que el análisis de su expresión en macrófagos deficientes en este receptor no mostró diferencias entre las células *knockout* y *wild type*⁵⁰. En cambio, la pérdida de este

factor sí causó un dramático descenso en la expresión de MR sugiriendo una posible regulación por PPAR γ . En cuanto a las evidencias de que el gen de Ym1 pueda ser regulado por PPAR γ , no existen muchos indicios, pero un estudio realizado acerca de la dependencia de STAT6 para la inducción de este gen en macrófagos mostró que la línea celular de macrófagos RAW264.7 fue incapaz de aumentar la expresión de Ym1 tras la estimulación con IL-4, lo cual condujo a sugerir a los autores la ausencia de un componente de señalización esencial para la transcripción de este gen¹¹⁷. Este indicio, junto con otros reportes que afirman que las células RAW expresan niveles casi indetectables del receptor PPAR γ ^{122,123}, sugieren que este receptor podría estar involucrado en la regulación de la expresión de Ym1.

En conclusión nuestros resultados apoyan la noción de que los NO₂-FA podrían promover la activación alternativa de macrófagos en presencia de la citoquina Th2 IL-4. Teniendo en cuenta que existen reportes de que los NO₂-FA podrían ser generados *in vivo* en el transcurso de una respuesta inflamatoria⁸¹ resulta relevante plantear la posibilidad de que estos mediadores lipídicos pudieran actuar como moduladores endógenos, principalmente en la etapa final, durante la cual los niveles acumulados de estas moléculas podrían ser suficientes como para inhibir la activación clásica de macrófagos, pero también para promover la activación alternativa. Frente a este planteo, surge la pregunta de si la IL-4 podría estar presente junto a señales que induzcan la activación clásica, ya que estos fenotipos de macrófagos tradicionalmente se han asociado a las respuestas de tipo 2 y 1, respectivamente. Sin embargo, resulta cada vez más evidente de que las respuestas frente a un patógeno son complejas y muy a menudo suelen tener un componente mixto. Además, el ambiente de citoquinas podría variar en el transcurso de la respuesta, favoreciendo así la polarización hacia un fenotipo u otro. En el caso del macrófago alternativo, cuya función es esencialmente inmunorreguladora y reparadora de tejidos, sería relevante su aparición en la última fase de la respuesta, cuando es necesario el apagado de los mecanismos efectores inducidos para la eliminación del agente patógeno, de manera de no generar respuestas exacerbadas que pudieran ser nocivas para el hospedero, y al mismo tiempo, inducir el desarrollo de mecanismos que contribuyan a la reparación de tejidos eventualmente dañados por la acción del patógeno y/o por la respuesta inflamatoria en sí. El estudio realizado por Loke *et al*¹²⁴ mostró que existe una producción temprana de IL-4 en respuesta al daño tisular, la cual es independiente de que se haya montado una respuesta adaptativa, y que proviene de células de la inmunidad innata. Nosotros postulamos que esta IL-4 podría generarse en la etapa final de una respuesta inflamatoria de tipo 1, en la cual estuvieron presentes todas las señales necesarias para el desarrollo de macrófagos clásicos que expresan NOS2 y por lo tanto generan *NO que puede dar lugar a la formación de NO₂-FA.

De esta manera, los NO₂-FA podrían actuar junto con la IL-4 promoviendo la diferenciación de macrófagos alternativos.

4.2 Estudio de la capacidad de los NO₂-FA de modular la activación de las BMDC

4.2.1 Comparación de la administración del NO₂-FA durante la diferenciación versus durante la activación por estímulos pro-inflamatorios en BMDC

El interés de nuestro estudio sobre el efecto de los NO₂-FA sobre la activación de las DC reside principalmente en la función central que tienen estas células en el inicio de la respuesta adaptativa, actuando como disparadoras de la misma debido a su capacidad de activar linfocitos T vírgenes. Este papel en la activación de linfocitos T vírgenes no sólo determina la generación de células T efectoras específicas contra los antígenos presentados por la DC, sino que además le da un sesgo a la respuesta T. Esto es porque las señales recibidas por el linfocito T a través de las moléculas de superficie y de las citoquinas secretadas por la DC influyen en la diferenciación de los linfocitos T, los cuales pueden adquirir fenotipos Th1, Th2, Th17 entre otros, con propiedades efectoras diferenciales. Como el fenotipo de la DC depende de las señales que recibe a través de sus PRRs y receptores para citoquinas, decidimos estudiar si los NO₂-FA eran capaces de modular la maduración y activación de las DC, ya que su eventual efecto sobre el fenotipo que adquieren en respuesta a estímulos pro-inflamatorios podría ser de interés para inhibir y/o condicionar la respuesta T específica, y a través de ella el conjunto de la respuesta adquirida.

A diferencia del análisis realizado en macrófagos, para el cual utilizamos OANO₂ como NO₂-FA modelo, para este estudio decidimos trabajar con NO₂CLA, el derivado de la nitración del ácido linoleico conjugado. La razón para adoptar este NO₂-FA es que recientemente han surgido trabajos sosteniendo que su relevancia fisiológica es mucho mayor; su configuración particular, con dos dobles enlaces conjugados, lo hace mucho más susceptible a la nitración. Como ya se mencionó anteriormente, el NO₂CLA ha sido detectado en muestras humanas de plasma⁸¹ y orina⁸². Por otro lado, se ha detectado su formación por macrófagos activados⁸¹, y estudios realizados en colaboración con el Dr. Schopfer han revelado que en un modelo de inflamación peritoneal también existe formación de este NO₂-FA (Minarrieta *et al*, trabajo en preparación). En conjunto esta información apoya la idea de que el NO₂CLA

se formaría durante la respuesta inflamatoria en niveles mucho mayores que otros NO₂-FA y por lo tanto tendría un papel más relevante como modulador endógeno, contribuyendo al apagado de la misma.

Para realizar este análisis, adoptamos dos estrategias experimentales que difirieron en el momento de agregado del NO₂CLA. En primer lugar, estudiamos el fenotipo de las BMDC al agregar el NO₂CLA en forma concomitante a un estímulo pro-inflamatorio (LPS). Utilizando este diseño experimental, observamos que el agregado de NO₂CLA no indujo grandes cambios sobre la expresión de CD86 en las BMDC, una molécula coestimuladora asociada a la capacidad inmunogénica de la célula, en relación a su potencial para activar linfocitos T. Esto sugeriría que los NO₂-FA no serían capaces de inhibir la activación inducida por LPS en las BMDC, contrario a lo reportado previamente acerca de su acción sobre los macrófagos. Sin embargo, es cierto que los estudios realizados en macrófagos utilizaron principalmente al OANO₂ como NO₂-FA modelo, el cual podría comportarse de manera ligeramente distinta al NO₂CLA. Existen indicios de que la reactividad del NO₂CLA, y por lo tanto su capacidad de formar aductos, sería significativamente menor que la del OANO₂ (Beatriz Alvarez, Unidad de Enzimología, Facultad de Ciencias, comunicación personal). En particular, esto se traduciría en una menor capacidad para formar aductos con componentes de las vías de señalización asociadas a NF-κB y Nrf2, las cuales han sido principalmente ligadas a los efectos de los NO₂-FA descritos en macrófagos^{90,93}. Si este fuera el caso, es posible que fueran necesarias mayores dosis de NO₂CLA para observar un efecto sobre la activación de las BMDC en este esquema experimental. De todas maneras este estudio no resultaría tan interesante ya que al aumentar la concentración el análisis perdería la relevancia fisiológica.

Luego procedimos a analizar qué sucedía con el fenotipo de las BMDC cuando el NO₂CLA se administra durante el período de diferenciación, previo a la incubación con estímulos pro-inflamatorios. En contraste a lo observado para el esquema experimental anterior, sí hubo un gran efecto del NO₂CLA sobre la expresión de CD86. Constatamos un dramático descenso en la expresión de esta molécula coestimuladora, tanto en condiciones de reposo, como luego de inducir su activación con varios agonistas de TLR. El análisis comparativo de dosis respuesta usando los ligandos de TLR Pam3CSK4 (TLR2), Poly(I:C) (TLR3) y LPS (TLR4) mostró ciertas diferencias entre ellos. En primer lugar, la dosis de NO₂CLA requerida para revertir la inducción de CD86 a niveles basales fue marcadamente menor (0.2 μM) para Pam3CSK4, pero esto probablemente se deba a que el nivel de expresión de CD86 inducido fue considerablemente menor que para los otros ligandos. También hubo diferencias en la

concentración de NO₂CLA a la cual se alcanzó la máxima inhibición de la respuesta inducida por Poly(I:C) y LPS (1 μM vs 25 μM, respectivamente). Además, la inhibición lograda para el caso del LPS fue mayor. Considerando que la magnitud de la respuesta de CD86 inducida por estos agonistas fue similar, esta diferencia podría asociarse a un efecto diferencial del NO₂CLA sobre las vías de señalización disparadas por estos agonistas, que si bien comparten componentes no son idénticas. Estos resultados sugerirían que parte de la activación causada por Poly(I:C) es desencadenada a través de una vía de señalización que no es afectada por el NO₂CLA. En primera instancia sería lógico suponer que las proteínas adaptadoras a través de las cuales señalizan estos TLR no estarían implicadas, ya que si bien TLR3 no utiliza MyD88, ambas son dependientes de TRIF (revisado por¹²⁵). De todas maneras, estas cascadas de señalización involucran a muchos actores y se requeriría realizar experimentos más detallados para detectar componentes diferenciales activados por estos agonistas. Mas allá de las diferencias observadas entre las respuestas inducidas por estos agonistas de TLR, la robusta inhibición de la inducción de CD86 en estos experimentos sugiere que el NO₂CLA actuaría sobre vías de señalización que se inducen durante el desarrollo de la célula hacia BMDC y que van a determinar su fenotipo final en condiciones de reposo y/o tras la activación con estímulos pro-inflamatorios.

Cabe mencionar que también se observó un efecto inhibitorio sobre la activación de las BMDC, en términos de CD86, tras el condicionamiento con el ácido graso nativo (CLA). Teniendo en cuenta que el CLA presenta dos dobles enlaces conjugados que lo hacen susceptible a la nitración, es posible que también sea modificado durante el cultivo celular generando productos de oxidación o peroxidación que pudieran actuar como electrófilos o incluso ligandos de PPAR γ . De todas maneras el efecto causado por el ácido graso nativo es mucho menor al constatado para el NO₂CLA, sugiriendo que la nitración está ligada a la capacidad moduladora.

Por otra parte, es importante mencionar que el condicionamiento con altas concentraciones de NO₂CLA (20 μM) no afecta significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, se observó un ligero descenso en la viabilidad de estas BMDC tras la estimulación con LPS, que se correspondió con un pequeño aumento en el porcentaje de células apoptóticas. De todas maneras, este aumento es marginal (aproximadamente 3%), por lo que descartamos que cause los robustos efectos observados sobre la expresión de CD86.

4.2.2 Caracterización del fenotipo inducido por el condicionamiento de BMDC con NO₂CLA

Luego de verificar que las condiciones ensayadas fueran adecuadas y no afectaran la viabilidad celular, realizamos un estudio más detallado del fenotipo inducido por NO₂CLA. En primer lugar constatamos que el condicionamiento con este NO₂-FA causó un considerable descenso en la expresión basal de CD80 y MHC II además de CD86. Además, de acuerdo a lo observado para CD86, luego de la estimulación con LPS las BMDC condicionadas con NO₂CLA presentaron niveles menores de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y MHC II así como de CCR7 y PD-L2. Estos resultados sugieren que las BMDC condicionadas con NO₂-FA serían resistentes a la activación. Este dramático descenso en moléculas esenciales para la funcionalidad de la BMDC como célula presentadora se correlacionó con una capacidad disminuida de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺, indicando que el tratamiento con NO₂CLA induciría en las BMDC un fenotipo inmunorregulador.

Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos pertinente discutir de qué forma estas células podrían modular la respuesta adaptativa. En primer lugar, cabe mencionar que si bien la expresión de CCR7 en las BMDC condicionadas es menor que en las BMDC control, los niveles de este receptor de quimioquinas responsable de dirigir a la célula a las zonas T de los ganglios, donde va a interactuar con los linfocitos T, es significativamente mayor que en las BMDC inmaduras. Esto nos hace suponer que en el contexto de una respuesta inflamatoria, las BMDC condicionadas por los NO₂-FA podrían migrar al ganglio y condicionar la respuesta T, aunque quizás en menor medida que las BMDC control. De todas maneras, sería deseable realizar estudios *in vivo* que nos permitieran analizar la migración de estas BMDC condicionadas para confirmarlo.

Si suponemos que las BMDC condicionadas con NO₂CLA son capaces de llegar a la zona T del ganglio a pesar de la reducción en CCR7, surge la pregunta de si estas células podrían interactuar de manera efectiva con los linfocitos T, ya que los niveles de moléculas de MHC II que expresan en superficie se encuentran dramáticamente reducidos. En el caso de perdieran por completo esta capacidad, su relevancia como células inmunomoduladoras sería nula ya que no podrían interactuar con los linfocitos T. De todas maneras, cabe esperar que este no fuera el caso ya si bien el descenso en la expresión de MHC II luego del condicionamiento con NO₂CLA es considerable, los niveles en superficie de este marcador en las BMDC condicionadas se asemejan a aquellos detectados en las BMDC previo a la estimulación con LPS. Esto nos sugiere que las BMDC tratadas con NO₂-FA podrían interactuar con los

linfocitos T de la misma manera que lo hace una BMDC no activada. El marcado descenso en la expresión de moléculas coestimuladoras causado por NO₂CLA, junto con los resultados obtenidos a partir de los experimentos de co-cultivo nos lleva a inferir que estas BMDC podrían causar la anergia de los linfocitos T vírgenes con los cuales interactúen. El escenario más atractivo sería que las BMDC condicionadas con NO₂CLA pudieran inducir la generación de linfocitos T reguladores, ya que esto supone un proceso mucho más activo y prolongado que la inducción de la anergia, la cual actuaría únicamente mediante la competencia con otros linfocitos T por la interacción con DC inmunogénicas que lleguen al ganglio. Para poder determinar esto, habría que realizar estudios funcionales de co-cultivo en mayor detalle, que sostengan la diferenciación de células T reguladoras, o estudiar el impacto que podría tener *in vivo* la inyección de BMDC condicionadas con NO₂CLA.

En cuanto a la capacidad de las BMDC condicionadas con NO₂CLA sesgar la respuesta, no contamos con mucha información, ya que el panel de citoquinas que estudiamos fue limitado. En primer lugar, observamos una inhibición de la producción basal de IL-12/IL-23p40 pero este efecto se perdió al estimular con LPS, ya que no detectamos diferencias entre las células control y aquellas tratadas con NO₂CLA. Lo mismo se constató para TNF α a nivel de ARNm. En cambio, para el caso de IL-10 constatamos una dramática inhibición de su síntesis tras la activación con LPS. Estos resultados sugerirían que el condicionamiento con NO₂CLA no inhibiría la diferenciación de las células T hacia un fenotipo Th1. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos de co-cultivo en cuanto a la determinación de IFN γ , ya que no se observaron diferencias significativas entre las BMDC condicionadas y las control. De todas maneras, sería deseable realizar estudios funcionales de co-cultivo en mayor detalle, que contemplen la diferenciación hacia las distintas subpoblaciones de linfocitos T efectores (Th1, Th2, Th17).

4.2.3 Análisis de la participación de distintas vías de señalización en el condicionamiento de BMDC por NO₂-FA

4.2.3.1 NF- κ B

Dada la variedad de blancos que tienen los NO₂-FA en las células, decidimos estudiar genes reporteros de 3 vías de señalización cuya modulación por NO₂-FA ha sido previamente reportada: la respuesta de shock térmico, la vía regulada por PPAR γ y la vía de Keap1/Nrf2. El estudio por PCR en tiempo real de los genes que codifican para Fabp4, HSP701a y HO-1 mostró que los 3 genes estaban inducidos en las

BMDC condicionadas, sugiriendo que las 3 vías previamente mencionadas son activadas por el NO₂CLA en las BMDC. De todas maneras, el aumento observado para FABP4 y HO-1 si bien es significativo es moderado, lo cual podría deberse a la cinética de inducción de estos genes. Es importante tener en cuenta que de acuerdo al esquema experimental utilizado, el NO₂CLA es agregado 48 horas previo a la cosecha de las BMDC, junto con el recambio de medio. En el trabajo publicado por Kansanen *et al* se detectó una rápida inducción del gen de HO-1 luego del tratamiento con OANO₂, que llegó a su máximo a las 8 horas y volvió a niveles basales a las 24 horas, indicando que la cinética de expresión de este gen es relativamente rápida y no es sostenida¹⁰². Datos obtenidos en nuestro laboratorio acerca de la cinética de inducción de FABP4 por NO₂-FA mostraron que este gen presenta una cinética relativamente rápida, observándose un pico en el nivel de ARNm a las 9 horas, y mostrando un rápido descenso transcurrido este tiempo. En cambio, en el caso de Hspa1a, se observó un aumento más importante. Puede ser que esta respuesta sea más sostenida en el tiempo o que este gen tenga una cinética más lenta que los anteriores. Cabe recordar que debido a su propiedad de electrófilos, los NO₂-FA muy difícilmente se encuentran en su forma libre, ya que reaccionan rápidamente formando aductos con proteínas. Además, existen sólidas evidencias de que estas moléculas son rápidamente metabolizadas por la maquinaria celular. Un reciente trabajo describió la existencia de una enzima que es capaz de reducir el doble enlace del grupo nitroalqueno de los NO₂-FA, eliminando así su capacidad de actuar como electrófilos y varias de sus acciones de señalización¹³². Por otro lado, también existen reportes de la existencia de productos de β-oxidación provenientes de NO₂-FA¹³³. En conjunto, estos resultados sugieren que la concentración de NO₂-FA biológicamente activa descendería rápidamente luego de su administración, lo cual explicaría por qué la inducción de los genes al momento que la estudiamos fue moderada. De todas maneras, esta información, junto con los antecedentes expuestos en la introducción sobre las vías de señalización moduladas por NO₂-FA, nos llevaron a analizar la contribución de las vías reguladas por Nrf2 y PPARγ. Decidimos no incluir el estudio de la vía de shock térmico ya que la información sobre la implicancia de esta vía sobre el fenotipo de las DC es casi inexistente y hasta el momento no existen vínculos sólidos entre el efecto anti-inflamatorio de los NO₂-FA y la inducción de esta vía.

Además, la disparidad en los efectos sobre la producción de citoquinas (IL-12/23p40 y TNFα versus IL-10), junto a los antecedentes acerca de la capacidad de los NO₂-FA de actuar sobre NF-κB^{90,93}, nos condujo a considerar un efecto inhibitorio del NO₂CLA sobre esta vía. La dramática inhibición de la expresión de la NOS2 observada en las BMDC condicionadas con NO₂CLA constituye otra evidencia

que apoya esta teoría, en base a la correlación observada entre la inhibición de la NOS2 y la activación de NF- κ B en macrófagos⁹⁰.

NF- κ B es una familia de factores de transcripción que incluye a RelA (p65), NF- κ B1 (p50 y p105), NF- κ B2 (p52 y p100), cRel y RelB (revisado por ¹²⁶). Bajo condiciones de reposo, estos factores de transcripción se encuentran secuestrados en el citoplasma por I κ Bs (del inglés, *inhibitor of kappa b*), que impiden su translocación al núcleo. Estímulos inflamatorios como el LPS inducen la degradación de las I κ Bs, permitiendo la migración de NF- κ B al núcleo, donde forman típicamente heterodímeros que se unen a los promotores de muchos genes asociados a la respuesta inmune, activando su transcripción. A diferencia de otros miembros de la familia, p50 carece de un dominio de transactivación, por lo que generalmente forma un heterodímero para poder ser transcripcionalmente activo. En ocasiones también es capaz de formar homodímeros, los cuales retienen su capacidad de unión al ADN y por lo tanto anteriormente se postulaba que actuaban como represores transcripcionales. Sin embargo, más recientemente se ha observado que p50 puede asociarse con otros factores como Bcl-3¹²⁷ o p300¹²⁸ para activar la transcripción. El estudio realizado por Cao *et al* evidenció que la transcripción de IL-10 es inducida por el homodímero de p50, contrario a lo que sucede para otras citoquinas, como IL-12 y TNF α . Según este trabajo, el homodímero formaría un complejo con coactivadores, interactuando de forma directa con CBP (del inglés, *CREB binding protein*), lo cual le permitiría activar la transcripción de IL-10¹²⁹. Respecto a las citoquinas TNF α e IL-12/23p40, p50 no participaría en la inducción de su expresión, sino que los factores cRel y p65 serían los encargados de inducir la producción de las mismas^{129,130}. Estos resultados van en línea con nuestras observaciones acerca del efecto del NO₂CLA sobre la producción de IL-10, IL-12/23p40 y TNF α , ya que apoyan mecanismos diferenciales de regulación de las mismas. Si el descenso en la producción de IL-10 por NO₂CLA se explicara a través de la inhibición de NF- κ B, debería haber un efecto diferencial del NO₂-FA sobre esta subunidad. Como ya se mencionó anteriormente, los NO₂FA son capaces de formar aductos con las subunidades p50 y p65, inhibiendo su unión al ADN, pero no podemos descartar que existan diferencias en la reactividad con estas dos proteínas. Por otro lado, existe un trabajo realizado en macrófagos que sostiene que la subunidad que parece ser esencial para la transcripción de IL-12/23p40 es cRel¹³⁰, siendo capaz de inducir la transcripción en forma de heterodímero tanto con p50 como con p65. Por lo tanto, un descenso en los niveles de p50 y p65 funcionales probablemente no tendría un efecto tan dramático sobre la expresión de esta citoquina como sobre la expresión de IL-10. Sin embargo, otro estudio realizado en DC de bazo asegura que esto no sería así¹³¹. Dado que el modelo de BMDC comparte

similitudes con ambos de los modelos utilizados en estos trabajos, no podemos prever cual de las dos situaciones se ajusta mejor a nuestro caso.

En relación a las disparidades observadas respecto a la producción de citoquinas, vale la pena comentar que la producción de IL-10 constituye también un mecanismo de regulación de la expresión de IL-12, ya que esta citoquina es capaz de inhibir la transcripción del gen correspondiente a la IL-12/23p40. Por lo tanto, el hecho de que no se observen diferencias en la producción de IL-12/23p40 tras la estimulación con LPS en las BMDC condicionadas con NO₂CLA podría deberse a que la inhibición de la producción de IL-10 (posiblemente causada por la inhibición de NF-κB) cause un fallo en este mecanismo de regulación negativa.

4.2.3.2 Nrf2

Para el estudio de la contribución de Nrf2 al efecto causado por NO₂CLA sobre las BMDC, se decidió trabajar con BMDC obtenidas a partir de ratones deficientes en Nrf2 (Nrf2^{-/-}). En primer lugar, vale la pena mencionar que el fenotipo de las BMDC deficientes en Nrf2 no reprodujo lo reportado por otros grupos, que describieron un mayor nivel de activación basal, caracterizado por un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras y en la producción de citoquinas como IL-10 e IL-12⁷¹. Una explicación posible para estas discordancias puede provenir de diferencias en el protocolo de preparación de las BMDC, ya que en el trabajo citado, estas fueron obtenidas utilizando GM-CSF + IL-4, mientras que en este trabajo utilizamos únicamente GM-CSF. Si bien existen trabajos que sostienen que el agregado de dosis estándares de IL-4 durante la diferenciación en presencia de dosis estándares de GM-CSF no alterarían el porcentaje de células CD11c⁺ presentes en el cultivo ni su estado de maduración, también postulan que dosis más altas de IL-4 junto a concentraciones estándares de GM-CSF inducen la maduración de las BMDC, resultando en un aumento en el porcentaje de células con alta expresión de moléculas coestimuladoras y MHC II¹³⁴. Al analizar los resultados de los trabajos realizados por otros grupos con BMDC Nrf2^{-/-} resulta evidente que los niveles de activación basal determinados incluso en las BMDC control son mucho mayores que los observados en nuestros experimentos, quizá debido a lo expuesto más arriba. Otra diferencia entre los protocolos utilizados es el tiempo de diferenciación (10 días versus 6-8 días).

Nuestros estudios mostraron que la deficiencia de Nrf2 no revirtió el efecto causado por el NO₂CLA sobre el fenotipo de las BMDC, excepto en el caso de la molécula coestimuladora CD40. La

participación de Nrf2 en la regulación de la expresión de CD40 también fue reportada por Williams et al⁷¹. En este trabajo, estudiaron los mecanismos asociados a la modulación de la activación de las DC por un antioxidante ampliamente utilizado, la N-acetil cisteína (precursor acetilado de la cisteína). En forma similar a lo observado en nuestro trabajo, la deficiencia en Nrf2 en las BMDC llevó a la pérdida del efecto inhibitorio de la N-acetil cisteína sobre la expresión de CD40, pero no de MHC II y otras moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, sugiriendo que Nrf2 podría tener un efecto diferencial participando de efectos moduladores sobre la inducción de CD40. Así, estas evidencias apoyan la idea de que Nrf2 podría participar en el mecanismo a través del cual el NO₂CLA modula el estado de activación de las BMDC. Sin embargo la activación de Nrf2 no sería la única vía de señalización involucrada en esta regulación ya que no puede explicar el fenotipo inducido por este NO₂-FA.

4.2.3.3 PPAR γ

Por otra parte, resultó interesante analizar la participación de PPAR γ debido a las actividades de los NO₂-FA como ligandos de este receptor^{85,99}, la reportada activación de PPAR γ durante la diferenciación de monocitos a DC⁵⁶ y la constatación de la activación de este receptor en las condiciones experimentales utilizadas por la administración de NO₂CLA, comprobada a través de la detección de la inducción del gen de FABP4. Así, para evaluar la participación del receptor PPAR γ en los efectos moduladores mediados por los NO₂-FA sobre las BMDC utilizamos dos estrategias experimentales. En primer lugar, condicionamos BMDC con RGZ, un agonista de PPAR γ , para ver si este reproducía los efectos del NO₂CLA. El estudio del fenotipo de las BMDC condicionadas con RGZ reveló que este agonista de PPAR γ se comportó en forma muy similar a la descrita para el NO₂CLA, provocando una profunda inhibición de moléculas coestimuladoras y de MHC II. Además, esto fue acompañado de una limitada capacidad de inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺, tal como se había observado para el NO₂-FA. Sin embargo, en este caso sí se observó un descenso en la producción de IFN γ en los cultivos de linfocitos T con las BMDC condicionadas con RGZ. En cuanto a las citoquinas, este agonista de PPAR γ reprodujo los efectos del NO₂CLA, salvo para el caso de la IL-12/23p40, para la cual se constató un significativo descenso aún luego de la estimulación con LPS. Estas disparidades en el comportamiento podrían reflejar una interacción diferencial con PPAR γ , ya que está reportado que a diferencia de la RGZ, que actúa como un agonista total de este receptor, los NO₂-FA han sido descritos como agonistas parciales del mismo⁹⁸. Esto se traduce en una menor capacidad de reclutar coactivadores necesarios para la transcripción a los PPRE y por lo tanto en un menor número de genes

regulados por este tipo de agonista, lo cual es compatible con los resultados observados. En conclusión, estos resultados constituyen un fuerte indicio de que el NO₂CLA podría estar actuando a través de la activación de PPAR γ , lo cual nos alentó a seguir estudiando la contribución de PPAR γ al mecanismo de acción del NO₂CLA.

Para esto utilizamos como herramienta al inhibidor de PPAR γ GW9662, ya que no contamos con BMDC deficientes en PPAR γ . Como segunda estrategia experimental para el estudio de la implicancia de PPAR γ en el fenotipo establecido por el NO₂CLA, condicionamos BMDC con el NO₂-FA en presencia del inhibidor de PPAR γ . El tratamiento con este antagonista de las BMDC condicionadas revirtió en gran parte los efectos descritos sobre el estado de activación de la célula luego de la estimulación con LPS, pero no provocó ningún cambio en la capacidad del NO₂CLA de influir sobre la expresión de marcadores de activación ni sobre la producción de IL-12/23p40 en condiciones de reposo. Esto sugiere por un lado que los mecanismos de regulación de la expresión basal de estas moléculas, así como la producción de citoquinas como la IL-12/23p40 son distintos a cuando su expresión es inducida por un agonista de TLR. Por otro lado, podemos concluir que la expresión basal de estas moléculas está regulada por una o más vías que no son afectadas por la activación de PPAR γ .

Existen varios mecanismos propuestos a través de los cuales PPAR γ podría inhibir la expresión de genes proinflamatorios: competición por un pool limitante de coactivadores¹³⁵, interacción directa con las subunidades p65 y p50 de NF- κ B¹³⁶ y modulación de la actividad de la MAPK p38¹³⁷. Más recientemente, se ha propuesto que al ser activado por sus ligandos, PPAR γ podría interactuar con el complejo de correpresores ensamblado en el promotor de ciertos genes inflamatorios regulados por NF- κ B, inhibiendo su eliminación dependiente de ubiquitinación desencadenada por estímulos como el LPS. Este mecanismo estaría mediado por la sumoilación de PPAR γ ^{53,138}. Relacionado a los reportes que sostienen que PPAR γ podría interactuar directamente con p50 y p65, un estudio más reciente propone que este receptor nuclear actuaría como una ligasa de ubiquitina, induciendo la degradación de NF- κ B¹³⁹. Debido a la propiedad de los NO₂-FA de actuar como agonistas de PPAR γ y ser capaces de inhibir directamente a NF- κ B, resulta muy difícil discernir cual es la contribución de cada uno de estos mecanismos al efecto final. Nuestros resultados revelaron que el tratamiento con GW9662 revirtió en la mayoría de los marcadores ensayados solo parte del efecto mediado por el NO₂CLA. Esto es compatible con una acción directa del NO₂-FA sobre NF- κ B, que no es inhibida al bloquear la activación de PPAR γ .

4.2.3.4 SWAP70

En cuanto a las vías de señalización involucradas en la activación basal de las DC, no hay mucha información disponible hasta el momento. Recientemente un grupo postuló que SWAP70, inicialmente identificada como una proteína involucrada en la activación de las células B y en el cambio de clase de la cadena pesada de las inmunoglobulinas^{140,141}, estaría involucrada en el proceso de maduración espontánea de las DC. Este trabajo mostró que las BMDC deficientes en esta proteína presentaban mayores niveles basales de expresión de la molécula coestimuladora CD86 y de MHC II¹⁴². En contraste, no se observaron diferencias significativas en la expresión de estas moléculas luego de la estimulación con LPS, sugiriendo que la regulación de la inducción de las mismas por un estímulo inflamatorio está mediada por vías de señalización independientes, tal como se constató en este trabajo. Sin embargo, es necesario estudiar esta vía en mayor detalle para poder comprender su rol en la inmunogenicidad de las DC y su potencial modulación por los NO₂-FA.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la presencia de NO₂-FA durante el proceso de diferenciación conduciría a la generación de DC con un fenotipo potencialmente inmunorregulador, dada su limitada capacidad para activar de linfocitos T vírgenes. No obstante, son necesarios estudios complementarios para establecer si este fenotipo podría vincularse con la generación de células T reguladoras que permitieran inducir tolerancia específica contra los antígenos procesados por la DC. Profundizar en este aspecto es importante ya que la capacidad de inducir la generación de células T reguladoras constituye una propiedad muy valiosa pensando en el eventual uso de estas DC para aplicaciones médicas (ver abajo). En cualquier caso, dado que los efectos reguladores del NO₂CLA fueron examinados utilizando un modelo de cultivo celular (BMDC), resulta pertinente comentar en qué situación *in vivo* este modelo podría tener un correlato fisiológico. Como ya se mencionó antes, las BMDC constituyen un modelo aceptado para el estudio de las DC inflamatorias, las cuales, a diferencia de las DC residentes en tejidos, se diferencian a partir de monocitos que migran a los tejidos en condiciones inflamatorias. Por tanto, el condicionamiento de DC inflamatorias con NO₂-FA requeriría que los monocitos que ingresan al tejido inflamado se encontraran con las señales que inducen su

diferenciación a DC junto con los NO₂-FA. A partir de estudios realizados en nuestro grupo en colaboración con el Dr. Francisco Schopfer sabemos que los macrófagos y las células dendríticas activadas por estímulos pro-inflamatorios (i.e. LPS+IFN γ) expresan la NOS2 y generan NO₂-FA, incluyendo NO₂CLA (resultados obtenidos durante mi pasantía en el laboratorio del Dr. Schopfer). De esta manera, sería posible que durante una respuesta inflamatoria capaz de inducir generación de *NO los monocitos que ingresen al sitio inflamatorio encuentren señales para su diferenciación a DC inflamatorias y niveles de NO₂-FA capaces de dirigir la diferenciación hacia un fenotipo de BMDC con funciones inmunorreguladoras. Estas BMDC condicionadas por los NO₂-FA, tendrían influencia sobre la respuesta local (por ejemplo por su menor capacidad para sintetizar *NO), pero sobre todo afectarían el disparo de la respuesta adaptativa en el ganglio drenante a través de su interacción con los linfocitos T. Por tanto los resultados de esta tesis apoyan el concepto de que los NO₂-FA actúan como moduladores endógenos de la activación de las DC. Sin embargo, es importante tener en mente que hasta hoy se discute en qué orden de magnitud están los niveles de NO₂-FA generados in vivo; estas moléculas son altamente reactivas y además de formar aductos con proteínas sufren procesos de metabolización (oxidación, reducción) que reducen rápidamente su concentración. Por otro lado, la utilización del diseño experimental examinado en esta tesis capaz de condicionar las DC favoreciendo su diferenciación en fenotipos reguladores resulta atractiva como potencial terapia para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o para prevenir el rechazo de trasplantes, pudiéndose administrar el NO₂-FA en forma local o incluso generar DC condicionadas con NO₂-FA a partir de precursores sanguíneos. Respecto a la posible administración de los NO₂-FA, estas moléculas presentan varias ventajas como potenciales drogas; ya que son moléculas definidas, posibles de sintetizar, purificar y cuantificar por métodos ya establecidos, e incapaces de inducir una respuesta inmune contra ellas, debido a su tamaño, naturaleza química, sumado al hecho de que se generan endógenamente. El segundo tipo de estrategias se encuentra en desarrollo aún y constituyen un área de gran interés ya que permitiría generar una terapia “personalizada” , es decir donde sería posible diseñar para cada individuo un tratamiento en base a la administración a DC condicionadas de los antígenos contra los cuales se quiere generar tolerancia, eliminando la dependencia de drogas inmunosupresoras que carecen de especificidad.

4.3 Comentario final

En conjunto, este trabajo describe dos nuevos mecanismos mediante los cuales los NO₂-FA modularían la respuesta inmune: promoviendo la activación alternativa de macrófagos e inhibiendo la activación de las DC hacia fenotipos inmunogénicos, lo cual no sólo aporta al conocimiento sobre como funcionarían estas moléculas en el transcurso de una respuesta, sino que también le agregan mucho atractivo como potenciales drogas inmunomoduladoras. De todas maneras, el estudio realizado en esta tesis es solo un comienzo, y es necesario continuar profundizando en los mecanismos utilizados por los NO₂-FA para inducir los efectos previamente mencionados, así como en el estudio funcional de las DC condicionadas con los mismos para contribuir a la comprensión del impacto que podrían tener en el desarrollo de una respuesta adaptativa.

5 Bibliografía

1. Van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 415–435 (1968).
2. Van Furth, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* **46**, 845–852 (1972).
3. Yona, S. *et al.* Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
4. Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804 (2013).
5. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 392–404 (2014).
6. Burke, B. & Lewis, C. E. *The Macrophage*. 680 (Oxford University Press, 2002). at <<http://ukcatalogue.oup.com/product/9780192631978.do>>
7. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–64 (2005).
8. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–69 (2008).
9. Dalton, D. K. *et al.* Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* **259**, 1739–42 (1993).
10. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–92 (1992).
11. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
12. Van Dyken, S. J. & Locksley, R. M. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 317–43 (2013).
13. Helming, L., Winter, J. & Gordon, S. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J Cell Sci* **122**, 453–459 (2009).
14. Rutschman, R. *et al.* Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol.* **166**, 2173–2177 (2001).
15. Modolell, M. *et al.* Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e480 (2009).
16. Ash, D. E. Structure and function of arginases. *J Nutr* **134**, 2760S–2764S; discussion 2765S–2767S (2004).

17. Pesce, J. T. et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* **5**, e1000371 (2009).
18. Campbell, L., Saville, C. R., Murray, P. J., Cruickshank, S. M. & Hardman, M. J. Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* **133**, 2461–2470 (2013).
19. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
20. Steinman, R. M. & Hemmi, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 17–58 (2006).
21. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
22. Förster, R., Davalos-Misslitz, A. C. & Rot, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 362–71 (2008).
23. Kamath, A. T. et al. The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations. *J. Immunol.* **165**, 6762–6770 (2000).
24. Fujii, S.-I., Liu, K., Smith, C., Bonito, A. J. & Steinman, R. M. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med.* **199**, 1607–18 (2004).
25. Reis e Sousa, C. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* **16**, 21–25 (2004).
26. Maldonado, R. A. & von Andrian, U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* **108**, 111–165 (2010).
27. Piemonti, L. et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* **162**, 6473–6481 (1999).
28. Penna, G. & Adorini, L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* **164**, 2405–2411 (2000).
29. Hackstein, H. et al. Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J Immunol* **166**, 7053–7062 (2001).
30. Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* **159**, 4772–4780 (1997).
31. Frick, J. S., Grunebach, F. & Autenrieth, I. B. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol* **300**, 19–24 (2010).
32. Mahnke, K., Schmitt, E., Bonifaz, L., Enk, A. H. & Jonuleit, H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **80**, 477–483 (2002).

33. Hilkens, C. M. U., Isaacs, J. D. & Thomson, A. W. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* **29**, 156–183 (2010).
34. Hermansson, A. *et al.* Immunotherapy with tolerogenic apolipoprotein B-100-loaded dendritic cells attenuates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* **123**, 1083–1091 (2011).
35. Paulis, L. E., Mandal, S., Kreutz, M. & Figdor, C. G. Dendritic cell-based nanovaccines for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 389–395 (2013).
36. Diao, J. *et al.* In Situ Replication of Immediate Dendritic Cell (DC) Precursors Contributes to Conventional DC Homeostasis in Lymphoid Tissue. *J. Immunol.* **176**, 7196–7206 (2006).
37. Naik, S. H. *et al.* Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* **7**, 663–71 (2006).
38. León, B., López-Bravo, M. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* **26**, 519–31 (2007).
39. Hohl, T. M. *et al.* Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe* **6**, 470–81 (2009).
40. Schreiber, H. A. *et al.* Inflammatory dendritic cells migrate in and out of transplanted chronic mycobacterial granulomas in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 3902–13 (2011).
41. Aldridge, J. R. *et al.* TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5306–11 (2009).
42. Plantinga, M. *et al.* Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* **38**, 322–35 (2013).
43. Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A. M., Naik, S. H. & Kershaw, M. H. Differential Development of Murine Dendritic Cells by GM-CSF versus Flt3 Ligand Has Implications for Inflammation and Trafficking. *J. Immunol.* **179**, 7577–7584 (2007).
44. Greter, M. *et al.* GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* **36**, 1031–46 (2012).
45. Campbell, I. K. *et al.* Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF- κ B1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells. *J. Immunol.* **186**, 5468–77 (2011).
46. Zhang, L. & Chawla, A. Role of PPAR γ in macrophage biology and atherosclerosis. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**, 500–505 (2004).
47. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B. M. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 571–576 (1995).
48. Heikkinen, S., Auwerx, J. & Argmann, C. A. PPAR γ in human and mouse physiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 999–1013 (2007).

49. Chandra, V. et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature* **456**, 350–356 (2008).
50. Odegaard, J. I. et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–20 (2007).
51. Huang, J. T. et al. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400**, 378–82 (1999).
52. Stienstra, R. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation promotes infiltration of alternatively activated macrophages into adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **283**, 22620–7 (2008).
53. Pascual, G. et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* **437**, 759–763 (2005).
54. Szanto, A. et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARgamma-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* **33**, 699–712 (2010).
55. Klotz, L. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Control of Dendritic Cell Function Contributes to Development of CD4+ T Cell Anergy. *J. Immunol.* **178**, 2122–2131 (2007).
56. Szatmari, I. et al. PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood* **110**, 3271–3280 (2007).
57. Klotz, L. et al. Increased antigen cross-presentation but impaired cross-priming after activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is mediated by up-regulation of B7H1. *J Immunol* **183**, 129–136 (2009).
58. Tuna, H. et al. Regulation of the mucosal phenotype in dendritic cells by PPARγ: role of tissue microenvironment. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 471–85 (2014).
59. Appel, S. et al. PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood* **106**, 3888–3894 (2005).
60. Wei-guo, Z. et al. PPAR-gamma agonist inhibits Ang II-induced activation of dendritic cells via the MAPK and NF-kappaB pathways. *Immunol Cell Biol* **88**, 305–312 (2010).
61. Szatmari, I. et al. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 2351–2362 (2006).
62. Elias, K. M. et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* **111**, 1013–1020 (2008).
63. Housley, W. J. et al. PPARgamma regulates retinoic acid-mediated DC induction of Tregs. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 293–301 (2009).
64. Itoh, K. et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313–22 (1997).

65. Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 13291–5 (2009).
66. Rangasamy, T. et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Clin. Invest.* **114**, 1248–1259 (2004).
67. Rangasamy, T. et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J. Exp. Med.* **202**, 47–59 (2005).
68. Cho, H.-Y., Reddy, S. P. M., Yamamoto, M. & Kleeberger, S. R. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *FASEB J.* **18**, 1258–1260 (2004).
69. Khor, T. O. et al. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res.* **66**, 11580–11584 (2006).
70. Kong, X., Thimmulappa, R., Kombairaju, P. & Biswal, S. NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species mediate amplified TLR4 signaling and sepsis-induced mortality in Nrf2-deficient mice. *J Immunol* **185**, 569–577 (2010).
71. Williams, M. A. et al. Disruption of the Transcription Factor Nrf2 Promotes Pro-Oxidative Dendritic Cells That Stimulate Th2-Like Immunoresponsiveness upon Activation by Ambient Particulate Matter. *J. Immunol.* **181**, 4545–4559 (2008).
72. Rangasamy, T. et al. Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 inhibits the maturation of murine dendritic cells by ragweed extract. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **43**, 276–85 (2010).
73. Al-Huseini, L. M. a et al. Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) modulates dendritic cell immune function through regulation of p38 MAPK-cAMP-responsive element binding protein/activating transcription factor 1 signaling. *J. Biol. Chem.* **288**, 22281–8 (2013).
74. Alam, J. et al. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* **274**, 26071–26078 (1999).
75. Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S. & Nakanishi, I. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* **33**, 125–130 (2002).
76. Radhakrishnan, N. et al. Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *J Pediatr Hematol Oncol* **33**, 74–78 (2011).
77. Abraham, N. & Kappas, A. Heme oxygenase and the cardiovascular–renal system. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 1–25 (2005).
78. Blancou, P. & Anegon, I. Editorial: Heme oxygenase-1 and dendritic cells: what else? *J Leukoc Biol* **87**, 185–187 (2010).
79. Al-Huseini, L. M. a et al. Heme Oxygenase-1 Regulates Dendritic Cell Function through Modulation of p38 MAPK-CREB/ATF1 Signaling. *J. Biol. Chem.* **289**, 16442–16451 (2014).
80. Schopfer, F. J., Cipollina, C. & Freeman, B. A. Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem Rev* **111**, 5997–6021 (2011).

81. Bonacci, G. *et al.* Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J Biol Chem* **287**, 44071–44082 (2012).
82. Salvatore, S. R. *et al.* Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine. *J Lipid Res* **54**, 1998–2009 (2013).
83. Freeman, B. A. *et al.* Nitro-fatty Acid Formation and Signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 15515–15519 (2008).
84. Trostchansky, A. *et al.* Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry* **46**, 4645–4653 (2007).
85. Baker, P. R. S. *et al.* Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: MULTIPLE NITRATED UNSATURATED FATTY ACID DERIVATIVES EXIST IN HUMAN BLOOD AND URINE AND SERVE AS ENDOGENOUS PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR LIGANDS. *J. Biol. Chem.* **280**, 42464–42475 (2005).
86. Lim, D. G. *et al.* Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: Synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15941–15946 (2002).
87. Schopfer, F. J. *et al.* Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling: NITROLINOLEIC ACID IS A HYDROPHOBICALLY STABILIZED NITRIC OXIDE DONOR. *J. Biol. Chem.* **280**, 19289–19297 (2005).
88. Batthyany, C. *et al.* Reversible Post-translational Modification of Proteins by Nitrated Fatty Acids in Vivo. *J. Biol. Chem.* **281**, 20450–20463 (2006).
89. Kansanen, E. *et al.* Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem* **286**, 14019–14027 (2011).
90. Cui, T. *et al.* Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J. Biol. Chem.* **281**, 35686–98 (2006).
91. Baker, L. M. S. *et al.* Nitro-fatty Acid Reaction with Glutathione and Cysteine: KINETIC ANALYSIS OF THIOL ALKYLATION BY A MICHAEL ADDITION REACTION. *J. Biol. Chem.* **282**, 31085–31093 (2007).
92. 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).
93. Ferreira, A. M. *et al.* Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J* **417**, 223–234 (2009).
94. Rudolph, T. K. *et al.* Nitro-Fatty Acids Reduce Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arter. Thromb Vasc Biol* **30**, 938–945 (2010).
95. Borniquel, S., Jansson, E. A., Cole, M. P., Freeman, B. A. & Lundberg, J. O. Nitrated oleic acid up-regulates PPARgamma and attenuates experimental inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* **48**, 499–505 (2010).
96. 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 (2009).

97. Liu, H. et al. Nitro-oleic acid protects the mouse kidney from ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Ren. Physiol* **295**, F942–9 (2008).
98. Schopfer, F. J. et al. Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J. Biol. Chem.* **285**, 12321–33 (2010).
99. Schopfer, F. J. et al. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2340–5 (2005).
100. Minarrieta, L. & Ferreira, A. M. Estudio del efecto de los nitroalquenos sobre la inducción de la enzima arginasa-1 en macrófagos. *Cátedra Inmunol.* (2011).
101. 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.* **103**, 4299–4304 (2006).
102. 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**, 33233–41 (2009).
103. Khoo, N. K. et al. Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* **48**, 230–239 (2010).
104. Cole, M. P. et al. Nitro-Fatty Acid Inhibition of Neointima Formation After Endoluminal Vessel Injury. *Circ Res* **105**, 965–972 (2009).
105. Westerheide, S. D. & Morimoto, R. I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J. Biol. Chem.* **280**, 33097–100 (2005).
106. West, J. D., Wang, Y. & Morano, K. A. Small molecule activators of the heat shock response: chemical properties, molecular targets, and therapeutic promise. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 2036–53 (2012).
107. Lutz, M. B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**, 77–92 (1999).
108. Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. & Modolell, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* **174**, 231–235 (1994).
109. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
110. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
111. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
112. Jenkins, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**, 1284–8 (2011).

113. Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492–503 (2010).
114. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
115. Gray, M. J., Poljakovic, M., Kepka-Lenhart, D. & Morris, S. M. Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBPbeta. *Gene* **353**, 98–106 (2005).
116. Stutz, A. M. et al. The Th2 Cell Cytokines IL-4 and IL-13 Regulate Found in Inflammatory Zone 1/Resistin-Like Molecule Gene Expression by a STAT6 and CCAAT/Enhancer-Binding Protein-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **170**, 1789–1796 (2003).
117. Welch, J. S. et al. TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**, 42821–9 (2002).
118. Gallardo-Soler, A. et al. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1394–402 (2008).
119. Prieto-Lafuente, L., Gregory, W. F., Allen, J. E. & Maizels, R. M. MIF homologues from a filarial nematode parasite synergize with IL-4 to induce alternative activation of host macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 844–54 (2009).
120. Weisser, S. & McLaren, K. Alternative activation of macrophages by IL-4 requires SHIP degradation. *Eur. J. ...* 1742–1753 (2011). doi:10.1002/eji.201041105
121. Atochina, O., Da'dara, A. a, Walker, M. & Harn, D. a. The immunomodulatory glycan LNFPIII initiates alternative activation of murine macrophages in vivo. *Immunology* **125**, 111–21 (2008).
122. Castrillo, A., Mojena, M., Hortelano, S. & Boscá, L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent inhibition of macrophage activation by the non-thiazolidinedione agonist L-796,449. Comparison with the effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2). *J. Biol. Chem.* **276**, 34082–8 (2001).
123. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* **391**, 79–82 (1998).
124. Loke, P. et al. Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4+ T Cells to be Sustained during Chronic Infection. *J. Immunol.* **179**, 3926–3936 (2007).
125. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637–50 (2011).
126. Li, Q. & Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725–34 (2002).
127. Fujita, T., Nolan, G. P., Liou, H. C., Scott, M. L. & Baltimore, D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev.* **7**, 1354–63 (1993).

128. Deng, W.-G. & Wu, K. K. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. *J. Immunol.* **171**, 6581–8 (2003).
129. Cao, S., Zhang, X., Edwards, J. P. & Mosser, D. M. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* **281**, 26041–50 (2006).
130. Sanjabi, S., Hoffmann, A., Liou, H. C., Baltimore, D. & Smale, S. T. Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12705–10 (2000).
131. Grumont, R. et al. c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J. Exp. Med.* **194**, 1021–32 (2001).
132. Vitturi, D. a et al. Modulation of nitro-fatty acid signaling: prostaglandin reductase-1 is a nitroalkene reductase. *J Biol Chem* **288**, 25626–25637 (2013).
133. Rudolph, V. et al. Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J. Biol. Chem.* **284**, 1461–73 (2009).
134. Lutz, M. B. et al. Differential Functions of IL-4 Receptor Types I and II for Dendritic Cell Maturation and IL-12 Production and Their Dependency on GM-CSF. *J. Immunol.* **169**, 3574–3580 (2002).
135. KAMEI, Y. A CBP Integrator Complex Mediates Transcriptional Activation and AP-1 Inhibition by Nuclear Receptors. *Cell* **85**, 403–414 (1996).
136. Chung, S. W. et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* **275**, 32681–7 (2000).
137. Goetze, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **38**, 909–21 (2001).
138. Ohshima, T., Koga, H. & Shimotohno, K. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* **279**, 29551–7 (2004).
139. Hou, Y., Moreau, F. & Chadee, K. PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. *Nat. Commun.* **3**, 1300 (2012).
140. Borggreffe, T., Wabl, M., Akhmedov, A. T. & Jessberger, R. A B-cell-specific DNA recombination complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 17025–35 (1998).
141. Borggreffe, T. et al. Cellular, intracellular, and developmental expression patterns of murine SWAP-70. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1812–22 (1999).
142. Ocaña-Morgner, C., Götz, A., Wahren, C. & Jessberger, R. SWAP-70 restricts spontaneous maturation of dendritic cells. *J. Immunol.* **190**, 5545–58 (2013).
143. Ferreira, A. M., Minarrieta, L., Lamas Bervejillo, M. & Rubbo, H. Nitro-fatty acids as novel electrophilic ligands for peroxisome proliferator-activated receptors. *Free Radic Biol Med* **53**, 1654–1663 (2012).

